

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen
Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig- Maximilians- Universität
München

Lehrstuhl: Univ.- Prof. Dr. A. Stolle

Ein Beitrag zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Hackfleisch
und Fleischerzeugnissen vom Schwein im Hinblick auf die eingesetzten
Kultur- und Isolierungsverfahren

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde durch die
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig- Maximilian- Universität
München

Vorgelegt von

Christina Hank
aus München

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig- Maximilian- Universität München

Dekan:	Univ.- Prof. Dr. R. Stolla
Referent:	Univ.- Prof. Dr. A. Stolle
Korreferent:	Univ.- Prof. Dr. O.- R. Kaaden

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
abs.	absolut
ADH	Arginindehydrolase
ail	Attachment invasion locus
AMY	Amygdalin
ARA	Arabinose
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CASO	Casein-Sojamehl-Pepton
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
CIT	Citrat
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ent.	Enterocolitica
et al.	et alli
g	Gramm
GEL	Gelatinase
GLU	Glucose
h	Stunde
H-Antigene	Geißel-Antigene
Ig	Immunglobulin
IND	Indol
INO	Inosit
inv	Invasin-Gen
ITC	Irgasan-Ticarcilin-Kaliumchlorat
K-Antigene	Kapsel-Antigene
kb	Kilobase
KbE	Kolonien bildende Einheiten
kDa	kilo-Dalton
LDC	Lysindecaboxylase
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar

MAN	Mannit
MEL	Melibiose
mg	Milligramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	absolute Zahl
N	Normal
NIT	Nitrat
O-Antigene	Oberflächen-Antigene
ODC	Ornitindecaboxylase
PCR	Polymerase chain reaction
PP	Peyer'sche Platten
RHA	Rhamnose
SAC	Saccharose
SOR	Sorbit
SSDC-Agar	modifizierter <i>Salmonella-Shigella</i> -Agar
TSA	Trypton Soja Agar
TSB	Tryptone Soja Nährbouillon
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
URE	Urease
v.a.	vor allem
VP	Voges-Proskauer
Y.	<i>Yersinia</i>
Yad	<i>Yersinia</i> adhesin
Yop	<i>Yersinia</i> outer membrane protein
YVE	virulent <i>Yersinia enterocolitica</i>

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	8
2 LITERATUR	10
2.1 Geschichte	10
2.2 Taxonomische Stellung und Eigenschaften	10
2.2.1 Biotyp	11
2.2.2 Serotyp	12
2.3 Pathogenität	13
2.3.1 Plasmidkodierte Virulenzfaktoren	13
2.3.2 Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren	15
2.4 Infektionsweg	18
2.5 Vorkommen bei Tieren	19
2.5.1 Schwein	19
2.5.2 Sonstige relevanten Tierarten	19
2.6 Übertragungsmöglichkeiten von <i>Y. enterocolitica</i>	19
2.7 Klinische Manifestation	21
2.8 <i>Y. enterocolitica</i> in Lebensmitteln	21
2.8.1 <i>Y. enterocolitica</i> in Produkten vom Schwein	22
2.8.2 <i>Y. enterocolitica</i> in anderen Lebensmitteln	24
2.9 Wachstumsbedingende Faktoren in Lebensmitteln	28

2.10	Nachweisverfahren	28
2.10.1	Nachweis aus Lebensmittelproben	28
2.10.2	Nachweis aus anderen Proben	29
2.10.3	Anreicherungsmedien	29
2.10.4	Anreicherungsverfahren	30
2.10.4.1	Anreicherung bei Zimmertemperatur	31
2.10.4.2	Zweistufige Anreicherungsverfahren	32
2.10.4.3	Kälteanreicherung	33
2.10.5	Isolation	34
2.10.5.1	Selektivnährmedien	34
2.10.5.2	KOH- Behandlung	36
2.10.6	Identifizierung	36
2.10.7	Pathogenitätsnachweis	37
3	MATERIAL UND METHODEN	40
3.1	Material	40
3.1.1	Probenmaterial	40
3.1.2	Untersuchungsmaterial	40
3.2	Methoden	42
3.2.1	Methoden zur Anreicherung und Isolierung von <i>Y. enterocolitica</i>	42
3.2.2	Methoden zur Identifikation von <i>Y. enterocolitica</i>	46
3.2.2.1	Urea- Test	46

Inhaltsverzeichnis	6	
3.2.2.2	Api 20E	46
3.2.2.3	Lagerung der identifizierten <i>Yersinia</i> - Isolate	48
3.2.2.4	Biotypisierung	48
3.2.2.5	Serotypisierung	49
3.2.2.6	Pathogenitätsnachweis	49
4	ERGEBNISSE	51
4.1	Nachweis von pathogenen <i>Y. enterocolitica</i> in der Gesamtmenge der Proben	51
4.2	Nachweis von pathogenen <i>Y. enterocolitica</i> in den verschiedenen Produktgruppen	51
4.3	Vergleich der Nachweisverfahren	52
4.4	Ergebnis des Testsystems Api 20E	55
4.5	Ergebnis der Bio- und Serotypisierung	57
4.6	Ergebnis der Untersuchung auf Pathogenität	58
5	DISKUSSION	59
5.1	Vorkommen von pathogenen <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3	59
5.1.1	Vorkommen in rohen Schweinefleischprodukten	59
5.1.2	Vorkommen in erhitzten Schweinefleischprodukten	60
5.2	Mögliche Kontaminationswege	61
5.2.1	Kontamination während des Schlachtvorganges	61
5.2.2	Kontamination während der Verarbeitung	62
5.2.3	Risiken bei der Lagerung	63

Inhaltsverzeichnis	7
<hr/>	
5.3 Infektionsquellen für den Verbraucher	63
5.4 Nachweis	64
5.4.1 Anreicherungsverfahren	64
5.4.2 Identifizierung durch Api 20E	66
5.4.3 Identifizierung durch Bio- und Serotypisierung	66
5.4.4 Pathogenitätstest	67
6 ZUSAMMENFASSUNG	68
7 SUMMARY	69
8 ANHANG	70
8.1 Verwendete Medien für den Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i>	70
8.1.1 Feste Medien	70
8.1.2 Flüssige Medien	73
8.2 Aufbewahrungsmedium	75
8.3 Testsysteme und Reagenzien	75
8.4 Geräte und Hilfsmittel	76
8.5 Ergebnisse der Untersuchungen	80
9 LITERATURVERZEICHNIS	88

1 Einleitung

Die Yersiniose, die nach der Salmonellose und der Campylobacteriose die dritthäufigste gastrointestinale Erkrankung in Deutschland darstellt, gehört seit 2001 zu den meldepflichtigen Erkrankungen.

Die Epidemiologie von *Y. enterocolitica* ist bisher noch unzureichend geklärt. Obwohl selten pathogene Vertreter aus Lebensmitteln isoliert wurden, wird vermutet, dass *Y. enterocolitica* ein bedeutender, in Nahrungsmitteln enthaltener Krankheitserreger ist. Speziell durch den Konsum von rohem Fleisch und Schweinefleischprodukten wird in Deutschland ein Zusammenhang mit Yersinieninfektionen angenommen. Die Symptome der Yersiniose reichen von selbst limitierenden Enteritiden bis hin zu tödlich verlaufenden Septikämien bei Neugeborenen und immunsupprimierten Menschen.

Nur wenige Bioserotypen von *Y. enterocolitica* werden mit Erkrankungen des Menschen in Verbindung gebracht. In Deutschland ist der Bioserotyp 4/O:3 der am meisten verbreitete. Als wichtigster Träger dieses Bioserotyps wurden klinisch gesunde Schweine identifiziert, bei denen neben dem Kot vor allem die Tonsillen befallen sind. In Bayern findet man *Y. enterocolitica* 4/O:3 häufig in den Tonsillen von Schlachtschweinen. Auch von Innereien wurden pathogene *Y. enterocolitica* isoliert. Hierbei liegt die Vermutung nahe, dass es hier zur Kreuzkontamination beim Schlachtvorgang bis hin zur Verunreinigung des übrigen Schlachtkörpers, insbesondere des Fleisches im weiteren Produktionsablauf kommen kann. Auf dem Weg zum Endverbraucher bestehen immer wieder Gefahren einer möglichen Kontamination mit *Y. enterocolitica* durch Be- und Verarbeitung, sowie die Lagerung.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Prävalenz pathogener *Y. enterocolitica* im Endprodukt schweinefleischhaltiger Lebensmittel zu untersuchen. Probleme entstehen jedoch immer wieder bei der Isolierung von *Y. enterocolitica*, da unterschiedliche Probenmaterialien von Lebensmitteln auch unterschiedliche Anforderungen an die Untersuchungsmethoden stellen. Die Untersuchung von Nahrungsmitteln kann durch eine starke Begleitflora erschwert werden. Momentan besteht kein Verfahren, das zuverlässig alle pathogenen Serotypen entdeckt.

Daher wurden in der vorliegende Arbeit mehrere Nachweismethoden parallel eingesetzt und im Anschluß miteinander verglichen.

2 Literatur

2.1 Geschichte

Bereits 1939 isolierten SCHLEIFSTEIN und COLEMAN bis dahin unbekannte Bakterienstämme aus klinischem Material einiger Menschen, die an akuter Enteritis erkrankt waren. Diesen, heute als *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) bezeichneten Keim, beschrieben HÄSSIG et al. 1949 erneut beim Menschen. Sie ordneten ihm aufgrund der Ähnlichkeit der pathologisch-anatomischen Organveränderungen mit der tierischen Pseudotuberkulose und der morphologischen Ähnlichkeit des Erregers mit *Pasteurella pseudotuberculosis* vorübergehend dessen Namen zu. FREDERIKSEN (1964) entdeckte Ähnlichkeiten zwischen dieser Spezies und einigen anderen inzwischen in human- und veterinärmedizinischem Material gefundenen Stämmen. Er war es, der 1964 für diese Bakterien die heute gültige Bezeichnung *Yersinia* vorschlug. Die Namensgebung erfolgte zu Ehren des Bakteriologen A.J.E. Yersin, der im Jahre 1894 erstmals den Erreger der Pest isolierte (BERCOVIER und MOLLART, 1984).

2.2 Taxonomische Stellung und Eigenschaften

Y. enterocolitica ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes, pleomorphes, peritrich begeißeltes Stäbchenbakterium, das eine Länge von 1,0-5,0 µm und eine Breite von 0,5-0,8 µm besitzt. Yersinien sind oxidasenegativ, katalasepositiv und reduzieren Nitrat zu Nitrit (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Sie kommen ubiquitär vor und bilden keine Kapseln oder Sporen (KNAPP, 1988). Geißeln werden in der Regel nur bei Temperaturen unter +30°C gebildet. Bei +37°C sind Yersinien deshalb unbeweglich. *Y. enterocolitica* ist psychrotrop, das bedeutet sie können sich bei Kühlungstemperaturen bis 0°C vermehren. Die optimale Wachstumstemperatur beträgt +30°C, wobei die Obergrenze der Vermehrungsfähigkeit bei +43°C liegt.

Die Gattung *Yersinia* wird in die Familie der *Enterobacteriaceae* eingeordnet (HEESEMANN, 1990). Neben mehreren apathogenen Yersinien zählen zu dieser Gattung heute folgende drei Arten, die als Krankheitserreger für Mensch und Tier von Bedeutung sind: *Y. pseudotuberculosis* als Erreger der Pseudotuberkulose bei

Mensch und Tier, *Y. pestis* als Erreger der Nagerpest und der Pest des Menschen, und *Y. enterocolitica* als Erreger einer pseudotuberkuloseähnlichen Erkrankung bei Tieren und einer enteralen Infektion des Menschen. Letztere haben als Krankheitserreger erst in den letzten 30 Jahren an Bedeutung gewonnen. Des weiteren unterscheidet man heute aufgrund genetischer Unterschiede die früher als *Y. enterocolitica*-like Bakterien bezeichnete Spezies: *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri* und *Y. ruckeri*. Diese acht genannten Spezies sind für den Menschen nicht pathogen. Die taxonomische Einordnung ist auch heute noch nicht abgeschlossen (NEUBAUER et al., 2000).

2.2.1 Biotyp

Da die Stämme, die unter der Speziesbezeichnung *Y. enterocolitica* geführt werden, in ihren biochemischen Eigenschaften differieren, wurden sie in verschiedene Biotypen unterteilt. Für die Biotypisierung kann nach einem Schema von WAUTERS et al. (1987) vorgegangen werden (Tabelle 1). Durch die darin ausgeführten Tests werden sechs Biotypen unterschieden: 1A, 1B, 2, 3, 4 und 5. Der ursprünglich einheitliche Biotyp 1 wurde nachträglich von Wauters mittels dieses modifizierten Biotypisierungsschema noch weiter unterteilt, da er sowohl apathogene als auch pathogene Varianten enthält (WAUTERS et al., 1987). Zum Biotyp 1A gehören verschiedene apathogene Stämme, die vor allem in der Umwelt und bei Mensch und Tier als Saprophyten, gegebenenfalls auch als Opportunisten vorkommen. Dem Biotyp 1B wurden humanpathogene Stämme zugeordnet, die vor allem in USA auftreten. Für die Differenzierung der Biotypen 1A und 1B ist der Nachweis von Pyrazinamidase, Salicin und Aeskulin ausschlaggebend. Bei pathogenen Isolaten fallen diese Reaktionen negativ aus. Die in Europa vorkommenden, für den Menschen pathogenen Stämme sind in der Regel den Biotypen 2, 3 oder 4 zuzuordnen. Die tierpathogenen Stämme, die bei Hasen, Ziegen und Chinchillas septische Erkrankungen hervorrufen, gehören stets zu den Biotypen 3 oder 5 (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990).

Tabelle 1: Biotypisierungsschema für *Y. enterocolitica* nach WAUTERS et al. (1987)

Test	Biovare					
	1A	1B	2	3	4	5
Lipase (Tween- Esterase)	+	+	-	-	-	-
Aeskulin	+	-	-	-	-	-
Salicin	+	-	-	-	-	-
Indol	+	+	(+)	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	-	d
Trehalose	+	+	+	+	+	-
Pyrazinamidase	+	-	-	-	-	-
β-Glucuronidase	+	-	-	-	-	-
Voges- Proskauer- Reaktion	+	+	+	+	+	(+)
Prolinpeptidase	d	-	-	-	-	-

Inkubation bei +28°C, 48 h

+ = positive Reaktion

- = negative Reaktion

(+) = schwach positive Reaktion

d = teilweise positive Reaktion

2.2.2 Serotyp

Die Einteilung von *Y. enterocolitica* in verschiedene Serotypen geschieht nach den Oberflächen- (O-), Geißel- (H-). Die Bestimmung von Kapsel- (K-) Antigenen hat heute keine diagnostische Bedeutung. Für *Y. enterocolitica* einschließlich der früher als "Y. enterocolitica- like" bezeichneten Arten (*Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovier*) wurden bis heute 60 O- Gruppen gefunden, wovon 28 auf *Y. enterocolitica* entfallen (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Während bestimmte O- Antigene bei verschiedenen Spezies vorkommen, sind die H- Antigene Spezies- spezifisch und können daher auch zur direkten Identifizierung der *Yersinia*- Arten herangezogen werden. Bislang wurden 18 H- Faktoren bei *Y. enterocolitica* definiert. Hier sind bestimmte Kombinationen von H- Antigenfaktoren signifikant für pathogene Serotypen und können bei der Unterscheidung pathogener und apathogener Stämme hilfreich sein. Nach Befunden von ALEKSIC und BOCKEMÜHL (1990) sind die pathogenen Serotypen O:3, O:9 und O:5,27 von *Y. enterocolitica* stets mit den H- Antigenen a,b; a,b,c; a,b,c,v; a,c; c oder b,c kombiniert. Der H- Antigenkomplex H: b,e,f,i kommt hingegen bei den fast ausschließlich in den USA auftretenden pathogenen Serovaren O:8, O:4,32; O:18,

O:20 und O:21 von *Y. enterocolitica* vor (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Der Nachweis bestimmter H- Antigene ist laut ALEKSIC und BOCKEMÜHL (1990) für humanpathogene Stämme spezifisch und kann diagnostisch verwendet werden.

In Europa gelten die Serotypen O:3, O:9 und O:5,27 in der Humanmedizin als bedeutsam, in Nordamerika die Serotypen O:3, O:8, O:13, O:20 und O:21. Der Serotyp O:3 konnte über längere Zeit nur in Europa nachgewiesen werden. Inzwischen wird er jedoch auch in Nordamerika gefunden, während O:8, der häufigste der nordamerikanischen Vertreter, in Europa bisher sehr selten isoliert werden konnte (N.N., 2000).

Der jeweiligen Serovarietät bzw. dem Biotypen werden auch Pathogenitätsmerkmale zugeordnet. So scheint der Serotyp O:8 im allgemeinen virulenter als die Serotypen O:3 oder O:9 (N.N., 2000). Bei einzelnen Tierarten wurden verschiedene Serotypen nachgewiesen: O:1 bei Chinchillas, O:2 bei Hasen und Ziegen und O:3 bei Affen, Hunde und Katzen. Beim Schwein können fast alle bekannten Serotypen nachgewiesen werden, darunter auch Serotyp 3 und 9, ohne dass die Tiere Krankheitserscheinungen zeigen (SELBITZ, 1992).

2.3 Pathogenität

Die Pathogenität von *Y. enterocolitica* hängt von verschiedenen Faktoren ab. Hierbei wird zwischen plasmidkodierten und chromosomal kodierten Virulenzfaktoren unterschieden.

2.3.1 Plasmidkodierte Virulenzfaktoren

Entscheidend für die Pathogenität von *Y. enterocolitica* ist das Vorhandensein eines sogenannten Virulenzplasmids (Episom) bestehend aus 70 Kilobasen. Dieses Plasmid, mit der Bezeichnung pYV (plasmid for *Yersinia* virulence), kodiert für zahlreiche Proteine. Deren Expression ist abhängig von der Temperatur und dem Calciumgehalt. Bei + 37°C und einem Calciumgehalt im Millimolarbereich (STRALEY et al., 1993) bzw. im calciumfreien Medium (HEESEMANN et al., 1984, 1986 und 1987) kommt es zu einer maximalen Entwicklung dieser Proteine. Bei Vorhandensein des pYV kann *Y. enterocolitica* nach dem Eindringen in das lymphatische Gewebe seines Wirtes nicht nur überleben, sondern sich dort auch

vermehren (CORNELIS et al., 1998). Plasmidfreie Yersinien hingegen werden im lymphatischen Gewebe eliminiert. Virulenzplasmide von pathogenen Yersinien zeigen auch bei verschiedenen Serotypen starke Ähnlichkeiten in ihren DNS-Sequenzen (HEESEMAN et al., 1983). Dies unterstreicht die Bedeutung des Plasmids für die Pathogenität von *Y. enterocolitica*.

Die bis heute entschlüsselten plasmidkodierten Polypeptide von *Y. enterocolitica* unterscheiden sich wie folgt: in das Membranprotein Yad A (*Yersinia* adhesin A) und die sezernierten Proteine, die sogenannten Yersinia outer proteins (Yop) (MICHIELS et al., 1990; CORNELIS et al., 1987). Wird das von BÖLIN et al. (1982) entdeckte Gen *yad A* ausgeschaltet, kommt es zu einem Verlust der Virulenz des Bakteriums. Das durch *yad A* kodierte Protein bildet Fibrillen auf der Oberfläche von *Y. enterocolitica*, die eine Bindung an den Bürstensaum der Darmzotten vermitteln (MANTLE et al., 1989; PAERREGAARD et al., 1991). Darüber hinaus bestehen noch weitere Eigenschaften von Yad A, die für die Virulenz eine entscheidende Rolle spielen (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Rolle von Yad A für die Virulenz von *Y. enterocolitica*

Eigenschaften von Yad A	Autor
Serumresistenz	HEESEMAN et al., 1983
Oberflächenhydrophobizität	LACHICA, ZINK, 1984
Autoagglutination	SKURNIK et al., 1984
Adhäsion zu epithelialen Zellen	HEESEMAN, GRÜTER, 1987
Expression von Fibrillen	KAPPERUD et al., 1987
Hämagglutination	KAPPERUD et al., 1987
Bindung an Bürstensaum	PAERREGAARD et al., 1991
Resistenz gegenüber polymorphkernigen Leukozyten	RUCKDESCHEL et al., 1996
Bindung an Neutrophile	RUCKDESCHEL et al., 1996
Bindung an Kollagene	EL TAHIR, SKURNIK, 2001

Der Schutz vor Zerstörung durch polymorphkernige Leukozyten ist für *Y. enterocolitica* eine der wichtigsten Eigenschaften von Yad A. Obwohl der Mechanismus noch nicht bekannt ist, nimmt man an, dass sich Yad A zunächst an die Eukaryontenzellen bindet. Dadurch können die sogenannten Yops gebildet werden, welche wiederum eine Phagozytose verhindern (RUCKDESCHEL et al., 1996).

Die auf dem pYV enthaltenen *yop* Gene kodieren für mindestens 14 Yop- Proteine (CHENG und SCHNEEWIND, 1999). Diese sezernierten Proteine ermöglichen es *Y. enterocolitica*, der nicht spezifischen Immunabwehr zu entgehen (CORNELIS, 1998). Die Yops schützen die Yersinien, indem sie die Signalwege der Zielzellen, z.B. der Makrophagen und anderer Immunzellen, stören. So verhindern sie die Phagozytose, Antigenerkennung und letztendlich induzieren sie die Apoptose der Makrophagen (CORNELIS, 1998).

2.3.2 Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren

Neben plasmidkodierten Virulenzfaktoren spielen auch chromosomal kodierte Eigenschaften eine wichtige Rolle im Bezug auf die Pathogenität des Bakteriums. Die wichtigsten werden hier kurz erläutert.

Zwei auf dem Chromosom liegende Gene sind das **Invasionsgen** (*inv*) und das **Attachment- invasive locus- Gen** (*ail*). Das *inv* kodiert für ein äußeres Membranprotein, das von allen enteropathogenen Yersinien gebildet wird. Das Invasin (Inv) ist ein 103 kDa großes Protein (ISBERG, 1989). Dieses Protein scheint das Eindringen in die epithelialen Zellen des Ileums in der anfänglichen Phase der Infektion zu fördern (PEPE et al., 1995). Das zweite Gen, *ail*, kodiert für das Oberflächenprotein Ail, welches für die Zelladhärenz und auch Invasivität eine entscheidende Rolle spielt. Die Tatsache, dass die Pathogenität mit zunehmender Invasion, vermittelt durch Ail, steigt und dass das *ail*- Gen nur in pathogenen Yersinien vorkommt, lassen eine wichtige Rolle des Ail bei der Virulenz vermuten. Genaue Wirkungsmechanismen sind hier jedoch noch nicht bekannt (CARNIEL, 1995).

Auch die Biosynthese der **Lipopolysaccharide** (LPS), das Hauptmerkmal der äußeren Membranoberfläche bei gram- negativen Bakterien, ist bei den Yersinien

auf den Chromosomen kodiert. Die Lipopolysaccharide setzen sich aus drei Teilen zusammen: Lipid A, Oligosaccharid Kernstück und O-Seitenkette (O-Antigen). Jedem dieser drei Teile werden bestimmte Eigenschaften zur Überwindung des wirtseigenen Abwehrsystems zugesprochen, dies bedarf jedoch noch genauerer Klärung (SKURNIK u. ZHANG, 1996b; WAUTERS et al., 1991; SKURNIK et al., 1996a). In einem Bericht des Robert Koch Institutes aus dem Jahr 2000 wird beschrieben, dass die Struktur der Lipopolysaccharide in Abhängigkeit von der Temperatur unterschiedlich ausfällt. Bei +37°C werden raue, kurzkettige Formen gebildet, die in der Zellmembran integriert bleiben. Bei $\leq +25^\circ\text{C}$ werden hingegen glatte, langkettige Formen gebildet, die sich von der Membran ablösen und als freies Endotoxin wirksam werden können. Laut einer mündlichen Mitteilung von HEESEMANN kann es nach einer Vermehrung der Keime in Erythrozytenkonzentrat, bei einer niedrigen Aufbewahrungstemperatur von ca. +4°C, zu hohen Konzentrationen an freien langkettigen LPS kommen. Diese lösen dann wiederum beim Transfusionsempfänger das volle Bild eines akuten, lebensbedrohlichen Endotoxinschocks aus (N. N., 2000).

Y. enterocolitica gehört zu den ureasepositiven Bakterien, d.h. diese Bakterien produzieren das Enzym **Urease**. Dieses Protein ist durch den Urease-Genkomplex (*ure*) auf den Chromosomen des Bakteriums kodiert (DE KONING-WARD et al., 1994). Das Enzym Urease katalysiert die Hydrolyse von Harnstoff zu Ammoniak und Carbamat. Ein weiteres Molekül Ammoniak und Carbonsäure entsteht durch eine erneute spontane Spaltung aus Harnstoff. Der hierdurch erreichte Anstieg des pH-Wertes ist dem Erreger besonders bei der Magenpassage, aber auch in anderen sauren Umgebungen von Vorteil (DE KONING-WARD und ROBINS-BROWNE, 1995). GRIPPENBERG-LERCHE et al. (2000) berichten von einer deutlichen Abnahme der Virulenz nach oraler Infektion mit urease-negativen *Y. enterocolitica*-Mutanten. Dies verdeutlicht die entscheidende Rolle der Urease während der Initialphase der bakteriellen Infektion, in der der Erreger den Magen passiert.

Welche Auswirkungen die Produktion des hitzestabilen **Enterotoxins** (Yst) auf die Pathogenität von *Y. enterocolitica* besitzt, ist noch nicht genau geklärt. Bekannt ist jedoch, dass auch die Fähigkeit zur Enterotoxinproduktion bei *Y. enterocolitica*

und *Y. enterocolitica*-like Bakterien chromosomal verankert ist (DELOR et al., 1990). Über eine mögliche Beteiligung von Yst an der Pathogenität einer Yersinien-Enteritis wird diskutiert. Da dieses hitzestabile Enterotoxin von *Y. enterocolitica* bei einer Kultivierungstemperatur von +20- 30°C gebildet wird, kann man davon ausgehen, dass dieses Toxin nicht im Menschen oder Tier als Wirt produziert wird (PAI et al., 1978; KAPPERUD, 1982; KAPPERUD und BERGAN, 1984; SCHIEMANN, 1989). Intoxikationen könnten jedoch durch präformierte Enterotoxine in Lebensmitteln ausgelöst werden (KAPPERUD, 1982; KAPPERUD und LANGELAND, 1981). Diese Vermutung basiert auf der Tatsache, dass es für das Toxin möglich ist sowohl die Magensaftbarriere, als auch Verarbeitungsprozesse, insbesondere erhöhte Temperaturen bei der Herstellung von Lebensmitteln, zu überstehen, ohne seine Aktivität zu verlieren (BOYCE et al., 1979).

Viele Bakterien verfügen über spezifische Mechanismen zur **Aufnahme von Eisen** aus ihrer Umgebung. Die Fähigkeit von verschiedenen Serotypen von *Y. enterocolitica*, die für ihre Vermehrung notwendigen Eisenionen in unterschiedlicher Weise aufzunehmen, ist ausführlich untersucht worden (N. N., 2000). Um das im Blutserum nur in sehr geringer Menge vorhandene freie Eisen (10^{-15} M) nutzen zu können, bedarf es eines spezifischen Eisenaufnahmesystems, das offensichtlich nur mausletale Stämme besitzen. HEESEMANN (1990) stellte fest, dass letztere, im Gegensatz zu den nicht mausletalen Stämmen, Eisenkomplexe (Siderophore) sezernieren. Er konnte darüber hinaus einen membranständigen Rezeptor identifizieren, der die eisenbeladenen Siderophore aufnimmt (HEESEMANN, 1990). Nicht alle Yersinienstämme besitzen sowohl Siderophore als auch Siderophorenrezeptoren. Während beispielsweise Angehörige der Serovare O:8 und O:21 mit beidem ausgestattet sind, besitzen Angehörige der Serovare O:3, O:9, O:5,27, O:1,2,3 und O:20 nur die Rezeptoren. Durch Zugabe von Desferrioxamin, einem von Streptomyceten gebildeten Siderophorin, ließ sich in infizierten Mäusen das Wachstum von Keimen des Serovars O:8 nur geringfügig, das der Serovare O:3 hingegen um das 10^5 -fache steigern. Hierzu passend wurde die klinische Beobachtung gemacht, dass Patienten unter Therapie mit Desferrioxamin, das zur Ausschwemmung von pathologisch erhöhtem Eisen im Blut eingesetzt wird,

vermehrt an schwer verlaufenden Infektionen mit *Y. enterocolitica* Serovar O:3, erkranken (N.N., 2000). Mutanten mit einem Defekt im Siderophorenaufnahmesystem sind weniger virulent als der Mutterstamm. Damit gehört die Siderophor- Determinante zu den wenigen, bisher bewiesenen chromosomalen Pathogenitätsfaktoren von Yersinien (HEESEMANN, 1990).

2.4 Infektionsweg

An beispielsweise einem Mausinfektionsmodell wurde der Ablauf einer Yersiniose eingehend untersucht. Sowohl plasmidhaltige als auch plasmidfreie Yersinien dringen nach oraler Applikation vorwiegend in die Peyerschen Platten des Dünndarms ein. Avirulente, also plasmidfreie Yersinien werden dort eliminiert, plasmidhaltige dagegen überleben und können sich vermehren. In der zweiten Phase disseminieren sie innerhalb weniger Stunden in die inneren Organe wie Milz, Leber, Niere, Lymphknoten. Die dritte Phase zeigt unterschiedliche Verlaufsformen, je nach Serovarietät. Bei den Serovaren O:8, O:13, O:20 und O:21 vermehrt sich der Erreger in den Organen rapide und bildet Abszesse. Nach 8- 14 Tagen sterben die infizierten Mäuse. Die europäischen *Y. enterocolitica*-Stämme (O:3, O:9 und O:5,27) hingegen zeigen in der dritten Phase ein Abnehmen der Keimzahl, in deren Folge die Yersiniose ausheilt. Wurden die Versuchstiere jedoch mit Desferal® (Eisenkomplexon) oder Eisen- Dextran vorbehandelt, verläuft eine Infektion mit den üblicherweise nicht mausletalen Stämmen ebenfalls letal (HEESEMANN, 1990).

Hier wird noch einmal deutlich gezeigt, dass bei +37°C die chromosomal kodierten Faktoren alleine keine entscheidenden Eigenschaften darstellen, die dem Säugetierorganismus Schaden zufügen könnten. Es scheint vielmehr, dass die chromosomalen Virulenzfaktoren eine unterstützende Rolle in der Initialphase der Infektion spielen. Die durch das Plasmid kodierten Virulenzfaktoren dagegen sind für das Bakterium essentiell, um z. B. in den Peyerschen Platten überleben und eine Krankheit auslösen zu können (HEESEMANN, 1990).

2.5 Vorkommen bei Tieren

2.5.1 Schwein

Von klinisch gesunden Schweinen wurden häufig pathogene *Y. enterocolitica* isoliert (SCHIEMANN, 1989; BOTTONE, 1997). Die Isolationsrate aus dem Rachen ist weit höher als jene aus dem Kot (BOTTONE, 1997). Oft sind die Tonsillen von mehr als der Hälfte der Proben kontaminiert (SCHIEMANN, 1989). Im Jahr 2000 wurden in Süddeutschland an einem Schlachthof 50 Schlachtschweine untersucht, hierbei konnten in 60% der Tonsillen und 10 % der Kotproben *Y. enterocolitica* 4/O:3 nachgewiesen werden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2000 a). Es ist jedoch zu beachten, dass die Prävalenz von *Y. enterocolitica* innerhalb der verschiedenen Herden variiert (SCHIEMANN, 1989).

2.5.2 Sonstige relevanten Tierarten

Eine Isolierung von *Y. enterocolitica*- Stämme ist bei vielen anderen Säugetieren ebenfalls möglich, jedoch wurden diese mit wenigen Ausnahmen nicht als pathogen identifiziert. Es scheint, als ob die anderen Nutztiere kein wichtiges Reservoir für pathogene *Y. enterocolitica* darstellt (SCHIEMANN, 1989; ROBINS-BROWNE, 1997). BUCHER et al. (2002a) untersuchten am Münchener Schlachthof 100 Tonsillen und Kotproben bei Kälbern und Bullen, wobei keine pathogenen Yersinien gefunden wurden. In einer weiteren Studie wurden in Köpfen und Kot von untersuchten Puten ebenfalls keine pathogenen *Y. enterocolitica* nachgewiesen (BUCHER et al., 2002b). Bei Hunden und Katzen entdeckte man, dass sie vereinzelt pathogene *Y. enterocolitica*, besonders Bioserotyp 4/O:3, mit dem Kot ausscheiden (SCHIEMANN, 1989; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001b). Von Vögeln, Fröschen, Fliegen, Flöhen, Krebsen und Austern wurden dagegen meistens apathogene Arten isoliert (ROBINS-BROWNE, 1997).

2.6 Übertragungsmöglichkeiten von *Y. enterocolitica*

Die Infektion von Mensch und Tier erfolgt überwiegend oral- alimentär. Dafür sprechen sowohl der Erregernachweis in Tonsillen und Kot latent infizierter Tiere, wie auch der Ort des Primäreffektes beim Menschen, die Darmschleimhaut

(ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Bei Menschen treten Infektionen mit *Y. enterocolitica* scheinbar häufiger auf als beim Tier (SELBITZ, 1992). Dennoch sind Tiere, soweit sie Träger pathogener Stämme sind, als Ansteckungsquelle für den Menschen anzusehen.

Als Infektionsquelle für Erkrankungen des Menschen wird v.a. der Verzehr von kontaminiertem Schweinefleisch bzw. -zungen und -innereien (TAUXE et al., 1987; FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 2001a), aber auch von Milch- und Sojaprodukten, sowie Quellwasser aufgrund epidemiologischer Studien vermutet (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Eine direkte Übertragung von Mensch- zu- Mensch ist möglich (SCHIEMANN, 1989). LEE et al. (1990) berichteten über *Y. enterocolitica* O:3 Erkrankungen bei Kleinkindern, die Infektionen durch erkrankte Pflegepersonen ausgesetzt waren. Eine indirekte Übertragung von Mensch- zu- Mensch kann über infizierte Blutkonserven stattfinden; die daraus entstehende Yersinien- Sepsis verläuft jedoch weitaus gefährlicher als die alimentäre Form (ABER, 1990; JACOBS et al., 1989). Nach einer 1997 in den USA durchgeführten Risikobewertung, kommen Yersinien- assoziierte Transfusionszwischenfälle mit einer Häufigkeit von etwa 1:500 000 übertragener Erythrozytenkonzentrate vor (N.N., 2000). Sowohl hier als auch in Lebensmitteln spielt die Psychrotoleranz bzw. das Wachstum des Bakteriums bei Temperaturen bis 0°C eine entscheidende Rolle (NESBAKKEN, 1992).

Zwischen Tieren erfolgt die Übertragung bei gemeinsamer Aufstallung wahrscheinlich überwiegend durch erregerehaltigen Kot und über die damit kontaminierte Umwelt. Bei Karnivoren ist daneben eine Infektion über infizierte Beute- und Futtertiere denkbar (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Rohes Schweinefleisch hat sich als eine wichtige Quelle für *Y. enterocolitica* Infektionen bei Hunden und Katzen herausgestellt (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001b). Erkrankungen bei Tieren treten selten auf. Dennoch kann der Erreger relativ häufig im Darminhalt nachgewiesen werden, obwohl die betroffenen Tiere keine klinischen Symptome zeigen (KNAPP und THAL, 1988). Bei Hunden, Katzen und Ratten wurden Serotypen O:3 und O:9 im Kot nachgewiesen. Dadurch ergibt sich eine weitere mögliche Infektionsquelle für solche Menschen, die einen relativ engen Kontakt zu ihren Haustieren haben. Gesicherte Ergebnisse fehlen hier jedoch noch.

2.7 Klinische Manifestation

Die Krankheit äußert sich beim Menschen vor allem als Enteritis oder Enterocolitis. Weiterhin kommen Lymphadenitis mesenterialis oder terminale Ileitis vor. Der seltene septikämische Verlauf wird vor allem bei Patienten mit verminderter Immunabwehr beschrieben. Extraabdominale Symptome werden im Einzelfall, immunpathologische Folgekrankheiten wie Arthritis, Arthralgien, Erythema nodosum und andere Hauterscheinungen dagegen häufig beobachtet. Diese treten meist erst ein bis drei Wochen nach Beginn der abdominalen Krankheitsphase auf (HEESEMANN, 1990). Um eine Yersiniose diagnostizieren zu können, müssen die Erreger aus Stuhlkulturen, Darmbiopsien, mesenterialen Lymphknoten (bei operativen Eingriffen), Leberbiopsien (bei Hinweis auf Leberabszesse), Blutkulturen (septisches Krankheitsbild) und ggf. aus Rachentonsillenabstrichen angezüchtet werden. Die Ausscheidungsdauer von *Y. enterocolitica* beträgt 2- 6 Wochen (HEESEMANN und KARCH, 1995). Es kann sowohl nach akuten als auch nach latenten Verlaufsformen der Yersiniose zu sekundären, immunpathologischen Komplikationen wie z.B. reaktiver Arthritis kommen (KIESEWALTER, 1992). Bei diesen Folgeerkrankungen der Yersiniose lässt sich der Erreger nur noch selten aus Stuhlkulturen anzüchten (10- 20 %). Hier können serologische Methoden die Verdachtsdiagnose erhärten (HEESEMANN und KARCH, 1995). Beispielsweise durch eine Widal-Reaktion, eine Agglutination mit bekannten Antigenen (O:3, O:9 und O:5,27), können in einem solchen Fall Antikörper im Patientenserum nachgewiesen werden (PSCHYREMBEL, 1998; HEESEMANN und KARCH, 1995).

2.8 *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln

Y. enterocolitica wird als ein wichtiger Krankheitserreger eingeschätzt, der eine Lebensmittelinfektion hervorrufen kann. In vielen Ländern (z.B. Niederlande, Belgien, Bundesrepublik Deutschland, Kanada und Australien) stehen Infektionen durch *Y. enterocolitica* zahlenmäßig nach Salmonellen und *Campylobacter spp.* an dritter Stelle der lebensmittelbedingten Enteritiden (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990; N.N., 2000). Die Isolation pathogener Vertreter aus verschiedenen Lebensmittelprodukten ist trotz der zahlreichen Studien, in denen

versucht wurde, *Y. enterocolitica* in verschiedenen Nahrungsmitteln nachzuweisen, selten möglich (KAPPERUD, 1991).

2.8.1 *Y. enterocolitica* in Produkten vom Schwein

Rohe Schweinefleischprodukte wurden aufgrund des Zusammenhangs zwischen *Y. enterocolitica* 4/O:3 und dessen Vorkommen bei Schweinen weitreichend untersucht. In vielen Studien wurden *Y. enterocolitica*- Stämme in rohen Schweinefleischprodukten gefunden (Tabelle 3). Dennoch war die Nachweisrate von pathogenen Stämmen in den untersuchten Proben, abgesehen von Schweinezungen und – innereien, niedrig.

Tabelle 3: *Y. enterocolitica* in rohen Produkten vom Schwein

Probentyp	Anzahl der Proben	Anzahl der <i>Y. enterocolitica</i>	Prozentualer Anteil	Anzahl der pathogenen <i>Y. enterocolitica</i>	Prozentualer Anteil	Quelle
Zunge	40	8	20%	8	20%	DE BOER und NOUWS, 1991
Zunge	52	34	65%	14	27%	KARIB und SEEGER, 1994
Zunge	99	NU	NU	79	80%	FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001C
Zunge	20	NU	NU	15	75%	BUCHER, 2001
Innereien	34	NU	NU	17	50%	FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2000B
Innereien	100	NU	NU	46	46%	BUCHER, 2001
Hackfleisch	12	6	50%	1	8%	NESBAKKEN et al., 1985
Hackfleisch	400	50	13%	4	1%	DE BOER und NOUWS, 1991
Hackfleisch	195	43	22%	0	0%	STEFANOV und BOZHKOVA, 1998
Hackfleisch	255	NU	NU	4	2%	FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 1999
Schweinefleisch	91	KA	KA.	2	2%	SCHIEMANN, 1980
Schweinefleisch	110	35	32%	0	0%	NESBAKKEN et al., 1985

Probentyp	Anzahl der Proben	Anzahl der <i>Y. enterocolitica</i>	Prozentualer Anteil	Anzahl der pathogenen <i>Y. enterocolitica</i>	Prozentualer Anteil	Quelle
Schweinefleisch	267	KA	KA	6	2%	CHRISTENSEN, 1987
Schweinefleisch	50	6	12%	0	0%	IBRAHIM und REA, 1991
Schweinefleisch	48	11	23%	2	4%	KARIB und SEEGER, 1994
Schweinefleisch	263	1	0.3%	0	0%	DE BOER, 1995
Schweinefleisch	22	0	0%	0	0%	DURISIN et al., 1997
Schweinefleisch	1278	NU	NU	37	3%	FUKUSHIMA et al., 1997
Schweinefleisch	300	NU	NU	6	2%	JOHANNESSEN et al., 2000
Mettwurst	150	2	1%	0	0%	VELAZQUEZ et al., 1993
Mettwurst	51	0	0	0	0%	NORTJE et al., 1999

NU, nicht untersucht.

KA, keine Angaben

Über das Vorkommen von *Y. enterocolitica* in hitzebehandelten Schweinefleischprodukten liegen nur wenige Studien vor (**Tabelle 4**). Bisher wurden keine pathogenen Stämme aus hitzebehandelten Produkten isoliert. Dennoch hat man apathogene *Y. enterocolitica* Stämme nachgewiesen. Dies zeigt, dass bei mangelhafter Hygiene eine Kreuzkontamination von rohen zu hitzebehandelten Produkten möglich ist.

Tabelle 4: *Y. enterocolitica* in erhitzten Schweinefleischprodukten

	Anzahl der Proben	Anzahl der <i>Y. enterocolitica</i>	Prozentualer Anteil	Anzahl der pathogenen <i>Y. enterocolitica</i>	Prozentualer Anteil	Quelle
Schweinefleisch	25	2	8%	0	0%	NESBAKKEN et al., 1985
Schinken	100	1	1%	0	0%	VELAZQUEZ et al., 1993
Schinken	51	2	2%	0	0%	NORTJE et al., 1999
Wurst	200	2	1%	0	0%	VELAZQUEZ et al., 1993
Wurst	51	1	1%	0	0%	NORTJE et al., 1999

2.8.2 *Y. enterocolitica* in anderen Lebensmitteln

Rindfleisch, Geflügel und Fischprodukte wurden auch weitreichend auf *Y. enterocolitica* untersucht (**Tabelle 5**). In diesen Studien wurden häufig nicht-pathogene *Y. enterocolitica* Stämme isoliert. Bei einigen Rind- und Geflügelfleischproben erfolgte der Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämmen (LOGUE et al., 1996; FUKUSHIMA et al., 1997). In diesen Fällen haben wahrscheinlich, ausgehend von rohen Schweinefleischprodukten, Kreuzkontaminationen während der Verarbeitung, Verpackung oder Handhabung stattgefunden, da bis jetzt pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 Arten nicht bei Rindern oder Geflügel nachweisbar sind.

Tabelle 5 : *Y. enterocolitica* in rohem Fleisch und weiteren rohen Lebensmitteln

Probentyp	Anzahl der Proben	Anzahl der nachgewiesenen <i>Y. enterocolitica</i>	Prozentualer Anteil	Anzahl der nachgewiesenen pathogenen <i>Y. enterocolitica</i>	Quelle
Rind	102	27	26%	0	DE BOER, 1995
Rind	51	8	16%	0	NORTJE et al., 1999
Schaf	50	5	10%	0	IBRAHIM und REA, 1991
Ziege	25	0	0%	0	MUNDI et al., 1999
Pferd	204	58	28%	0	CATTABIANI et al., 1995
Geflügel (Huhn)	60	16	27%	0	COX et al., 1989
Geflügel (Huhn)	200	11	6%	0	KHALAFALLA, 1990
Geflügel (Ente)	200	7	4%	0	KHALAFALLA, 1990
Geflügel (Pute)	200	3	2%	0	KHALAFALLA, 1990
Geflügel (Huhn)	390	26	7%	0	DE BOER, 1995
Geflügel (Pute)	108	0	0	0	DE BOER, 1995
Geflügel (Huhn)	51	8	16%	0	NORTJE et al., 1999
Geflügel (Huhn)	43	3	3%	0	FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001b
Fisch	40	0	0%	0	PULLELA et al., 1998
Fisch	300	11	4%	0	VELAZQUEZ et al., 1996
Fisch	200	1	0.5%	0	FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001b
Austern	45	6	13%	0	PEIXOTTO et al., 1979
Garnelen	50	2	4%	0	PEIXOTTO et al., 1979
Krebs	58	12	21%	0	PEIXOTTO et al., 1979
Gemüse	233	103	44%	0	DE BOER, 1995
Gemüse	101	1	1%	0	FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001b

Sehr ausgedehnt wurde Milch untersucht, da Ausbrüche von Yersiniosen mit dem Verzehr dieser kontaminierten Produkte assoziiert wurden (BOTTONNE, 1997). In den meisten Studien war die Prävalenz von *Y. enterocolitica* in Rohmilch hoch, allerdings wurde nicht von pathogenen Stämmen berichtet (**Tabelle 6**). SAUER (1996) untersuchte 464 Rohmilchproben in Bayern und fand lediglich apathogene Arten. Auch in Dänemark wurden bei einer Untersuchung von 494 Rohmilchproben keine pathogenen *Y. enterocolitica* nachgewiesen (CHRISTENSEN, 1987).

Tabelle 6: *Y. enterocolitica* in Milch und Milchprodukten

Probentyp	Anzahl der Proben	Anzahl der nachgewiesenen <i>Y. enterocolitica</i>	Prozentualer Anteil	Anzahl der nachgewiesenen pathogenen <i>Y. enterocolitica</i>	Quelle
Rohmilch	75	61	81%	0	VIDON und DELMAS, 1981
Rohmilch	100	12	12%	0	MOUSTAFA et al., 1983
Rohmilch	374	12	3%	0	FUKUSHIMA et al., 1984
Rohmilch	170	17	10%	0	WALKER und GILMOUR, 1986b
Rohmilch	120	9	8%	0	SAAD und MOUSTAFA, 1989
Rohmilch	150	17	11%	0	IBRAHIM und RAE, 1991
Rohmilch	589	131	22%	0	REA et al., 1992
Rohmilch	292	44	15%	0	ROHRBACH et al., 1992
Rohmilch	464	57	12%	0	SAUER, 1996
Rohmilch	200	5	3%	0	JAMSHIDIAN und BABAKHANI, 1999
Pasteurisierte Milch	100	1	1%	0	MOUSTAFA et al., 1983
Pasteurisierte Milch	150	10	7%	0	WALKER und GILMOUR, 1986b
Pasteurisierte Milch	50	0	0%	0	IBRAHIM und RAE, 1991
Pasteurisierte Milch	300	3	1%	0	JAMSHIDIAN und BABAKHANI, 1999
Rohmilch	110	36	33%	0	RUCHI-KUSHAL et al., 2001
Eiscreme	67	6	9%	0	MOUSTAFA, 1990

Auch Gemüse wurde mit Ausbrüchen von Yersiniose in Zusammenhang gebracht (BOTTONNE, 1997), wobei bisher ebenfalls nur apathogene *Y. enterocolitica* Arten nachgewiesen wurden (DE BOER, 1995; SZABO et al., 2000; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001c). Diese Studien deuten darauf hin, dass Milch und Gemüse keine primäre Quellen für pathogene *Y. enterocolitica* sind. Dennoch können sie bei Ausbrüchen als Transportmittel nach einer Kreuzkontamination dienen.

2.9 Wachstumsbedingende Faktoren in Lebensmitteln

Y. enterocolitica ist ein psychrotropes Bakterium, welches in der Lage ist, sich bei niedrigen Temperaturen zu vermehren; daher verhindert die Lagerung im Kühlschrank nicht einen Anstieg der Keimzahl und eine mögliche, damit verbundene lebensmittelbedingte Erkrankung. *Y. enterocolitica* kann in gefrorenen Lebensmitteln ausgedehnte Perioden überleben, selbst nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen (ROBINS-BROWNE, 1997). Dieses Bakterium ist jedoch empfindlich gegen Hitze und wird durch Standardpasteurisation zerstört (SCHIEMANN, 1989). *Y. enterocolitica* kann durch Ionisierung und UV-Strahlung inaktiviert werden. Auch Natriumnitrat und Nitrit, die Nahrungsmitteln zugegeben werden, hemmen das Wachstum der Bakterien. *Y. enterocolitica* kann hingegen bei Kochsalzkonzentrationen bis zu 5% bestehen (ROBINS-BROWNE, 1997). Als fakultativ anaerober Keim kann *Y. enterocolitica* in vakuumverpackten Produkten wachsen. Alkalische Bedingungen kann dieses Bakterium besser überstehen als andere gramnegative Bakterien (AULISIO et al., 1980). Jedoch, nachdem wenige Nahrungsmittel einen alkalischen pH haben, ist diese hohe pH-Toleranz für die Lebensmittelproduktion relativ unwichtig.

2.10 Nachweisverfahren

2.10.1 Nachweis aus Lebensmittelproben

Das Schema zur Isolierung und Identifizierung von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln ist auf dem Prinzip der *Enterobacteriaceae*-Diagnostik aufgebaut. Aufgrund des qualitativen Nachweises beginnt dies mit einer Anreicherung des Erregers. Hierzu wird ein Teil des Probenmaterials in ein oder mehrere Nährmedien gegeben. Danach erfolgt die Isolation mittels eines Selektivagars mit anschließender Anzucht von Reinkulturen verdächtiger Kolonien auf einem Nähragar (ISO, 1993). Der Erregerisolierung müssen immer eine Serotypisierung, Biotypisierung und der Nachweis von Pathogenitätsfaktoren folgen, da neben den pathogenen auch zahlreiche apathogene Yersinien in vielen Proben nachgewiesen werden können.

Es existieren derzeit in Europa zwei standardisierte Methoden. Eine Methode ist in der ISO/DIS 10273 veröffentlicht (ISO, 1993). Ein wesentlicher Aspekt dieser

Methode ist die Verwendung der Anreicherung mit Irgasan- Tiacarcillin-Kaliumchlorat- Medium (ITC). Die ISO/DIS 10273 findet in den meisten Ländern Europas Anwendung. Eine weitere Referenzmethode für den Nachweis von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln ist die Methode des Nordischen Komitees für Lebensmitteluntersuchung, NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS (NCFA, 1996). Der entscheidende Unterschied zur ISO/DIS 10273 besteht in der Verwendung des modifizierten Rappaport- Bouillon (MRB) an Stelle von ITC. Dabei wird eine 3-Stufen-Methode angewendet, die aus einer Kombination von Kälteanreicherung, Anreicherung in einem wenig selektiven Medium und Anreicherung in einem stark selektiven Medium (MRB) besteht (NCFA, 1996).

2.10.2 Nachweis aus anderen Proben

Handelt es sich bei dem Untersuchungsmaterial um extraintestinale Proben ohne oder mit geringgradiger Begleitflora, wie Blut, Lymphknoten, Punktate oder Eiter, können nichtselektive Isolierungs- und Anreicherungsverfahren angewandt werden. Bei Stuhlproben hingegen werden Selektivnährböden, wie MacConkey-Agar, Cefsulidin- Irgasan- Novobiocin- Agar (CIN) oder Salmonella- Shigella- Agar (SS) empfohlen. Eine Direktkultur reicht bei Enteritiserkrankungen in der Regel aus, bei Rekonvaleszenten und symptomlosen Ausscheidern hingegen ist ein flüssiges Anreicherungsverfahren erforderlich. Bei stark kontaminierten Untersuchungsmaterialien vom Tier, aus Lebensmitteln oder der Umwelt sind in der Regel spezifische Anreicherungsverfahren notwendig (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990).

2.10.3 Anreicherungsmedien

Grundsätzlich kann man nicht selektive, wenig selektive und selektive Nährmedien unterscheiden. Diese werden zur Untersuchung von Lebensmitteln meist kombiniert eingesetzt. Zur Voranreicherung werden nicht oder wenig selektive Medien und in einer anschließenden Anreicherung selektive Nährmedien verwendet (**Tabelle 7**).

Die Caseinpepton- Sojamehlpepton- Bouillon (CASO) beispielsweise ist hemmstoff- und indikatorfrei und so für ein breites Anwendungsspektrum vorgesehen. Aufgrund der reichhaltigen Nährgrundlage ist sie auch zur Züchtung

anspruchsvoller Mikroorganismen geeignet. Auch die Brain- Hear- Bouillon (BHB) und die phosphatgepufferte (buffered) Salzlösung (PBS) eignen sich zur Züchtung verschiedener anspruchsvoller, pathogener Mikroorganismen. Diese drei zählen zu den nicht selektiv wirkenden Nährmedien.

Wenig selektiv wirken die phosphatgepufferte Salzlösung mit Sorbitol und Gallensalzen und die Hefeextrakt- Bengalrot- Bouillon.

Den selektiven Anreicherungsmedien für *Y. enterocolitica* werden beispielsweise β - Lactam- Antibiotika (z.B. Ampicillin) zugesetzt, damit die Begleitflora gehemmt wird; während *Y. enterocolitica* dagegen eine Resistenz besitzt (KERBER, 1997). Häufig genannte und benutzte Selektivnährmedien für *Y. enterocolitica* sind Galle- Oxalat- Sorbose- Bouillon, Selenitbouillon, modifiziertes Rappaport-Medium. WAUTERS (1973) modifizierte das für die Salmonellen-Isolierung verwendete Rappaport-Medium und setzte es für die Anreicherung von *Y. enterocolitica* bei +25°C ein. Dieses modifizierte Rappaport-Medium enthält mehr $MgCl_2$ und weniger Malachitgrün als die ursprüngliche Rappaport-Bouillon. Obwohl die Anwendung dieses Mediums verschiedene *Yersinia*- Stämme, insbesondere die pathogenen Serotypen O:8 und O:5,27, im Wachstum hemmt, wurde es mit Erfolg für den Nachweis von *Y. enterocolitica* in Schweinefleischprodukten und anderen Lebensmitteln eingesetzt (SCHIEMANN, 1979 und 1982).

WAUTERS et al. (1988) entwickelten das modifizierte Rappaport-Medium weiter, indem sie zusätzlich Irgasan, Ticarcillin und Natrium-Chlorat zusetzten. Dadurch wurde eine gute Hemmwirkung auf viele *Enterobacteriaceae* erreicht. Dieses neue ITC-Medium erwies sich als das beste Anreicherungsmedium, um *Y. enterocolitica* Serogruppe O:3 nachzuweisen (WAUTERS et al., 1988).

2.10.4 Anreicherungsverfahren

Da *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln meist nur in geringer Anzahl und eventuell begleitet von anderen Keimen vorkommt, wählt man verschiedene Anreicherungsverfahren, um die Begleitkeime zu unterdrücken und auf diese Weise die im Probenmaterial eventuell vorhandenen Yersinien isolieren zu können (AULISIO et al., 1980; SCHIEMANN, 1982).

Neben der selektiven Anzucht mit einer dreiwöchigen Kälteanreicherung bei +4°C wurden weitere Methoden der Anreicherung mit Bebrütungstemperatur zwischen +22 und +37°C entwickelt (**Tabelle 7**).

Tabelle 7: Allgemein gebräuchliche Isolationsmethoden für *Y. enterocolitica* aus Lebensmittelproben

Vor-anreicherung	Selektiv-anreicherung	Selektivagar	Sero-typen	Literatur
PBS/PBSSB: +25°C, 1-3d		CIN: +30°C, 24h	Alle	DOYLE, HUGDAHL, 1983; ISO, 1993
	SEL: +22°C, 3d	MAC: +25°C, 48h	O:3;O:8	LEE et al., 1980
PBSSB: +4°C, 8d	MRB: +22°C, 4d	CIN: +30°C, 24h	O:3,O:9	SCHIEMANN, 1982; NCFA, 1996
YER: +4°C, 9d	BOS: +22°C, 5d	CIN: +30°C, 24h	O:3;O:8	SCHIEMANN, 1982
TSB: +22°C, 1d	BOS: +22°C, 7d	CIN: +30°C, 24h	O:3;O:8	SCHIEMANN, 1983a
	ITC: +25°C, 2d	SSDC: +30°C, 24h	O:3	WAUTERS et al., 1988 ; ISO, 1993

PBS, phosphate-buffer saline broth (Phosphatgepufferte Salzlösung)

TSB, tryptic soya broth (Trypton-Soja- Bouillon)

PBSSB, phosphate-buffer saline broth with sorbitol and bile salts (Phosphatgepufferte Salzlösung mit Sorbitol und Gallensalzen)

YER, yeast extract-rosebengal broth (Hefeextrakt-Bengalrot-Bouillon)

SEL, selenite broth (Selenit-Bouillon)

MRB, modified Rappaport broth (modifiziertes Rappaport-Medium)

BOS, bile-oxalate-sorbose broth (Galle-Oxalat-Sorbose-Medium)

MAC, MacConkey agar plate (MacConkey Agar)

SSDC, salmonella-shigella-sodium deoxycholate-calcium chloride agar plate (Salmonella- Shigella- Agar)

ITC, irgasan-ticarcillin-potassium chlorate broth (Irgasan- Ticarcillin- Natriumchlorat- Bouillon)

CIN, Cefsulodin-irgasan-novobiocin agar plate (Cefsulodin- Irgasan- Novobiocin- Agar)

2.10.4.1 Anreicherung bei Zimmertemperatur

Es wurden verschiedene Medien entwickelt, die auch bei höherer Inkubationstemperatur und damit auch bei einer kürzeren Inkubationsdauer ausreichend selektiv sind, um eine akzeptable Wiederfindungsrate aufzuweisen. Die Bebrütungstemperatur wird im allgemeinen mit +22 bis +37°C angegeben. Die Dauer beträgt zwischen 48 Stunden und 10 Tagen.

2.10.4.2 Zweistufige Anreicherungsverfahren

Weitere Möglichkeiten bieten zweistufige Anreicherungsverfahren. Zuerst findet eine weniger selektive Voranreicherung statt, und anschließend folgt eine selektive Anreicherung. Hierbei werden zusätzlich oft Kälteanreicherung und Anreicherungen bei höheren Temperaturen kombiniert. Beispielsweise entwickelte SCHIEMANN (1982) ein zweistufiges Anreicherungsverfahren, bei dem zuerst eine Voranreicherung in einer Hefeextrakt- Bengalrot- Bouillon (Yeast extract-rosebengale broth, YER) bei +4°C oder +10°C stattfindet. Dieses weniger selektive Medium ermöglicht eine Vermehrung geringer *Yersinia*- Keimzahlen und die Regeneration geschädigter Yersinien. Die darauffolgende selektive Anreicherung in einem Galle-Oxalat-Sorbose- Medium (BOS) findet bei +22 bis +28°C über zwei bis fünf Tage statt und hemmt die Begleitkeime. Dieses Anreicherungsverfahren zeigte sich besonders hilfreich, um das Serovar O:8 zu isolieren, während die Wiederfindung bei Serovar O:5,27 schwierig war (SCHIEMANN, 1983a). Auch VIDON und DELMAS (1981) beschrieben ein derartiges zweistufiges Verfahren (**Tabelle 8**).

Tabelle 8: Zweistufige Anreicherung für *Y. enterocolitica* (nach WALKER und GILMOUR, 1986a)

	1. Anreicherung	2. Anreicherung
SCHIEMANN, 1983a	Trypton-Soja-Bouillon +22°C, 24h	Galle-Oxalat-Sorbose-Bouillon (BOS) +22-25°C, 2-5d
SCHIEMANN, 1982	Hefeextrakt-Bengalrot-Bouillon (YER) +4°C, 9d	Galle-Oxalat-Sorbose-Bouillon (BOS) +22°C, 5d
VIDON und DELMAS, 1981	Phosphatgepufferte Salzlösung mit 2% Pepton +4°C, 21d	Pepton-Tris-Saccharose-Ampicillin-Bouillon +28°C, 48h

Auch KOUNEV (1989) beschreibt für den Nachweis vorgeschädigter *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln eine Kombination aus Anreicherung bei

Zimmertemperatur und Kälteanreicherung. Hierbei findet zuerst eine Bebrütung bei +25°C und anschließend eine Anreicherung bei +4°C statt.

2.10.4.3 Kälteanreicherung

Bei der Kälteanreicherung macht man sich die psychrotrope Eigenschaften des Keimes zunutze. Hierzu wird ein nicht oder nur kaum selektives Medium benützt. Als Anreicherungsmedien für die Kälteanreicherung gelten insbesondere Phosphatpuffer in verschiedenen Modifikationen, so die Phosphatpufferlösung nach Sörensen, die phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung, die phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 1 % Sorbit und 0,15 % Gallenzusatz ebenso wie die Hefe-Extrakt- Bengalrosa- Bouillon (SCHIEMANN, 1980; KLINGBERG, 1982; STENGEL, 1983; PICHHARDT, 1989; DE BOER und NOUWS, 1991; NCFA, 1996).

Die Bebrütungsdauer beträgt in der Regel drei Wochen bei +4°C. WEBER (1982) machte jedoch die Beobachtung, dass ein einmaliger Ausstrich nach drei Wochen nicht ausreichend ist. Seiner Meinung nach soll die Kälteanreicherung schon nach der ersten und zweiten Woche der Aufbewahrung ausgestrichen werden. Proben, die zu diesem Zeitpunkt zu einem positiven Nachweis von *Y. enterocolitica* führten, verliefen häufig in der dritten Woche nicht mehr positiv (**Tabelle 9**).

Tabelle 9: Isolierung von humanpathogenen *Y. enterocolitica*- Stämmen aus Kotproben und Tonsillen von klinisch gesunden Schlachtschweinen in Abhängigkeit von den Ausstrichen der Kälteanreicherung (WEBER, 1982)

Untersuchungs- material	Zahl der untersuchten Proben	Anreicherung ausgestrichen nach		
		1 Woche	2 Wochen	3 Wochen
Kotproben	1206	27	2	4
Tonsillen	480	28	14	3

Die lange Inkubationszeit der Kälteanreicherung ist nicht nur zeitaufwendig, sondern auch ein wesentliches Problem, da die Haltbarkeit vieler Lebensmittel vor Abschluss der Untersuchung überschritten wird (SAUER, 1996).

2.10.5 Isolation

2.10.5.1 Selektivnährmedien

Obwohl die Wachstumsfähigkeit von *Y. enterocolitica*- Stämmen auf nicht selektiven Nährmedien, wie z.B. Trypton-Soja-Agar (SWAMINATHAN et al., 1982) sehr gut ist, eignen sich diese Nährmedien nicht zur Isolierung der Keime aus Lebensmitteln und Kot. Da die Vermehrung der Begleitflora auf diesen Nährmedien ungehemmt ist, werden *Y. enterocolitica*- Kolonien durch diese überdeckt. Zunächst wurden Selektivnährmedien eingesetzt, die für den Nachweis anderer enteropathogener Keime entwickelt worden waren, z.B. MacConkey-Agar, Salmonella-Shigella-Agar, Desoxycholat-Citrat-Agar oder Wismut-Sulfit-Agar (DE BOER, 1992). Später wurden bereits bekannte Medien modifiziert bzw. neue Selektivnährböden entwickelt, um den Nachweis von *Y. enterocolitica* zu verbessern.

So ergänzte LEE (1977) MacConkey- Agar mit Tween 80, um eine Abgrenzung von anderen laktosenegativen Kolonien durch die Darstellung der lipolytischen Aktivität von Yersinien zu erleichtern. Es stellte sich jedoch heraus, dass nur die Stämme des Biotyp 1 auf diesem Medium anhand der Lipolyse deutlich zu erkennen sind (DE BOER und SELDAM, 1987). WAUTERS (1973) berichtete, dass *Y. enterocolitica* eine hohe Resistenz gegenüber Desoxycholat zeigt, und modifizierte den Salmonella- Shigella- Agar durch Zusatz von Natriumdesoxycholat und CaCl₂ (SSDC). Das ISO (1993) beschreibt den Salmonella- Shigella- Agar mit Natriumdesoxycholat als geeignet *Y. enterocolitica* nachzuweisen. Ursprünglich wird der Salmonella- Shigella- Agar zur Isolierung und Differenzierung von Salmonellen, sowie einigen Shigellen aus Lebensmitteln, klinischem und anderem Untersuchungsmaterial benutzt. Seine selektive Wirkung beruht auf den Komponenten Brilliantgrün, Gallensalze, Thiosulfat und Citrat, welche grampositive und coliforme Keime im Wachstum hemmen (N.N., 1996). Einige Spezies von *Morganella*, *Proteus*, *Serratia* und *Aeromonas* wachsen jedoch

auf SSDC-Agar und es kann schwierig sein, sie von Yersinien zu unterscheiden (DE BOER, 1992).

SCHIEMANN (1979) entwickelte nach ausführlichen Studien über Grundnährstoffe und geeignete selektive Zusätze den CIN- Agar. Dieser enthält Cefsulodin, Irgasan und Novobiocin und wird zur Isolierung und Koloniezahlbestimmung von *Y. enterocolitica* aus klinischem Untersuchungsmaterial und Lebensmitteln empfohlen. Dieses Medium wirkt hemmend auf *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* und *P. mirabilis*. Einige Stämme von *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Proteus* und *Citrobacter* zeigten jedoch eine ähnliche Kolonienmorphologie wie *Yersinia* (DE BOER und SELDAM, 1987). Da Yersinien Mannit fermentieren, sind als Zuckerindikator-System Mannit und Neutralrot zugegeben. Typische Kolonien von *Y. enterocolitica* erscheinen dunkelrot und haben das Aussehen von „Kuhaugen“, da sie von einem klaren Hof umgeben sind. Die Kolonien variieren in ihrer Größe je nach Pathogenität. Die meisten anderen Keime, die auf diesem Nährboden wachsen, bilden jedoch in der Regel größere Kolonien als *Y. enterocolitica* (Durchmesser > 2mm) (BIOTEST, 1992).

Ebenfalls 1979 entwickelten DUDLEY und SHOTTS ein Cellobiose- Arginin- Lysin-Medium (CAL) für den Nachweis von *Y. enterocolitica*. Durch die Fermentierung von Cellobiose und die dadurch entstehende Senkung des pH-Wertes färbt das im Agar enthaltene Neutralrot die Yersinien- Kolonien burgunderrot. Das sogenannte “Y”- Medium von SOLTESZ et al. (1980) besteht aus Casein- Hydrolysat, Natrium-Oxalat und Gallensalzen. Dabei werden die meisten gramnegativen und grampositiven Bakterien gehemmt. Die coliformen Keime, die dennoch wachsen, lassen sich durch die Lactose- Fermentation von den Yersinien abgrenzen.

FUKUSHIMA und GOMYODA (1986) berichteten, dass CIN-Agar sich auf *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* Serovar O:3, Biovar 3B, hemmend auswirkt. Der von FUKUSHIMA (1987) daraufhin entwickelte “Virulent *Y. enterocolitica*”- Selektivagar (VYE Agar) enthält Cefsulidin, Irgasan, Josamycin und Oleandomycin und bietet so eine sehr hohe Selektivität, ermöglicht jedoch das Wachstum der o.g. Bakterien. Außerdem ist zur gleichzeitigen Differenzierung Mannitol und Aeskulin enthalten. So bilden virulente *Y. enterocolitica*- Kulturen rote Kolonien, welche leicht von den schwarzen Kolonien anderer Yersinien und

gramnegativer Bakterien unterschieden werden können. Die schwarze Färbung entsteht durch die Aeskulinhydrolyse. Der VYE- Agar bewies im Experiment eine höhere Wiederfindungsrate von *Y. enterocolitica*, Biotyp 3B, Serotyp O:3 als der CIN- Agar (FUKUSHIMA, 1987).

2.10.5.2 KOH- Behandlung

AULISIO et al. (1980) fanden heraus, dass *Y. enterocolitica*- Stämme mehr Toleranz gegenüber alkalischen Lösungen zeigen als andere gramnegative Bakterien. Um also die störende Begleitflora zu reduzieren, empfahlen sie die Behandlung des bebrüteten Anreicherungsmediums mit verdünnter KOH-Lösung (0,25 % bis 0,5 %) vor dem Ausstrich. Allerdings wird die Laugentoleranz von *Y. enterocolitica* durch viele Faktoren wie Medium, Temperatur und Wachstumsphase beeinflusst (SCHIEMANN, 1983b), so dass eine spezifische Behandlungszeit nicht ermittelt werden kann (WEAGANT und KAYSNER, 1983). Des Weiteren gaben SCHIEMANN (1982) und DOYLE und HUGDAHL (1983) zu bedenken, dass es möglicherweise durch die KOH- Einwirkung zu einer Keimreduzierung von *Y. enterocolitica* kommen kann.

2.10.6 Identifizierung

Die auf dem Selektivagar verdächtig aussehenden Kolonien werden zunächst auf ein nicht selektives Medium überimpft. Hierbei empfiehlt es sich, dieses Medium bei +25°C zu inkubieren, um einen Plasmidverlust zu vermeiden (SCHIEMANN und WAUTERS, 1992).

Für eine erste Orientierung eignen sich in erster Linie der Urease- Nachweis und die Reaktion auf dem Eisen- Zweizucker- Agar nach Kligler. KERBER (1997) empfiehlt zusätzlich die Prüfung von Lysindecaboxylase, Oxidase und Beweglichkeit. Einige Autoren stellten die Eignung des Nachweises der Pyrazinamidaseaktivität heraus, da er mit einfachen Mitteln innerhalb von 24 Stunden ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal liefert (HAHN, 1989; PICHHARDT, 1989; SEELIGER und SCHRÖTER, 1990).

Es stehen mehrere Testsysteme für die genauere Identifizierung und die Differenzierung von *Y. enterocolitica* zur Verfügung. Dazu gehören die Systeme

Api 20E, Api Rapid 32 DIE und Micronaut. Die besten Ergebnisse für pathogene Yersinien liefert der Test-Kit Api 20E, mit dessen Hilfe in einer Studie von NEUBAUER et al. (1998) 95 % der Proben korrekt bestimmt wurden. Es wird hierbei von einer Sensitivität von 96 % für *Y. enterocolitica* und 90 % für *Y. pseudotuberculosis* ausgegangen (NEUBAUER et al., 1998).

Um eine eindeutige Identifizierung zu erreichen, muss nach einer anschließenden Biotypisierung noch eine serologische Differenzierung und Zuordnung stattfinden. Diese wird beispielsweise mittels Objekträgeragglutination mit den entsprechenden Faktorensereen durchgeführt.

2.10.7 Pathogenitätsnachweis

Bei dem Nachweis von *Y. enterocolitica* in Stuhl und Lebensmitteln ist es von entscheidender Bedeutung, ob es sich bei den Isolaten um humanpathogene Stämme handelt. Die Sero- und Biotypisierung der Stämme kann einen wichtigen Beitrag zur Ermittlung der Pathogenität leisten, jedoch liegt die vollständige biochemische Klassifikation außerhalb der Möglichkeit der meisten Routinelabors. Deswegen wurde nach verschiedenen Pathogenitätsmerkmalen gesucht und entsprechende, einfachere Verfahren zur Pathogenitätsermittlung vorgeschlagen. Der Nachweis der Pathogenität kann entweder auf chromosomal- oder auf plasmidkodierten Faktoren beruhen. Einige Verfahren sind relativ einfach und deshalb auch im Routinelabor durchzuführen. Zu diesen Verfahren gehören (BOTTONI, 1997):

- Kristallviolettbindung bei +37°C
- Salicinfermentation
- Aeskulinspaltung
- Pyrazinamidaseaktivität
- Autoagglutination bei +35°C oder +37°C
- Serumresistenz
- Kongorotaufnahme bei +37°C
- Kalziumabhängiges Wachstum bei +37°C

Für die beiden letztgenannten **plasmidabhängigen** Eigenschaften gibt es einen gemeinsamen Nachweis mittels des Kongorot- Magnesium- Oxalat- Agars (CRMOX- Agar), der 1989 von RILEY und TOMA entwickelt wurde. Plasmidtragende und somit pathogene Keime können auf diesem Agar innerhalb von 24 Stunden nach Beimpfung mit einer charakteristischen Kolonie nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der Autoagglutination werden Yersinien- Isolate in einer Bouillon nach CLARK und LUBS (HALLMANN, 1953) inkubiert. Als positive Reaktion wird die Verklumpung des Niederschlages am Boden des Reagenzglases gewertet. Negativ sind die Stämme, die eine gleichmäßige Trübung des Nährmediums verursachen. Die Serumresistenz kann beispielsweise mit Hilfe von Pferdeserum nachgewiesen werden. Dabei wird das Wachstum der verdächtigen Bakterienkolonie auf inaktiviertem und nicht inaktiviertem Serum verglichen. Wachsen die Yersinien auch auf dem nicht inaktivierten Serum, spricht man von einer Serumresistenz (KERBER, 1997).

Tierversuchsmodelle bieten eine Möglichkeit die Pathogenität eines Stammes sehr sicher nachzuweisen, sind jedoch für ein Routinelabor aufgrund des erhöhten Aufwandes an Zeit und Gerätschaften, sowie den Bestimmungen des Tierschutzrechtes, nicht ohne weiteres durchführbar. In verschiedenen Tierversuchsmodellen stellten sich Unterschiede in der Pathogenität von amerikanischen Stämmen (O:8, O:21) und nicht amerikanischen Stämmen (O:3, O:9, O:5,27) heraus. Europäische Stämme verursachten weder eine Keratokonjunktivitis bei Meerschweinchen, noch waren sie in der Lage, tödliche Infektionen bei erwachsenen Mäusen zu verursachen, wie das mit amerikanischen Stämmen der Fall war (CORNELIS et al., 1987). Um eine Pathogenität auch der europäischen Stämme im Tierversuch zweifelsfrei nachzuweisen, benötigt man Babymäuse (AULISIO et al., 1983), junge Kaninchen oder Mäuse, die mit einem Eisenchelator behandelt (ROBINS BROWNE und PRPIC, 1985) oder durch Kälte gestresst wurden (BAKOUR et al., 1985). PRPIC et al. (1985) stellten fest, dass alle virulenten Stämme ein Plasmid der angegebenen Größe besaßen, allerdings fand sich auch bei apathogenen Spezies ein Plasmid entsprechender Größe. Daher ist eine Plasmidisolierung alleine wenig geeignet, die Pathogenität eines Stammes festzustellen.

Der Nachweis von **chromosomalen** Faktoren, die bei pathogenen Yersinien vorkommen, kann schon mit Hilfe des Biotypisierungsschemas nach WAUTERS et al. (1987) als erster Hinweis auf die Pathogenität erfolgen. CHIESA et al. (1993) halten den Pathogenitätsnachweis mit Pyrazinamidase -Aktivität, Salicin-Fermentation und Aeskulin- Hydrolyse für eine schnelle und einfache Methode für die Unterscheidung zwischen pathogenen und nicht pathogenen Erregern. Pathogene Isolate von *Y. enterocolitica* können aufgrund bestimmter, noch nicht näher differenzierter Faktoren Salicin bei +35°C nicht fermentieren. Ebenso findet keine Hydrolyse von Aeskulin bei +25°C statt und der Pyrazinamidasenachweis ist negativ (FARMER et al., 1992; BOTTONE, 1997).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Probenmaterial

In der Zeit von Mai 2000 bis September 2000 wurden am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät der Ludwigs- Maximilian- Universität München 300 Proben von schweinefleischhaltigen Lebensmitteln untersucht (**Abb.1**). Hiervon waren 215 Proben roh, bei den restlichen 85 Proben handelte es sich um hitzebehandelte Produkte, wie z.B. Brühwurst (**Tabelle 10**). Die Probenentnahme wurde in dem Zeitraum zwischen dem 8. Mai 2000 und dem 3. August 2000 aus dem im mikrobiologischen und chemischen Labor des Instituts eingehenden schweinefleischhaltigen Material vorgenommen.

3.1.2 Untersuchungsmaterial

Siehe Anhang

Tabelle 10: Zusammenfassung der untersuchten Proben

Nummer	Untersuchungs- datum	Nicht erhitze Schweinefleischprodukte				Erhitze Schweinefleisch- produkte				Anzahl
		Hackfleisch	Gulasch	Salami	Innereien	Wurst	Schinken	Leberkäse	Sonstige	
1-25	08.05.2000	15				8	2			25
26-50	15.05.2000	11	4	3		4	2	1		25
51-75	22.05.2000	18	2	1		4				25
76-100	29.05.2000	14	1			8	2			25
101-125	05.06.2000	17		1		2	3	2		25
126-150	13.06.2000	13	7			4	1			25

Nummer	Untersuchungsdatum	Nicht erhitze Schweinefleischprodukte				Erhitzte Schweinefleischprodukte				Anzahl
		Hackfleisch	Muskelfleisch	Salami	Innereien	Wurst	Schinken	Leberkäs	sonstige	
151-175	19.06.2000	19	3			3				25
176-200	26.06.2000	13	4	1		6	1			25
201-225	03.07.2000	10	3	2		7	2	1		25
226-250	17.07.2000	16	2			6	1			25
251-275	24.07.2000	13	1		2	5	3	1		25
276-300	30.07.2000	19				4			2	25
Gesamt		178	27	8	2	61	17	5	2	300

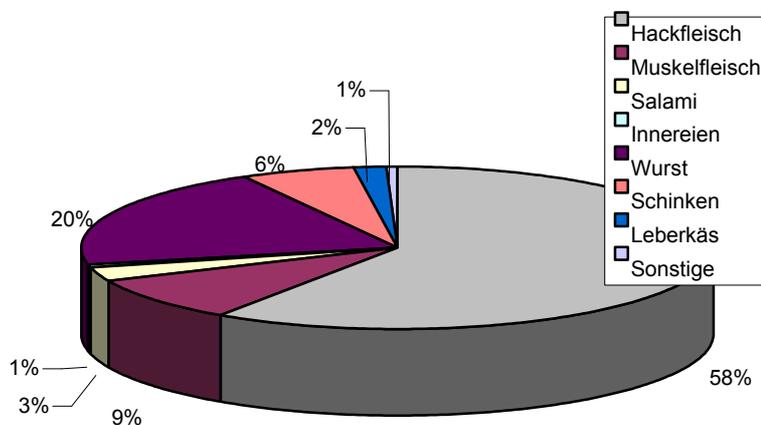


Abbildung 1: Lebensmittelverteilung der untersuchten Proben

3.2 Methoden

3.2.1 Methoden zur Anreicherung und Isolierung von *Y. enterocolitica*

Die Proben wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und in sterile Kunststoffbeutel (Stomacher `400`Bags, SEWARD) verpackt und bis zur Untersuchung eingefroren. Nach der Probenentnahme durchliefen alle Proben zunächst die gleichen Untersuchungsschritte (**Abb. 2**):

Tag 1:

Zunächst wurden von jeder der insgesamt 300 Proben zehn Gramm in 90 ml TSB gegeben und für eineinhalb Minuten im Stomacher homogenisiert. Danach wurde die Lösung in einen 100 ml- Erlenmeyerkolben gegeben und zugedeckt. Jede dieser 300 TSB- Lösungen wurde vergleichend den verschiedenen Nachweisverfahren unterzogen.

Bei Zimmertemperatur erfolgte eine Bebrütung der beimpften TSB für 1-2 Stunden. Danach wurden 100 µl der Lösung in Form eines Drei- Ösenausstriches direkt auf einer CIN- Platte ausgestrichen und für 18- 20h bei +30°C bebrütet (Direktausstrich).

Darüber hinaus wurden 10 ml ITC- Anreicherungslösung mit 1 ml der TSB- Lösung beimpft, durchmischt und für 48h bei +25°C bebrütet (ITC 1).

Die TSB- Lösung selbst wurde über Nacht bei +22- +25°C weiterbebrütet.

Tag 2:

Von der über Nacht bebrüteten TSB- Bouillon wurden 0,5 ml entnommen, in 4,5 ml 0,5% KOH gegeben und durchmischt. Nach 20 Sekunden wurden 100 µl entnommen, auf einer CIN- Platte ausgestrichen (siehe oben) und bei +30°C für 18-20h inkubiert.

Mit der TSB- Lösung wurden zusätzlich zwei selektive Anreicherungsmedien beimpft. In je 10 ml ITC- und MRB- Lösung wurden 100 µl der TSB- Bouillon pipettiert, durchmischt und für 48h bei +25°C bebrütet (ITC 2 und MRB). Die

restliche TSB- Voranreicherung wurde zur Kälteanreicherung für 21 Tage bei +4°C inkubiert.

Die Auswertung der CIN- Platte vom Vortag erfolgte durch die Beurteilung der Koloniengröße und -farbe. Vier der charakteristischen kleinen (<1mm), dunkellila gefärbten Kolonien, sogenannte „Kuhaugen“, wurden ausgewählt und auf TSA-Agar zur weiteren Differenzierung ausgestrichen.

Tag 3:

Von der ITC I- Anreicherung wurden jeweils 100 µl auf eine CIN- Platte pipettiert und für 18-20h bei +30°C bebrütet.

Die Auswertung der aus der Über- Nacht- Anreicherung beimpften CIN- Platte erfolgte nach demselben Schema wie beim Direktausstrich auf CIN- Agar.

Tag 4:

Von der MRB- und ITC II- Anreicherung wurden wieder jeweils 100µl auf eine CIN- Platte pipettiert und für 18-20h bei +30°C bebrütet.

Die Auswertung der ITC I- Anreicherung beimpften CIN- Platte erfolgte nach dem oben erwähnten Schema.

Tag 5:

Die CIN- Platten der MRB- und ITC II- Ausstriche von Tag 4 wurden nach dem oben erwähnten Muster beurteilt.

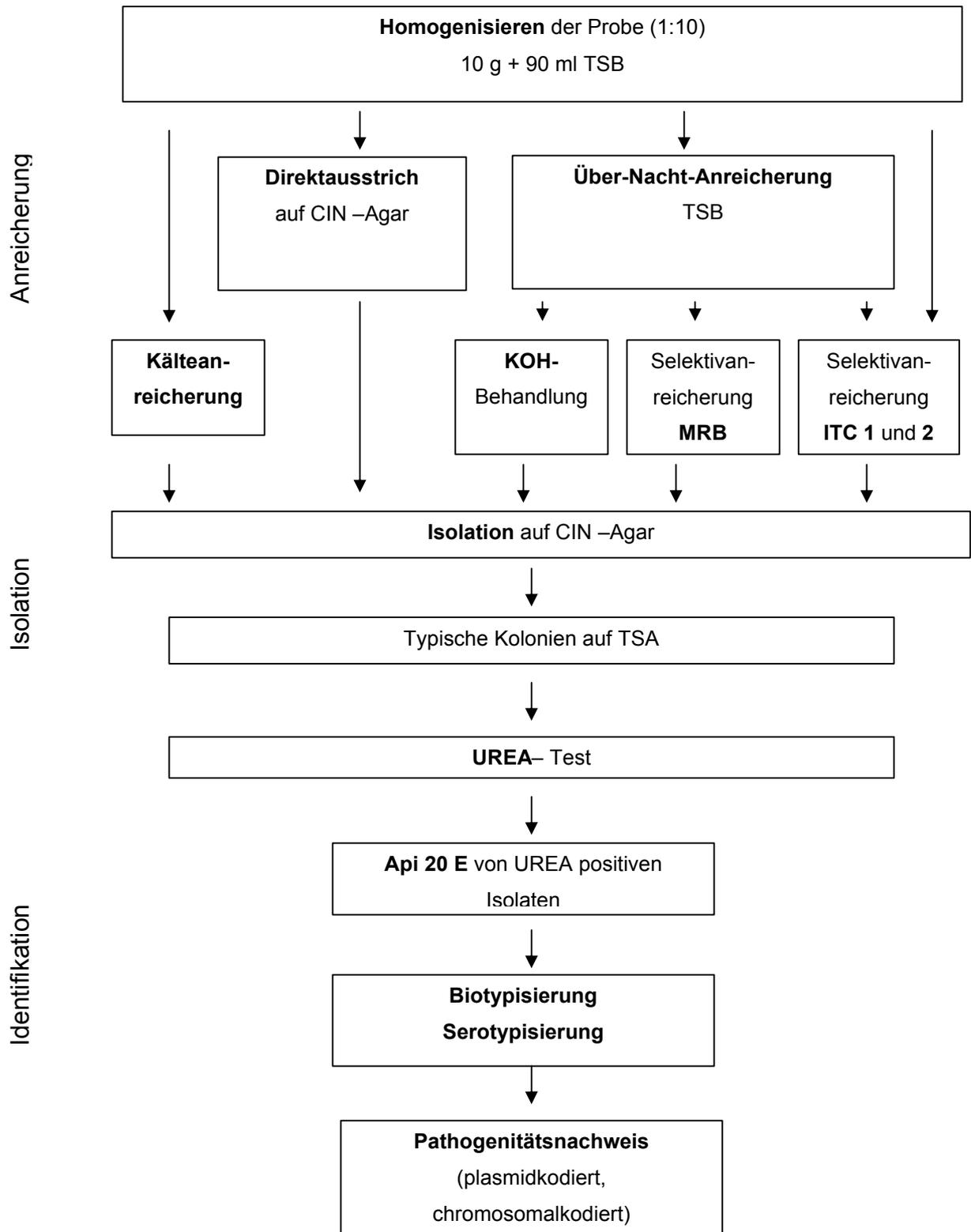
Tag 22:

Von der Kälteanreicherung wurden 0,5 ml in 4,5 ml 0,5% KOH gegeben und durchmischt. Nach 20 Sekunden wurden 100 µl entnommen, auf einer CIN- Platte ausgestrichen und bei +30°C für 18-20h inkubiert.

Tag 23:

Der Ausstrich der Kälteanreicherung auf der CIN- Platte vom Vortag wurde nach dem bekannten Muster beurteilt.

Nach dem Ausstrich von vier typischen „Kuhaugen“ von den aus den verschiedenen Selektivanreicherungen beimpften CIN- Platten auf je eine unspezifische TSA- Platte erfolgte eine Bebrütung für 24h bei +30°C. Die Reinkolonien wurden im Anschluss mit dem Urea- Test untersucht.

Untersuchung auf *Y. enterocolitica***Abbildung 2:** Schema zur Isolierung und Identifizierung von *Y. enterocolitica*

3.2.2 Methoden zur Identifikation von *Y. enterocolitica*

3.2.2.1 Urea- Test

Zur Vorselektion wurden die Reinkolonien mit dem Urea- Test auf Harnstoffabbau untersucht. Der Harnstoff- Agar (Oxoid) wurde mit einer Kolonie beimpft und für 24h bei +30°C bebrütet. *Y. enterocolitica* besitzt eine Urease, die den im Urea Agar enthaltenen Harnstoff in Ammoniak und Carbamat spaltet. Durch den hierdurch verursachten pH- Anstieg des Mediums kommt es zu einem roten Farbumschlag. Zeigten Isolate Harnstoffspaltung, wurden diese mit Hilfe des API 20 E-Systems weiter identifiziert.

3.2.2.2 Api 20E

Die zu untersuchenden Kolonien wurden nochmals auf einem unspezifischen TSA- Agar ausgestrichen (Drei- Ösen- Ausstrich) und für 24h bei +30°C bebrütet. Nach

24h wurden jeweils 3- 5 gut isolierte Einzelkolonien eines Isolates in einem Reagenzglas mit 5 ml sterilem Wasser sorgfältig homogenisiert. Für alle Reaktionen wurden die Röhrchen des Api 20E- Teststreifens mit der Bakteriensuspension wie vorgegeben befüllt. Je nach Anforderung wurden die Kammern ganz aufgefüllt oder mit Paraffinöl für eine anaerobe Bebrütung luftdicht verschlossen. Nach einer Bebrütungszeit von 20- 24h bei +30°C erfolgte bei einigen Kammern die Zugabe von einem Tropfen spezifischer Supplemente, entsprechend den Angaben des Herstellers. Danach konnten die folgenden Reaktionen abgelesen und zugeordnet werden (**Tabelle 11**).

Tabelle 11: Reaktionen des Testsystems Api 20 E

Test	Reaktion	Ergebnis		
		negativ	positiv	<i>Y. enterocolitica</i>
ONPG	β -Galactosidase	farblos	gelb	gelb
ADH	Arginindehydrolase	gelb	rot/orange	gelb
LDC	Lysindecaboxylase	gelb	orange	gelb
ODC	Ornithindecaboxylase	gelb	rot/orange	gelb/orange
CIT	Citratabbau	blaßgrün/gelb	blaugrün/blau	blaßgrün/gelb
H ₂ S	H ₂ S-Produktion	farblos	schwarzer Niederschlag	farblos
URE	Urease	gelb	rot/orange	rot/orange
TDA	Tryptophandesaminase	gelb	dunkelbraun	gelb
IND	Indolproduktion	gelb	rosa	gelb/rosa
VP	Acetoinproduktion	farblos	rosa	rosa
GEL	Gelatinose	keine Diffusion	Diffusion	keine Diffusion
GLU	Glucose	blau/blaugrün	gelb	gelb
MAN	Mannit	blau/blaugrün	gelb	gelb
INO	Inosit	blau/blaugrün	gelb	blau/blaugrün
SOR	Sorbit	blau/blaugrün	gelb	gelb
RHA	Rhamnose	blau/blaugrün	gelb	blau
SAC	Saccharose	blau/blaugrün	gelb	gelb
MEL	Melibiose	blau/blaugrün	gelb	blau
AMY	Amygdalin	blau/blaugrün	gelb	gelb/blau
ARA	Arabinose	blau/blaugrün	gelb	gelb/blau
NO ₃ -NO ₂	NO ₂ -Produktion	gelb	rot	rot

3.2.2.3 Lagerung der identifizierten *Yersinia*- Isolate

Die durch den Api 20 E eindeutig identifizierten *Y. enterocolitica* Isolate wurden bis zur weiteren Bearbeitung in der Mikrobank gelagert. Dazu wurde eine typische Kolonie auf einen unspezifischen TSA- Agar nochmals ausgestrichen und für 24h bei +30°C bebrütet. Am folgenden Tag konnte das gesamte Material der Platte in möglichst steriler Umgebung in das vorgesehene Mikrobank- Röhrchen verbracht werden. Die an den Keramikkügelchen der Mikrobank fixierten Isolate wurden eingefroren und standen so jederzeit für weiter Untersuchungen zur Verfügung.

3.2.2.4 Biotypisierung

Obwohl pro Probe nur ein Isolat mittels Api 20 E untersucht wurde, fand eine Biotypisierung für die gesamten Isolate einer Probe statt. Die Untersuchung folgender Parameter lässt eine eindeutige Differenzierung der einzelnen Biotypen zu (**Tabelle 12**):

Tabelle 12: Parameter zur Biotypisierung von *Y. enterocolitica*

Test	Biotypreaktion nach einer Bebrütung bei +25°C für 48h					
	1A	1B	2	3	4	5
Lipase (Tween Esterase)	+	+	-	-	-	-
Aeskulin Hydrolyse	+	-	-	-	-	-
Salicin (Säureproduktion)	+	-	-	-	-	-
Indol Produktion	+	+	+	-	-	-
Xylose (Säurebildung)	+	+	+	+	-	-
Trehalose (Säurebildung)	+	+	+	+	+	+
Pyrazinamidase	+	-	-	-	-	-
Nitrat Reduktion	+	+	+	+	+	+

+ = positive Reaktion
- = negative Reaktion

Die Reaktionen Indolbildung und Nitrat- Reduktion wurden bereits mit dem Testsystem Api 20E bestimmt und mussten bei der Biotypisierung deshalb nicht noch einmal durchgeführt werden.

Sämtliche Tests zur Biotypisierung würden bei +25°C für 24- 48h inkubiert. Auf dem **Tween- Esterase- Agar** wurden einige Kolonien mit Hilfe einer Öse auf einer Linie ausgestrichen und wie oben erwähnt bebrütet. Ein milchig- trüber Hof um den Impfstrich deutete auf eine positive Lipase- Reaktion hin.

Auf den **Aeskulin- Agars** wurden einige Kolonien mit einem Ein- Ösenausstrich aufgebracht. Die Aeskulinspaltung, also eine positive Reaktion, bestand bei einer gelbbraunen Verfärbung in der Umgebung der beimpften Fläche.

Die Reagenzgläser mit **Salicin-, Xylose- und Trehalose-** haltigen Fermentationsmedien wurden jeweils mit einigen Bakterienkulturen beimpft und bebrütet. Bei allen drei Reaktionen wurde eine positive Reaktion durch eine Gelbfärbung angezeigt.

Der Schrägagar zum Nachweis des **Pyrazinamid-** Abbaus wurde mit Probenmaterial aus einer Öse beimpft. Nach der oben angegebenen Inkubation und Zugabe 1 ml frischer 1 %iger Ammoniumferrosulfat- Lösung zeigte eine frische rotbraune Färbung nach ca. zehn Minuten eine positive Reaktion.

3.2.2.5 Serotypisierung

Mit Hilfe des monospezifischen Testserums „Anti- *Yersinia enterocolitica* “ wurde die Serotypisierung von *Y. enterocolitica* O:3 durchgeführt. Hierzu wurde auf einem Objektträger eine Kolonie in einem Tropfen Testserum verrieben und dieser etwa 20 mal behutsam geschwenkt. Eine Agglutination bewies, dass *Y. enterocolitica* O:3 im Probenmaterial vorhanden war.

3.2.2.6 Pathogenitätsnachweis

Der Nachweis der Pathogenität ist ein wesentlicher Bestandteil der Untersuchung von *Y. enterocolitica*. Da die Pathogenität sowohl von plasmid- als auch chromosomal kodierten Eigenschaften abhängig ist, erscheint es sinnvoll, Untersuchungen für beide Faktoren durchzuführen.

Die chromosomal- kodierte pathogene Eigenschaften wurden bereits im Zuge der Biotypisierung mit Hilfe der Reaktionen von Pyrazinamidase, Salicin und Aeskulin untersucht. Sind bestimmte pathogenitätsbestimmende chromosomale Faktoren vorhanden, können weder Pyrazinamid noch Salicin oder Aeskulin abgebaut werden.

Der Nachweis der plasmid- kodierte Eigenschaften erfolgte mit dem indirekten Nachweis des Virulenz- Plasmids pYV, durch die Calciumabhängigkeit und die Adsorption von Kongorot. Diese Merkmale wurden mit Hilfe des Kongorot- Magnesium- Oxalat- Agars nachgewiesen. Die Kolonie des zu untersuchenden Isolates wurde auf einer CRMox- Platte durch einen drei- Ösenstrich aufgetragen und für 24h bei +37°C bebrütet. Bei positiver Reaktion zeigen sich dunkelorange-farbene kleine Kolonien (<1mm).

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* in der Gesamtmenge der Proben

In den 85 untersuchten hitzebehandelten Proben wurden keine pathogenen Yersinien nachgewiesen. Dagegen wurden in 18 der 215 rohen Proben (8,37%) *Y. enterocolitica* entdeckt. Berücksichtigt wurden nur pathogene Vertreter dieser Spezies. Alle Stämme konnten dem Bio/Serotyp 4O:3 zugeordnet werden.

4.2 Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* in den verschiedenen Produktgruppen

Die Ergebnisse bezogen auf die verschiedenen Produktgruppen sind in **Tabelle 13** zusammengefasst. In 16 von den 178 untersuchten Hackfleischproben konnten durch die angewendeten Nachweisverfahren pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden (9,0%). Von insgesamt 27 in die Studie einbezogenen Muskelfleischproben (roh) wurden in 2 Proben pathogene *Y. enterocolitica* detektiert (7,4%). Außerdem wurden 8 Salamiprogen und 2 Proben von Innereien untersucht, in denen jedoch keine pathogenen *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden konnten (**Tabelle 13**).

Die 85 erhitzten Schweinefleischproben setzten sich aus verschiedenen Produkten zusammen: Brühwürste (61), gekochter Schinken (17), Leberkäs (5) und Gulasch- Fertiggericht (2). In keiner dieser Proben wurden mit den angewandten Nachweisverfahren pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen.

Tabelle 13: Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* in den verschiedenen Produktgruppen

	Rohe Produkte vom Schwein				Gesamt rohe Produkte	Erhitzte Schweinefleischprodukte				Gesamt erhitzte Produkte
	Hackfleisch	Muskelfleisch	Salami	Innereien		Wurst	Schinken	Leberkäse	Gulasch gek.	
Untersuchte Probenzahl	178	27	8	2	215	61	17	5	2	85
positive Proben	16	2	0	0	18	0	0	0	0	0
prozentualer Anteil	9,0%	7,4%	0,0%	0,0%	8,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

4.3 Vergleich der Nachweisverfahren

Y. enterocolitica konnte bei der Verwendung verschiedener Anreicherungsverfahren unterschiedlich häufig gefunden werden (**Tabelle 14**).

Mit Hilfe der **Direktkultivierung** konnte in drei Proben *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden; mit Hilfe der Irgasan- Ticarcillin- Cefsulidid- (ITC 1 und 2) und der Modifizierten- Rappaport- (MRB) Selektivanreicherung wurden in den gleichen Proben ebenfalls *Y. enterocolitica* entdeckt.

Die vor dem Ausstrich mit KOH behandelte **Über- Nacht- Anreicherung** (Overnight- enrichment) erbrachte in keinem Fall einen positiven Nachweis von *Y. enterocolitica* (**Abb. 4**).

Durch den Einsatz des **modifizierten Rappaportmediums** zur Selektivanreicherung konnten vier Proben identifiziert werden, die *Y. enterocolitica* enthielten. Drei der vier Proben wurden auch wieder durch die ITC-Selektivanreicherung (1 und 2) als positiv erkannt.

Am erfolgreichsten zeigte sich die **ITC-Selektivanreicherung**, mit welcher in 17 Proben *Y. enterocolitica* der Bioserotyp 4/O:3 nachgewiesen werden konnte. Von diesen 17 Proben wurden in nur drei Proben *Y. enterocolitica* auch durch andere Nachweisverfahren, nämlich MRB und Direktkultivierung, entdeckt.

In der **ITC 1**- Anreicherung, ohne vorheriger Über- Nacht- Anreicherung in der TSB- Bouillon, wurden 15 mal *Y. enterocolitica* nachgewiesen. In 8 Fällen konnte *Y. enterocolitica* nur durch dieses Verfahren isoliert werden (**Tabelle 15**).

Mittels **ITC 2**- Anreicherung wurden aus sieben Proben *Y. enterocolitica* isoliert, wovon zwei ausschließlich durch die ITC 2- Anreicherung entdeckt wurden.

Durch die **Kälteanreicherung** (Cold enrichment) war bei keiner Probe *Y. enterocolitica* nachweisbar, obwohl aus einigen Proben mit verschiedenen Selektivanreicherungsverfahren bzw. Direktausstrich *Y. enterocolitica* isoliert werden konnte.

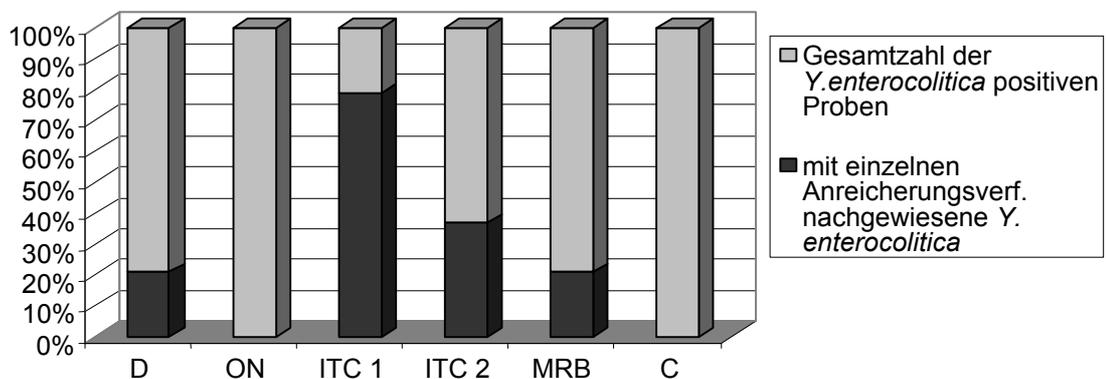


Abbildung 1: Nachweis von *Y. enterocolitica* durch verschiedene Anreicherungsverfahren

Tabelle 14: Vergleich der Nachweisverfahren im Bezug auf die Isolierung pathogener *Y. enterocolitica*

Nachweisverfahren						
Probennr.	D	ON/ KOH	ITC 1	ITC 2	MRB	C
4			x	x		
5			x	x		
9			x			
12			x	x		
25	x		x		x	
26			x			
40				x		
46				x		
53			x			
91					x	
92			x			
97	x		x		x	
131			x			
159			x			
183			x	x		
188	x		x	x	x	
289			x			
297			x			
	3	0	15	7	4	0

Tabelle 15 zeigt die Anzahl der Proben und die daraus gezogenen Isolate, die mit den einzelnen Nachweisverfahren als *Y. enterocolitica* 4/O:3 -haltig bestimmt wurden. Der Nachweis von *Y. enterocolitica* aus einer Probe fand oftmals parallel in verschiedenen Verfahren statt. Deshalb ist zu beachten, dass von einer Probe meistens mehrere Isolate bestehen. Es existieren beispielsweise von einer Probe (YEF 25) zwei Isolate aus dem Direktverfahren, zwei Isolate aus dem ITC1-Verfahren und ein Isolat aus dem MRB- Verfahren. Von anderen Proben (YEF 289) gibt es hingegen insgesamt nur ein Isolat (siehe Anhang). Es wurden daher einige Proben durch mehrere ihrer Isolate als positiv (d.h. *Y. enterocolitica*- haltig) bestimmt. Die beiden letzten Spalten der Tabelle zeigen die Anzahl der Isolate und Proben, in denen ausschließlich durch das jeweilige Verfahren, *Y. enterocolitica* 4/O:3 nachgewiesen werden konnte. Diese Proben und Isolate wurden nicht durch andere Verfahren als positiv bestimmt und wären ohne das jeweilige Verfahren unauffällig geblieben.

Tabelle 15: Nachweis von *Y. enterocolitica* 4/O:3 in Proben und Isolaten insgesamt und ausschließlich durch die einzelnen Verfahren

	Isolate Proben insgesamt		Isolate Proben ausschließlich	
ITC 1	28	15	16	8
ITC 2	12	7	3	2
MRB	4	4	1	1
D	6	3	0	0
C	0	0	0	0
ON	0	0	0	0
Insgesamt	50	18	20	11

4.4 Ergebnis des Testsystems Api 20E

Von den meisten untersuchten Proben, die nach der Isolation auf CIN- Agar die für pathogene *Y. enterocolitica* typischen Kuhaugen zeigten, wurden mehrere

Kolonien entnommen und getrennt voneinander weiter untersucht. Daher lagen von einigen Probe mehrere Isolate vor. Bei 34 dieser insgesamt 56 Isolate aus 21 verschiedenen Proben wurde eine Differenzierung mittels Api 20E durchgeführt. Das Ergebnis zeigte bei 24 Isolaten eine Zahlenkombination (10155231), die für den typischen *Y. enterocolitica* Biotyp 4 spricht. Zehn der untersuchten Isolate wichen von dieser Zahlenkombination ab (**Abb. 4**). Sieben der in der Zahlenkombination des Api 20E abweichenden Isolate wurden aufgrund der nachfolgenden Bio- und Serotypisierung trotzdem zu *Y. enterocolitica* Bio/Serotyp 4/O:3 gezählt (**Tabelle 16**).

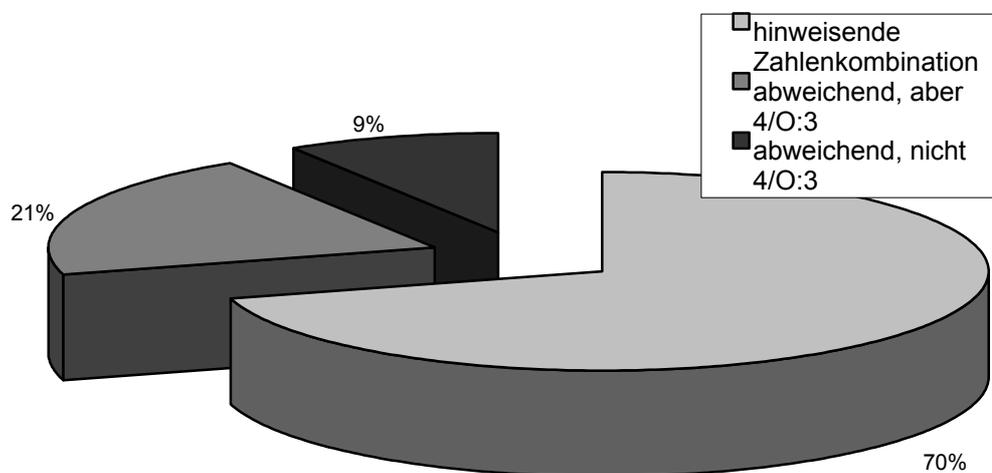


Abbildung 2: Ergebnisse des Api20E für pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3

Tabelle 14: Abweichungen der nachträglich als *Y. enterocolitica* 4/O:3 identifizierten Isolate

Anzahl	Abweichender Test	Abweichender Test	Abweichender Test
3	Nitratreduktion neg.		
2	Nitratreduktion neg.	Amylase neg.	
1	Voges-Proskauer neg.	Amylase neg.	
1	ODC pos.	Amylase neg.	Nitratreduktion neg.

Bei drei der zehn abweichenden Isolaten führte der Api 20E zu einer Zahlenkombination, die keine Übereinstimmung mit der für pathogene *Y. enterocolitica* besaß. Bei zwei dieser drei Isolate konnte auch mittels Biotypisierung kein Hinweis auf Pathogenität gefunden werden. Das dritte Isolat wurde mit Hilfe der Biotypisierung als pathogen eingestuft, konnte aber nicht als *Y. enterocolitica* identifiziert werden. Eine weitere Differenzierung dieses Isolates wurde nicht durchgeführt.

4.5 Ergebnis der Bio- und Serotypisierung

Auch hier wurden nach dem Wachstum auf CIN– Agar die typischen „Kuhaugen-Kolonien“ isoliert. Von den insgesamt 56 Isolaten aus 21 Proben wurden alle biotypisiert. Von diesen 56 Isolaten fielen bei 50 (89,3%) die Ergebnisse so aus, dass diese Isolate als *Y. enterocolitica* Biotyp 4 identifiziert werden konnten. Fünf (8,9%) der Isolate von zwei Proben wichen eindeutig von dem erwarteten Muster ab. Ein Isolat (1,8%) einer weiteren Probe zeigte nur eine Abweichung durch einen positiven Indolnachweis. Die Isolate der drei Proben wiesen auch im Testkit Api 20E keine für *Y. enterocolitica* typischen Zahlenkombinationen auf. Es wurden somit die Isolate aus 18 Proben dem Biotyp 4 zugeordnet.

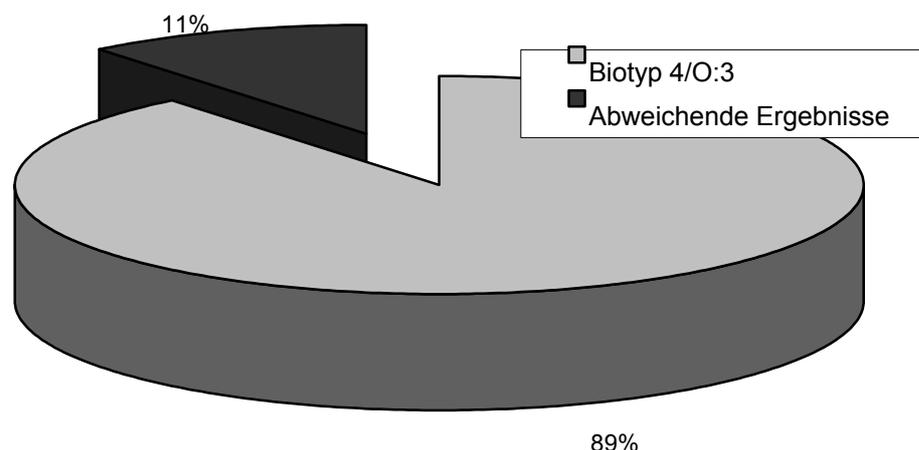


Abbildung 3: Ergebnisse der Biotypisierung

Nach der Biotypisierung wurde bei 50 der als Biotyp 4 identifizierten Isolaten eine Serotypisierung vorgenommen. Diese fiel bei allen getesteten Isolaten positiv aus. Daher konnten alle diese Isolate dem Serotyp O: 3 zugeordnet werden.

4.6 Ergebnis der Untersuchung auf Pathogenität

Der Nachweis von **chromosomal- kodierten** Eigenschaften wurde bereits mit der Biotypisierung durchgeführt. Die Fähigkeit, Pyrazinamid, Aeskulin und Salicin abzubauen fehlten den pathogenen *Y. enterocolitica*- Stämmen. Bei dieser Untersuchung reagierten von allen 56 getesteten Isolaten 51 (91,1%) in den drei Nachweisen negativ. Eines hiervon wurde jedoch im Api 20E wegen einer stark abweichenden Zahlenkombination nicht als *Y. enterocolitica* 4/O:3 identifiziert. Die fünf (8,9%) Isolate der zwei Proben, die vom erwarteten Ergebnis abwichen, wurden auch vorher schon durch den Api 20E nicht als *Y. enterocolitica* 4/O:3 eingestuft.

Die Pathogenitätsnachweise bezüglich der plasmidkodierten Eigenschaften wurden mit Hilfe des CRMOX (Kongorot-Magnesium- Oxalat)- Agars durchgeführt. Von den 50 untersuchten Isolaten des Bioserotyps 4/O:3 reagierten alle (100%) positiv, das bedeutet, es konnte die Aufnahme von Kongorot und ein calciumabhängiges Wachstum festgestellt werden. Die sechs weiteren getesteten Isolate, die nicht *Y. enterocolitica* 4/O:3 zugeordnet wurden, reagierten unterschiedlich. Fünf Isolate von zwei verschiedenen Proben zeigten ein negatives Ergebnis. Das sechste Isolat einer weiteren Probe ergab eine positive CRMOX-Reaktion.

5 Diskussion

5.1 Vorkommen von pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3

Das Schwein wird als wichtigstes Reservoir humanpathogener *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme angesehen. Es liegt also nahe, dass eine menschliche *Y. enterocolitica*- Infektion durch den Verzehr von kontaminiertem Schweinefleisch verursacht werden kann. Die Übertragungswege sind jedoch noch nicht eindeutig nachgewiesen.

5.1.1 Vorkommen in rohen Schweinefleischprodukten

Das Vorkommen von pathogenen *Y. enterocolitica* war in den untersuchten Hackfleischproben mit 9,0 % am höchsten. Kontaminiertes Hackfleisch kann daher, wenn es unzureichend erhitzt oder sogar roh verzehrt wird, eine wichtige Quelle für humane Yersiniosen in Deutschland darstellen. Verglichen mit früheren Untersuchungen mit einer durchschnittlichen Befallsquote von 2,8% (**Tabelle 3**), zeigte sich die Prävalenz in dieser Untersuchung relativ hoch. Bei einem derartigen Vergleich müssen die unterschiedlichen Umstände, wie Art und Zeitpunkt der Probennahme, unterschiedliche Anreicherungs- und Selektivverfahren beachtet werden. Bei einer Untersuchung von NESBAKKEN et al. (1985) ergab sich eine ähnlich hohe Prävalenz (8%) von pathogenen *Y. enterocolitica* im Hackfleisch, jedoch wurde hier eine sehr geringe Zahl an Proben untersucht, was einen direkten Vergleich erschwert. Zu beachten ist, dass die tatsächliche Prävalenz eventuell sogar höher ist und lediglich mit den eingesetzten Methoden nicht entsprechend nachgewiesen werden kann. So ergab sich in Finnland bei einer Untersuchung von Schweinefleisch enthaltendem Hackfleisch mittels PCR- Verfahren eine Prävalenz von 25%, während die Isolationsrate mit dem Kulturverfahren nur 2% betrug (FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 1999).

Rohes Muskelfleisch zeigte in der vorliegenden Studie auch eine hohe (7,4 %), allerdings nicht ganz so hohe Prävalenz an pathogenen *Y. enterocolitica* wie in Hackfleisch. Gründe für diese Differenz kann es mehrere geben. Zum Ersten besteht während des Verarbeitungsvorganges die Gefahr der Kreuzkontamination durch *Y. enterocolitica*- haltiges Fleisch. Dies stellt nicht nur durch Beimischen zu

anderem Fleisch eine Kontaminationsquelle dar, sondern auch durch die Verunreinigung der Gerätschaften (z.B. Fleischwolf). Zum Anderen bietet Hackfleisch eine größere Oberfläche und damit einen guten Nährboden für besseres Wachstum der Keime. Darüber hinaus ist im Hackfleisch möglicherweise nicht nur reines Muskelfleisch, sondern zum Beispiel auch Kopffleisch enthalten. Dieses stellt aufgrund der Nähe zu den oftmals infizierten Tonsillen ein stark kontaminationsgefährdetes Produkt dar.

In den acht untersuchten Rohsalamiprobeen konnten keine pathogenen *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden. Da die untersuchte Anzahl sehr gering war, ist es schwer eine abschließende Bewertung vorzunehmen. Es liegen jedoch Untersuchungen vor, die zeigen, dass durch das Pökeln und die durch die Reifung entstehende pH- Wert- Senkung ein für Yersinien ungünstiges Milieu entsteht. Außerdem stellen die zur Reifung zugegebenen Bakterien eine Konkurrenzflora für *Y. enterocolitica* dar, die dadurch im Wachstum beeinträchtigt werden (KLEEMANN und BERGANN, 1996; NOPPINGER et al., 2000).

Die Untersuchung der Innereien kann aufgrund der geringen Probenzahl (n= 2) nicht als Maßstab herangezogen werden. Aus Untersuchungen von BUCHER (2001) und auch FREDRIKSSON- AHOMAA (2001) ist jedoch bekannt, dass Innereien häufig aufgrund des Schlachtvorganges mit *Y. enterocolitica* belastet sind. Als Ausgangspunkt für Kreuzkontaminationen während der Schlachtung vermuten die Autoren infizierte Tonsillen des jeweiligen oder benachbart hängenden Geschlinges, möglicherweise auch des Tierkörpers.

5.1.2 Vorkommen in erhitzten Schweinefleischprodukten

In den untersuchten erhitzten Lebensmittelproben wurden mittels der eingesetzten Methoden keine pathogenen *Y. enterocolitica* nachgewiesen. Die unterschiedliche Kontaminationsrate bei rohem (8,4%) und erhitztem (0%) Untersuchungsmaterial zeigt, dass die Erreger durch ausreichendes Erhitzen abgetötet werden. Die in **Tabelle 3** und **4** aufgeführten Untersuchungsergebnisse verschiedener Autoren zeigen ähnlich Ergebnisse im Bezug auf die Differenz der Befallsstärke zwischen rohen und erhitzten Nahrungsmitteln. Daher spielt die Kontamination von rohem

Schweinefleisch, solange dieses vor dem Verzehr ausreichend erhitzt wird, bezüglich der Infektion eine unwichtige Rolle.

In einer Untersuchung von LOGUE et al. (1996) wurden auch in gekochten Produkten hohe Prävalenzen an *Y. enterocolitica* festgestellt. Da hier lose Ware aus Delikatessläden eine höhere Nachweisrate zeigten als verpackte Produkte, kann man vermuten, dass eine Kontamination eventuell während des Zerlegens und der Verarbeitung des Produktes erfolgte (LOGUE et al., 1996).

5.2 Mögliche Kontaminationswege

Da das Muskelfleisch gesunder Schlachttiere, also auch beim Schwein normalerweise keinen originären Tiefenkeimgehalt aufweist, muss bei positiven Untersuchungsergebnissen in Fleischerzeugnissen primär von einer Kreuzkontamination ausgegangen werden. Als Hauptinfektionsquelle kommen die Tonsillen und der Kot eines infizierten Tieres in Betracht. Durch mangelnde Hygienemaßnahmen kommen häufig Kontaminationen weiterer Regionen oder sogar anderer Schlachttierkörper vor. Diese können in verschiedenen Stufen der Fleischproduktion und Verarbeitung vorkommen.

5.2.1 Kontamination während des Schlachtvorganges

Schon beim lebenden Tier kann eine Übertragung von infizierten auf nicht infizierte Tiere erfolgen, sei es beim Transport in verunreinigten Wagen oder bei der Aufstallung im Schlachthof. Während des gesamten Schlachtvorganges, vom Töten des Schweins bis hin zur Fleischuntersuchung und Zerlegung des Schlachtkörpers, bestehen immer wieder Möglichkeiten einer Kontamination, sei es durch verunreinigte Gerätschaften oder Maschinen (Töten, Enthaaren, Entfernen der Organe, Fleischuntersuchung und Zerlegen) oder durch kontaminiertes Spritzwasser und Blut oder sogar Kot (BUCHER, 2001; BORCH et al., 1996).

Methoden zur Vermeidung einer Kontamination, wie das Verschließen des Rektums, frühes Entfernen der Tonsillen und Änderungen der fleischhygienischen Untersuchungen sind wichtig, um die Gefahr einer Kontamination der Schlachtkörper zu verringern (NESBAKKEN et al., 1994). Daher wurde bereits vor

mehr als 20 Jahren der Ersatz der visuellen Prozesskontrolle durch mikrobiologische Stufenkontrollen gefordert (STOLLE, 1985) und ist heute Bestandteil der gültigen Fleischhygieneverordnung.

Oftmals sind sich die Mitarbeiter der Schlachthöfe nicht der Bedeutung von Hygiene und der damit verbundenen Vorbeugung von Gesundheitsmängeln bewusst. Daher wäre eine Verbesserung der Hygienestandards durch Schulungen des Personals und vermehrte Kontrollen ein wesentlicher Schritt, um Kontaminationen zu vermeiden.

5.2.2 Kontamination während der Verarbeitung

Die Kontaminationsrate des Hackfleisches in der vorliegenden Untersuchung erwies sich als ziemlich hoch. Eine Erklärung ist die mögliche Kontamination während des Verarbeitungsvorgangs. Als zusätzliche Gefahrenquellen für Kreuzkontaminationen müssen daher verunreinigte Gerätschaften bei der Verarbeitung von Fleischwaren, z.B. Hackfleischherstellung beachtet werden. Außerdem wird bei der Hackfleischherstellung die Oberfläche vergrößert und bietet so eine größere Angriffsfläche für Keime.

Auch im Verkauf der Fleischartikel besteht immer die Gefahr, dass die Keime von kontaminierten an nicht kontaminierte Produkten weitergegeben werden. Beispielsweise in einer Metzgerei, in der die Fleischprodukte in der Theke ausliegen und Kontakt zu anderen Fleischwaren oder Lebensmitteln haben. Auch die Kontamination von Fleisch, Wurstwaren und nicht fleischhaltigen Lebensmitteln, die unter Umständen ohne vorheriges Erhitzen verzehrt werden, kann auf diesem Wege erfolgen. Es ist unerlässlich für eine strikte Trennung zwischen Rohmaterial und bereits behandelten Produkten zu sorgen. Dies gilt sowohl für Industriebetriebe, als auch für Metzgereien.

Auch beim Endverbraucher kann durch Benutzung der gleichen Arbeitsfläche oder Geräte für Fleisch und andere Lebensmittel ohne Zwischenreinigung eine Kontamination von Nahrung stattfinden, die zum ungekochten Verzehr geeignet ist. Deshalb muss auch hier eine strikte Hygiene, wie zur Salmonellenvorsorge eingehalten werden.

5.2.3 Risiken bei der Lagerung

Durch die psychrotrophe Eigenschaft der Yersinien findet auch bei kühler Lagerung ($< +7^{\circ}\text{C}$), z.B. in Kühlräumen oder -schränken, keine effektive Eindämmung des Bakterienwachstums in kontaminierten Nahrungsmitteln statt. Werden solche Produkte unter diesen Bedingungen länger gelagert, kann ein signifikantes Wachstum der Mikroorganismen zu nahrungsbedingten Erkrankungen bei den Konsumenten führen (LOGUE et al., 1996). Selbst durch Einfrieren *Y. enterocolitica*-haltiger Produkte kann ein Wachstum beziehungsweise ein Fortbestehen des Keimes nicht ausgeschlossen werden. Daher stellt bereits die Beachtung der Hygienemaßnahmen in der Produktion einen sehr wichtigen und verbesserungswürdigen Punkt dar. Gelagerte Produkte sollten außerdem unter Beachtung strikter Hygienemaßnahmen verarbeitet und vor dem Verzehr ausreichend erhitzt werden.

5.3 Infektionsquellen für den Verbraucher

Der Genuss von rohem Fleisch birgt ein erhebliches Risiko einer alimentären Yersiniose. Gerade in Deutschland kann kontaminiertes Hackfleisch eine wichtige Quelle für humane Yersiniosen darstellen, da der Konsum von Mett, Hackepeter und ähnlichen Zubereitungen außerordentlich populär ist.

Eine Kontamination von rohem Fleisch stellt keine Gefahr dar, solange es ausreichend, d.h. auf eine Innentemperatur von mindestens $+60^{\circ}\text{C}$, erhitzt wird. Dennoch muss man immer von der Möglichkeit einer Querkontamination mit anderen Lebensmitteln ausgehen. Daher ist auf strengste Hygiene im Umgang mit rohem Fleisch zu achten.

Denn die durch Kreuzkontaminationen verunreinigten Speisen, die entweder roh verzehrt oder nach dem Kochen kontaminiert werden, stellen eine weitere Gefahrenquelle für die menschliche Infektion dar.

Auch Haustiere können eine weitere Infektionsquelle für den Menschen, speziell für Kinder sein. Pathogene Yersinien werden durch roh verfüttertes Schweinefleisch und Innereien auf Katzen und Hunde übertragen. Eine

Ansteckung des Menschen könnte über kontaminierte Faeces stattfinden (FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 2001b; FENWICK et al., 1994).

Zusammenfassend ist die Prävention einer Yersiniose, wie auch vieler anderer alimentär bedingter Erkrankungen, nur durch strengste Hygiene in allen Bereichen zu gewährleisten. Dies bedarf Schulungen der Mitarbeiter in der Produktion und einer umfassenden Aufklärung des Endverbrauchers, damit sich diese der Bedeutung von Hygiene im Bezug auf Infektionsverhütung bewusst werden.

5.4 Nachweis

Ein wesentliches Problem für den Nachweis von *Y. enterocolitica*, insbesondere aus Lebensmitteln, stellt die Anreicherung und die selektive Züchtung dar. Es ist bekannt, dass Stämme verschiedener Serotypen unterschiedliche Anforderungen an die Nährmedien stellen. Demzufolge werden eine Vielzahl von Medien für den kulturellen Erregernachweis empfohlen, ohne dass sich bisher ein Medium alleine als ausreichend erwiesen hat. In der vorliegenden Untersuchung wurden daher verschiedene Anreicherungsmedien parallel eingesetzt.

5.4.1 Anreicherungsverfahren

Die Tatsache, dass in einigen Proben auch durch den Direktausstrich *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden konnte, deutet auf einen erheblichen Ausgangskeimgehalt der Proben hin. Für den Nachweis von *Y. enterocolitica* im Direktausstrich muss eine große Anzahl von pathogenen *Y. enterocolitica* in der untersuchten Probe vorhanden sein, da diese bis dahin noch keinem Anreicherungsverfahren unterzogen worden ist. Außerdem wird eine kleine Anzahl dieser Keime leicht durch das kompetitive Wachstum der Begleitflora gehemmt.

Dass in der Über- Nacht- Anreicherung keinerlei pathogene Yersinien nachgewiesen wurden, lässt einen hohen Gehalt an Begleitflora vermuten, die trotz KOH- Behandlung die Kolonien der pathogenen *Y. enterocolitica* überwuchern. Möglich ist auch, dass die KOH- Behandlung nicht den ihr zgedachten Erfolg im Bezug auf die Verminderung anderer Keime bringt.

Auch die Kälteanreicherung wirkt nur begrenzt selektiv, da die Oberfläche der Fleischprodukte oft massiv mit anderen psychrotropen Bakterien kontaminiert ist. Somit ist auch hier die Gefahr der Überwucherung gegeben. Das erklärt die Tatsache, dass durch die Kälteanreicherung keinerlei pathogene Vertreter der Yersinien entdeckt werden konnten. In Anlehnung an WEBER (1982) wäre eine Untersuchung von Ausstrichen nach ein und zwei Wochen Kälteanreicherung eventuell eine Möglichkeit gewesen, mehr *Y. enterocolitica*- Kolonien zu finden.

In manchen Studien hat sich die Selektivanreicherung als das effektivste Verfahren herausgestellt (NESBAKKEN et al., 1985; BUCHER, 2001; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2001). Bei einem ausschließlichen Nachweis durch das modified Rappaport- und ITC- Medium kann davon ausgegangen werden, dass nur wenige pathogene Yersinien im Probenmaterial waren. Denn diese traten erst zum Vorschein nachdem die Begleitflora stark gehemmt wurde und sich der Keim ungehindert vermehren konnte. Dennoch bleibt zu beachten, dass es sich bei diesen Kultivierungsversuchen nur um einen qualitativen und nicht quantitativen Nachweis handelt und daher nur bedingt Rückschlüsse auf die in den Proben enthaltene Menge von pathogenen Yersinien gezogen werden können.

83,3% der als positiv *Y. enterocolitica*- haltig bewerteten Proben wurden mit der Selektivanreicherung ITC 1 angezüchtet. Mit der parallel eingesetzten Selektivanreicherung ITC 2 konnten nur 38,8% der positiven Proben isoliert werden. Dennoch zeigte sich auch dieses ITC- Verfahren als besser geeignet als die übrigen angewendeten Kultivierungsmethoden. Durch die Selektivanreicherung MRB und das Direktausstrichverfahren konnten jeweils nur in 22,2% und 16,6% der Proben *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden.

Die ITC 1 Selektivanreicherung ist ein Bestandteil der Untersuchungsmethoden der ISO/DIN 10273. Im Gegensatz dazu verwendet das Nordic Committee on Food anstelle der ITC 1 Selektivbouillon die MRB- Anreicherung. Der Nachweis findet bei beiden Methoden auf CIN- Nährboden statt.

Wäre die Selektivanreicherung ITC 1 in dieser Untersuchung nicht angewendet worden, wären 8 der mit *Y. enterocolitica* kontaminierten Proben (44,4%)

unentdeckt geblieben. Hingegen wären bei dem Auslassen der MRB-Anreicherung lediglich eine Probe (5,6%) nicht als positiv identifiziert worden. Ausschließlich durch den Einsatz der ITC 2- Bouillon konnten 2 Proben (11,1%) isoliert werden, die ohne den Einsatz dieser Selektivanreicherung als negativ gewertet worden wären.

Obwohl das ITC- Verfahren gute Untersuchungsergebnisse bezüglich des qualitativen Nachweises erbrachte, konnten pathogenen *Y. enterocolitica* in drei Proben nicht nachgewiesen werden. Daher sind für einen möglichst effektiven Nachweis mehrere Anreicherungsverfahren notwendig.

Zu erwähnen bleibt noch, dass ein Nachweis mittels PCR am verlässlichsten ist, da trotz des kompetitiven Wachstums der Begleitflora ein Nachweis einzelner Keime möglich ist (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2001).

5.4.2 Identifizierung durch Api 20E

Das Testsystem Api 20E hat sich für eine vorläufige Identifizierung durchaus als geeignet erwiesen. 24 der 34 untersuchten Isolate (70,6%) konnten eindeutig als *Y. enterocolitica* identifiziert werden. Sieben Isolate zeigten Abweichungen im Testkit, die dennoch auf den Genus *Y. enterocolitica* schließen ließen. Diese Isolate konnten erst nach der Biotypisierung sicher als *Y. enterocolitica*-haltig eingeordnet werden. SAUER (1996) und BUCHER (2001) kamen im Rahmen ihrer Untersuchungen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass der Api 20E sehr gut für eine schnelle Identifikation verwendbar ist, auch wenn danach eine genauere Untersuchung folgen sollte.

5.4.3 Identifizierung durch Bio- und Serotypisierung

Die Isolate, die durch den Api 20E vorläufig identifiziert worden waren, konnten gezielt bio- und serotypisiert werden. Diese isolierten Keime wurden mit der Biotypisierung als potenziell pathogen angesprochen. Auch die im Ergebnis des Api 20E abweichenden Isolate wurden der gleichen Biotypisierung unterzogen. Die Biotypisierung stellt einen umfangreichen, aber auch zuverlässigen Nachweis dar. Eine Durchführung dieser etwas aufwendigen Untersuchung ist als essentiell anzusehen, da die Ergebnisse der Testkits nicht immer eindeutig sind. Die

Bestätigung durch das Antiserum gegen *Y. enterocolitica* O:3 wurde bei allen Isolaten durchgeführt, die durch die vorangegangenen Tests als pathogen eingestuft worden waren. Sie fiel bei allen untersuchten Isolaten positiv aus. Die Serotypisierung stellt einen sehr einfachen Test dar, der in jedem Routinelabor durchgeführt werden kann.

5.4.4 Pathogenitätstest

Der Pathogenitätstest für die chromosomal kodierten Eigenschaften, erwies sich als sehr zuverlässig, auch wenn die Durchführung etwas arbeits- und zeitaufwendig ist. Das Fehlen der Fähigkeit Pyrazinamid, Aeskulin und Salicin abzubauen kann deutlich an den entsprechenden Nährmedien mittels Indikatorumschlag abgelesen werden. Auch der Nachweis auf dem Kongorot-Magnesium- Oxalat- Agar für plasmidtragende *Y. enterocolitica* hat sich als effektiv erwiesen. Der indirekte Nachweis des Virulenz- Plasmids, durch die Calciumabhängigkeit und die Absorption von Kongorot kann deutlich und leicht an den dunkelorange-farbenen kleinen Kolonien abgelesen werden. Darüber hinaus ist der Test auf dem CRMOX- Agar leicht durchführbar und daher für jedes Routinelabor einsetzbar.

6 Zusammenfassung

Zwischen Mai und August 2000 wurden 300 Proben von schweinefleischhaltigen Lebensmitteln entnommen. Das Untersuchungsmaterial bestand aus 85 erhitzten Proben, wie gekochtem Schinken, Leberkäse, Brühwürsten und Fertiggerichten, und 215 unerhitzten Proben. Den Hauptanteil der nicht erhitzten Schweinefleischprodukte machten 178 Hackfleischproben aus. Außerdem zählten zu den unerhitzten Schweinefleischprodukte auch noch 27 Muskelfleisch-, acht Rohsalami- und zwei Innereienproben.

Diese wurden mittels Kultivierungsmethoden auf das Vorhandensein von pathogenen *Y. enterocolitica* Vertretern untersucht. Der Nachweis wurden in Anlehnung an die ISO DIN 10273 und die Methoden des Nordic Committee on food analysis Nr. 117 mittels Direktausstrich auf CIN Agar, Übernacht-Anreicherung mit KOH- Selektion, Selektivanreicherung in ITC und MRB und Kälteanreicherung durchgeführt. Typische Kolonien, die „Kuh- Augen“ auf CIN-Agar zeigten und Urease- positiv waren, wurden mithilfe des Api 20E identifiziert. *Y. enterocolitica* Isolate wurden bio- und serotypisiert. Das Vorhandensein des Virulenzplasmids wurde auf CRMOX- Agar getestet.

Ein Nachweis von *Y. enterocolitica* 4/O:3 gelang bei 15 Hackfleischproben (9,0%) und bei zwei nicht gekochten Gulaschproben (7,4%). In den untersuchten, erhitzten Schweinefleischprodukten konnten keine pathogenen *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden.

Von den angewandten Nachweisverfahren zeigte sich die Selektivanreicherung ITC1 mit einer Nachweisrate von 83,3% am erfolgreichsten. Der Nachweis mit ITC2 (38,8%), MRB (22,2%) und dem Direktausstrich (16,6%) aus dem gleichen Probenmaterial fiel deutlich geringer aus. Ein Nachweis von *Y. enterocolitica* nach der Über- Nacht- Anreicherung oder der Kälteanreicherung war nicht möglich.

Die starke Kontamination von rohem Fleisch, speziell von Hackfleisch, stellt eine Gefahrenquelle für Infektionen des Menschen dar. Nicht nur der Genuss von rohen Produkten aus Schweinefleisch, z.B. Zwiebelmettwurst, sondern auch unzureichendes Erhitzen und Kreuzkontamination anderer Lebensmittel müssen als mögliche Infektionswege beachtet werden.

7 Summary

Occurrence of pathogenic *Y. enterocolitica* 4/O:3 in pork in southern Germany

The prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pork products in Southern Germany was studied because no data is available of distribution of this pathogen at retail level in Germany. A total of 300 meat products containing pork from different plants were collected between May and August year 2000. These samples consist of 215 raw and 85 heat-treated products. The samples were studied with different culture methods: direct plating, overnight enrichment in TSB combined with alkali treatment, selective enrichment in MRB and ITC, and cold enrichment in TSB followed by alkali treatment. *Y. enterocolitica* was isolated from selective CIN agar plates. Urea-positive colonies were identified using API 20E. *Y. enterocolitica* isolates were bio- and serotyped, and the pathogenicity was confirmed with Congo red binding and Calcium dependence on CRMOX agar plates. Pathogenic *Y. enterocolitica* was recovered from raw meat products but not from heat-treated products. The isolation rate of *Y. enterocolitica* 4/O:3 in minced meat was 9.0%. This type was also found two times (7.4%) from raw pork. All pathogenic *Y. enterocolitica* isolates were belonging to bioserotype 4/O:3. Selective enrichment in ITC was shown to be the most productive method for raw meat products. No pathogenic *Y. enterocolitica* isolates could be recovered after non-selective enrichment even when combined with alkali treatment. These results show that raw pork can be one source of *Y. enterocolitica* 4/O:3 infections among humans in Southern Germany. This study also demonstrates that no pathogenic *Y. enterocolitica* can be found without selective enrichment.

8 Anhang

8.1 Verwendete Medien für den Nachweis von *Y. enterocolitica*

8.1.1 Feste Medien

CIN-Agar (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar)

Basismedium:

<i>Yersinia</i> Agar Basis (OXOID, CM 653)	29 g
Destilliertes Wasser	ad 500 ml

Zum Lösen erhitzen

Sterilisieren 15 min. bei +121°C

zugeführtes Supplement:

Yersinia Selektiv Supplement (gefriergetrocknetes Selektiv-Supplement zur Isolierung von *Yersinia*-Spezies) (OXOID, SR 109E)

Ethanol absolut (vergällt) (MERCK, 1.00974)	1 ml
Destilliertes Wasser	1 ml

Zugabe des Supplementes bei Abkühlung des Basismediums auf +50°C

Abfüllen je ca. 12,5 ml in sterile Petrischalen

TSA-Agar (Tryptic soy agar/CASO-Agar)

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CASO-Agar) (Merck, 1.05458)	40 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

UREA-Agar

Basismedium.

Harnstoff-Pepton-Agar-Basis nach Christensen (OXOID, CM 53)	2,4 g
Destilliertes Wasser	ad 95 ml

Zum Lösen erhitzen

Sterilisieren 15 min. bei +121°C

zugeführte Lösung

Harnstoff-Lösung 40 % (OXOID, SR 020U) 5 ml

Je 5 ml in sterile Reagenzglasröhrchen abfüllen

Zum Trocknen schräg lagern

Aeskulin-Agar

Nutrient Agar Bacto® (DIFCO, 213000) 40 g

Esculin (SIGMA, E-8250) 1 g

Destilliertes Wasser ad 1000 ml

Mischen und erhitzen

Sterilisation 15 min. bei +121°C

Abfüllen je ca. 15 ml in sterile Petrischalen

Tween-Esterase-Agar

Nutrient Agar Bacto® (DIFCO, 213000) 14 g

Destilliertes Wasser ad 500 ml

Zum Lösen erhitzen

Tween 80 zur Synthese (MERCK, 822187) 5 ml

Zugabe von Tween 80 und erneut erhitzen für 5 min.

Sterilisieren für 15 min. bei +121°C

Pyrazinamidase-Agar

CASO-Agar (MERCK, 1.05458)	30 g
Pyrazinamid (SIGMA, P-7136)	1 g
Tris-Hydrochlorid (SIGMA, T-3253)	31,5 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

Mischen der Komponenten mit ca. 800 ml destilliertem Wasser

Einstellung des pH-Wertes auf 6,0

Ggf. Angleichung des pH-Wertes mit 1N NaOH

Auffüllen mit destilliertem Wasser auf 1 Liter

Abfüllen in Reagenzglasröhrchen zu je 5 ml

Sterilisieren 15 min. bei +121°C

Abkühlen in schräger Position

Indikator

Ammoniumferrosulfat-Lösung (NH₄)₂Fe(SO₄)₂
(MERCK, 103792)

Destilliertes Wasser	ad 100 ml
----------------------	-----------

CRMOX-Agar

(Kongorot-Magnesium-Oxalate-Medium)

CASO-Agar (MERCK, 105458)	40 g
Natriumoxalat (SIGMA, S-9265)	3 g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ 6H ₂ O) (Merck, 105833)	4 g
D(+)-Glucose (MERCK, 108337)	2 g
Kongorot (100%) (SIGMA, C-6767)	50 mg
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

Zum Lösen erhitzen

Bei +121°C für 15 min. autoklavieren

Abfüllen je ca. 15 ml in sterile Petrischalen

8.1.2 Flüssige Medien

TSB-Nährbouillon

(Tryptone Soja Broth/Caseinpepton-Sojamehl-Pepton-Lösung)

Caseinpepton-Sojamehl-Pepton-Lösung (CASO-Agar)

(OXOID, CM 129)	30 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

Mischen und ggf. zum Lösen erhitzen

Abfüllen in je 100 ml in Erlenmeyerkolben

Sterilisieren 15 min. bei +121°C

ITC-Nährbouillon

(Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Nährbouillon)

Trypton (OXOID, L42)	10,0 g
Hefe Extrakt (OXOID, L21)	1,0 g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ 6H ₂ O)	
(MERCK, 1.05833)	60,0 g
Natriumchlorid (NaCl) (MERCK, 106404)	5,0 g
Kaliumchlorat (KClO ₃) (MERCK, 1.06580.0500)	1,0 g
Malachitgrün (0,2%ige wässrige Lösung)	
(MERCK, 1.01398)	5 ml
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

Einstellung des pH-Wertes bei ca. +25°C auf 7,1-7,6

Verteilung von jeweils 10 ml in Reagenzglasröhrchen

Sterilisieren 15 min. bei +121°C

Zugabe von Supplementen:

Zugabe von jeweils 10 µl der folgenden Lösungen zu jedem Reagenzglas

Ticarcillin-Lösung 0,1%

Ticarcillin Disodium (DUCHEFA, T 0180)	10 mg
Steriles destilliertes Wasser	10 ml

Irgasan-Lösung 0,1%	
Irgasan® DP 300 (CIBA)	10 mg
Ethanol absolut (vergällt) (MERCK, 100974)	10 ml

MRB-Nährbouillon

(Modifizierte Rappaport-Bouillon)

Trypton (OXOID, L42)	7,0 g
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) (MERCK, 106559)	2,0 g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ 6H ₂ O) (MERCK, 105833)	80,0 g
Malachitgrün (0,2 %ige wässrige Lösung) (MERCK, 101398)	6 ml
Wasser	ad 1000 ml

Abfüllen von je 10 ml in Reagenzglasröhrchen

Sterilisieren 15 min. bei +121 °C

Medium für die Fermentation von Kohlenhydraten

Basismedium

Peptonwasser gepuffert (MERCK, 107228)	10 g
Natriumchlorid (NaCl) (MERCK, 106404)	5 g
Phenolrot (SIGMA, P-4133)	0,02 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

Mischen der Komponenten, wenn nötig erhitzen

Einstellung des pH-Wertes bei ca. +25°C auf 6,8

Abfüllen von je 5 ml in Reagenzglasröhrchen

Sterilisieren für 15 min bei +121°C

Kohlenhydrat-Lösung (Trehalose, Xylose und Salicin)

D(+)-Xylose (SIGMA, X-3877-25G)

Salicin (SIGMA, S-0625-25G)

D(+)-Trehalose (SIGMA, T-5251)

Zubereitung von Trehalose- und Xylose-Lösung je 10 %ig (10 g Zucker/100 ml H₂O) und Salicin 5 %ig (10 g Zucker/200 ml H₂O), Sterilisation durch Filtration mit Sterilfilter

Gebrauchsfertige Lösung:

zu dem Basismedium 500 µl der Xylose- oder Trehalose-Lösung bzw. 1 ml der Salicin-Lösung steril zugeben

Röhrchen bei +30°C für 2-3 Tage lagern, um eine Kontamination des Mediums auszuschließen, die durch eine Farbveränderung erkennbar wäre

8.2 Aufbewahrungsmedium

Mikrobank

Microbank[®] (PRO-LAB DIAGNOSTICS, PL 160) zur Aufbewahrung von Keimen

8.3 Testsysteme und Reagenzien

Api 20E

Testsystem zur Identifizierung von Enterobacteriaceae
bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France

Umfasst folgende Tests:

β-Galactosidase, Arginindihydrolase, Lysindecaboxylase, Ornitindecaboxylase, Citratabbau, H₂S-Produktion, Urease, Tryptophandesaminase, Indolproduktion, Acetoinproduktion, Gelatinase, Fermentation/Oxidation von: Glucose, Mannit, Inosit, Sorbit, Rhamnose, Saccharose, Melibiose, Amygdalin, Arabinose

zusätzlich benötigte Reagenzien:

TDA Reagenz	70400 (bioMérieux)
JAMES Reagenz	70540 (bioMérieux)
VP 1 Reagenz	70420 (bioMérieux)
VP 2 Reagenz	70430 (bioMérieux)
NIT 1 Reagenz	70440 (bioMérieux)
NIT 2 Reagenz	70450 (bioMérieux)
Paraffin dickflüssig (MERCK, 107160)	

Serotypisierung

Monospezifisches Testserum "Anti-*Yersinia enterocolitica*"

Anti-*Yersinia enterocolitica* O:3 (TS 1701, SIFIN)

8.4 Geräte und Hilfsmittel**Waagen**

Laborwaage MC1 Typ LC 6200 D	SARTORIUS
Laborwaage Typ L 2200 P	SARTORIUS
Laborwaage BABA 200	SARTORIUS

Magnetrührer mit Heizplatte

Typ RCT JANKE & KUNKEL	IKA-LABORTECHNIK
Typ RCH JANKE & KUNKEL	IKA-LACORTECHNIK
Magnetrührwerk MR 2002	HEIDOLPH

Pipetten

Reference [®] fix 1000 µl	EPPENDORF
Reference [®] variabel 10-100 µl	EPPENDORF
Reference [®] variabel 100-1000 µl	EPPENDORF
Transferpipette 1000 µl	BRAND

Pipettenspitzen

Standartips 100 µl	EPPENDORF
Standartips 1000 µl	EPPENDORF

Pipettierhilfe

pipetus [®] -akku	HIRSCHMANN
----------------------------	------------

Dispensierhilfe

Dispensette [®] 0-10 ml	BRAND
----------------------------------	-------

Glaspipetten

Silberbrand-Eterna, Klasse B, 5 ml	BENDER & HOBEIN
Silberbrand-Eterna, Klasse B, 10 ml	BENDER & HOBEIN

Reagenzgläser

Reagenzgläser 160x16 mm	SCHOTT
-------------------------	--------

Reagenzglas-Schüttelgerät

Vibro-FixVF 2 JANKE & KUNKEL	IKA-LABORTECHNIK
------------------------------	------------------

Wattestopfen

STERI-Wattestopfen Nr. 14	SCHUBERT
---------------------------	----------

Messzylinder

Messzylinder 20 ml	BRAND
Messzylinder 100 ml	BRAND
Messzylinder 500 ml	BRAND
Messzylinder 1000 ml	BRAND

Aufbewahrungsgefäße

Erlenmeyerkolben 100 ml	MERCK
Erlenmeyerkolben 200 ml	MERCK

Erlenmeyerkolben 500 ml	MERCK
Erlenmeyerkolben 1000 ml	MERCK

Aludeckel

Aludeckel Ø 8 cm	MERCK
Aludeckel Ø 10 cm	MERCK
Aludeckel Ø 13 cm	MERCK

Kühlschränke

Kühl-Gefrier-Kombination Typ „Premium“	LIEBHERR
FKS 5000 Index 10C Typ 200071	LIEBHERR

Brutschränke

Typ B 6060	HERAEUS INSTRUMENTS
Typ B 6200	HERAEUS INSTRUMENTS
Typ B 6420	HERAEUS INSTRUMENTS

Autoklav

Tischautoklav Typ 3850EL	TUTTNAUER SYSTEC
Hochdruckdampf-Sterilisator Typ 112 GMBH	KSG STERILISATOREN

Petrischalen

sterile Petrischalen Nr. 100	WALDECK
------------------------------	---------

Sicherheitsbrenner

Fireboy S 1000	TECNOMARA AG
Gasi Fabrik-Nr.: 94113	SCHÜTT

Sterilbank

Sterilbank BSB	GELAIRE®
----------------	----------

Mikrobank

Microbank™ Product Code PL.160

PRO-LAB DIAGNOSTICS

pH-Meter

pH 535 Miltical mit Temperaturabgleich

WTW

Objektträger

Objektträger einfach 76 x 26 mm

MENZEL-GLÄSER

Filter

Sterilfilter Einmal Filterhalter 0,2 µm

SCHLEICHER & SCHUELL

Spritzen

Injekt 10 ml Luer

BRAUN

Ösen

Platin/Iridium-Ösen 90/10

BENDER & HOBEIN

Handschuhe

Einmal-Handschuhe PE gehämmert

MERCK

Tupfermaterial

Einfachtupfer, 16-lagig, 5x5 cm

HOFFMANN

Plastikbeutel

sterile Kunststoffbeutel (Stomacher '400' Bags)

SEWARD

8.5 Ergebnisse der Untersuchungen

Tabelle 15: Übersicht über die untersuchten Proben und Isolate

Nr	Probe	Isolate	D	ON	I1	I2	M	C	Api	pyz	sal	aes	tw	ind	xyl	tre	mox	O:3
YEF1	Bratwurst																	
YEF2	Bratwurst																	
YEF3	Bratwurst																	
YEF4	Hackfleisch	4.111			+				10155231	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		4.211			+					-	-	-	-	-	-	+	+	+
		4.112				+			10155231	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		4.212				+				-	-	-	-	-	-	+	+	+
YEF5	Hackfleisch	5.111			+				10155231	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		5.211			+					-	-	-	-	-	-	+	+	+
		5.112				+			10155231	-	-	-	-	-	-	+	+	+
YEF6	Vorderschinken																	
YEF7	Bratwurst																	
YEF8	Bratwurst																	
YEF9	Hackfleisch	9.111			+				10155231	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		9.211			+													
YEF10	Hackfleisch																	
YEF11	Bavarian Ham																	
YEF12	Hackfleisch	12.111			+				10155230	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		12.211			+				10155231	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		12.112				+			10155231	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		12.212				+				-	-	-	-	-	-	+	+	+
YEF13	Bratwurst																	
YEF14	Hackfleisch																	
YEF15	Hackfleisch																	
YEF16	Hackfleisch																	
YEF17	Hackfleisch																	
YEF18	Hackfleisch																	
YEF19	Hackfleisch																	
YEF20	Hackfleisch																	
YEF21	Bratwurst																	
YEF22	Bauernknacker																	
YEF23	Hackfleisch																	
YEF24	Hackfleisch																	
YEF25	Hackfleisch	25.1D	+						10155231	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		25.2D	+							-	-	-	-	-	-	+	+	+
		25.111			+				10155231	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		25.211			+					-	-	-	-	-	-	+	+	+
		25.1M					+		10155231	-	-	-	-	-	-	+	+	+
YEF26	Hackfleisch	26.111			+				10155231	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		26.211			+					-	-	-	-	-	-	+	+	+
YEF27	Spiess																	
YEF28	Spiess	28.111			+				12151730	+	+	+	-		+	+	-	
		28.2.11			+					(+)	+	+	-		+	+	-	

Nr	Probe	Isolate	D	ON	I1	I2	M	C	Api	pyz	sal	aes	tw	ind	xyl	tre	mox	O:3
YEF 243	Fleischwaren in Stangen																	
YEF 244	Hackfleisch																	
YEF 245	Spieß																	
YEF 246	Hackfleisch																	
YEF 247	Hackfleisch																	
YEF 248	Hackfleisch																	
YEF 249	Hackfleisch																	
YEF 250	Weißwurst																	
YEF 251	Schinken gek																	
YEF 252	Wiener																	
YEF 253	Weißwurst																	
YEF 254	Wiener																	
YEF 255	Schinken roh																	
YEF 256	Weißwurst																	
YEF 257	Hackfleisch																	
YEF 258	Leberkäs																	
YEF 259	Hackfleisch																	
YEF 260	Hackfleisch																	
YEF 261	Hackfleisch																	
YEF 262	Niere																	
YEF 263	Hackfleisch																	
YEF 264	Schinken gek																	
YEF 265	Bratwurst																	
YEF 266	Schinken gek																	
YEF 267	Leber																	
YEF 268	Hackfleisch																	
YEF 269	Hackfleisch																	
YEF 270	Hackfleisch																	
YEF 271	Hackfleisch																	
YEF 272	Hackfleisch																	
YEF 273	Hackfleisch																	
YEF 274	Hackfleisch																	
YEF 275	Hackfleisch																	
YEF 276	Gulasch gek																	
YEF 277	Gulasch gek																	
YEF 278	Hackfleisch																	
YEF 279	Hackfleisch																	
YEF 280	Hackfleisch																	
YEF 281	Hackfleisch																	
YEF 282	Hackfleisch																	
YEF 283	Knacker																	
YEF 284	Wiener																	
YEF 285	Hackfleisch																	
YEF 286	Bratwurst																	
YEF 287	Hackfleisch																	
YEF 288	Hackfleisch																	
YEF 289	Hackfleisch	289.111					+		10145221	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Nr	Probe	Isolate	D	ON	I1	I2	M	C	Api	pyz	sal	aes	tw	ind	xyl	tre	mox	O:3
YEF 290	Hackfleisch																	
YEF 291	Hackfleisch																	
YEF 292	Hackfleisch																	
YEF 293	Hackfleisch																	
YEF 294	Hackfleisch																	
YEF 295	Hackfleisch																	
YEF 296	Hackfleisch																	
YEF 297	Hackfleisch	297.1 I1			+				10155220	-	-	-	-		-	+	+	+
YEF 298	Hackfleisch																	
YEF 299	Hackfleisch																	
YEF 300	Bratwurst																	

Nr	Probennummer
D	Direkter Ausstrich auf selektive CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin -Agar) Platte
ON	Voranreicherung in TSB (Tryptone Soja Bouillo) über 24 h
ITC1	Selektive Anreicherung (Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat -Bouillon) ohne Voranreicherung
ITC2	Selektive Anreicherung (Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat -Bouillon) nach Voranreicherung über 24 h in TSB
MRB	Selektive Anreicherung (Modifizierte Rappaport -Bouillon)
C	Kälte Anreicherung in TSB über 21 d
Api	Zahlekombinasion im Testkit Api 20E
pyz	Pyrazinamidase
sal	Salicin
aes	Aeskulin
Tw	Tween-Esterase
ind	Indol
xyl	Xylacin
mox	CRMOX (Kongorot-Magnesium-Oxalate)
O:3	Serotyp O:3

9 Literaturverzeichnis

ABER, R.C. (1990)

Transfusion-associated Yersinia enterocolitica

Transfusion, 30: 193- 195

ALEKSIC, S., BOCKEMÜHL, J. (1990)

Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen

Immun. Infekt., 18: 178- 185

AULISIO, C.C.G., MEHLMANN, I.J., SANDERS, A.C. (1980)

Alkali method for rapid recovery of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis from food

Appl. Environ. Microbiol., 39: 135

AULISIO, C.C.G, HILL, W.E., STANFIELD, J.T., MORRIS, J.A. (1983)

Pathogenicity of Yersinia enterocolitica demonstrated in the suckling mouse

J. Food Prot., 46: 856- 860/ 863

BAKOUR, R., BALLIGAND, G., LAROCHE, Y., CORNELIS, G., WAUTERS, G. (1985)

A simple adult mouse test for tissue invasiveness in Yersinia enterocolitica strains of low experimental virulence

J. Med. Microbiol. 19: 237- 246

BERCOVIER, H., MOLLARET, H.H. (1984)

Genus XIV. Yersinia

In: Krieg, N.R. (Hrsg.), Bergey's manual of systematic bacteriology

Williams & Wilkins, Baltimore, USA, Vol. 1, S. 498- 506

BÖLIN, I., NOLANDER, L., WOLF-WATZ, H. (1982)

Temperature-inducible outer membrane protein of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica is associated with the virulence plasmid

Infect. Immun., 37: 506- 512

- BORCH, E., NESBAKKEN, T., CHRISTENSEN, H. (1996)
Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria
Int. J. Food Microbiol., 30: 9- 25
- BOTTONE, E.J. (1997)
Yersinia enterocolitica: The charisma continues
Clin. Microbiol. Rev., 10: 257- 276
- BOYCE, J.M., EVANS, D.J. jr., EVANS, D.G., DUPONT, H.L. (1979)
Production of heat-stable, methanol-soluble enterotoxin by Yersinia enterocolitica
Infect. Immun., 25: 532- 537
- BUCHER, M. (2001)
Ein Beitrag zur Epidemiologie von Yersinia enterocolitica in Schlachtnebenprodukten vom Schwein unter besonderer Berücksichtigung methodischer Aspekte
Diss. med. vet., München
- BUCHER, M., FREDRIKSSON- AHOMAA, M., STOLLE, A. (2002a)
Vorkommen von Yersinien- Arten in Kälbern und Jungrindern
Fleischwirtschaft, 9: 125- 127
- BUCHER, M., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., STOLLE, A. (2002b)
Vorkommen von Yersinia enterocolitica in Puten
43. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG,
Garmisch-Partenkirchen
- CARNIEL, E. (1995)
Chromosomal virulence factors of Yersinia
Contr. Microbiol. Immunol., 13: 218- 224
- CATTABIANI, F., OSSIPRANDI, M.C., FRESCHI, E. (1995)
Isolation of Yersinia enterocolitica from horses
Igiene moderna, 103: 6, 675- 682

- CHENG, L.W., SCHNEEWIND, O. (1999)
Yersinia enterocolitica type III secretion
J. Biol. Chem. 274: 22101- 22108
- CHIESA, C., PACIFICO, L., GIAMPIETRO, R. (1993)
Identification of pathogenic serotypes of Yersinia enterocolitica
J. Clin. Microbiol., 31: 2248- 2250
- CHRISTENSEN, S.G. (1987)
The Yersinia enterocolitica situation in Denmark
Contr. Microbiol. Immunol., 9: 93- 97
- CORNELIS, G. (1998)
The Yersinia deadly kiss
J. Bacteriol., 180: 5495- 5584
- CORNELIS, G., LAROCHE, Y., BALLIGNAD, G., SORY, M.-P., WAUTERS, G.
(1987)
Yersinia enterocolitica, a primary model for bacterial invasiveness
Rev. Infect. Dis., 9: 64- 87
- COX, N.A., DEL CORRAL, F., BAILEY, J.S., SHOTTS, E.B., PAPA, C.M. (1989)
*The presence of Yersinia enterocolitica and other Yersinia species on
the carcasses of market broilers*
Poultry Sci., 69: 482- 485
- DE BOER, E. (1992)
Isolation of Yersinia enterocolitica from foods
Int. J. Food Microbiol., 59: 442- 450
- DE BOER, E. (1995)
Isolation of Yersinia enterocolitica from foods
Contr. Microbiol. Immunol., 13: 71- 73
- DE BOER, E., SELDAM, W.M. (1987)
Comparison of methods for the isolation of Yersinia enterocolitica from

porcine tonsils and pork

Int. J. Food Microbiol., 5: 95- 101

DE BOER, E., NOUWS, J.F.M. (1991)

Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic Yersinia enterocolitica

Int. J. Food Microbiol., 12: 375- 378

DE KONING-WARD, T.F., WARD, A.C., ROBINS-BROWNE, R.M. (1994)

Characterization of the urease-encoding gene complex of Yersinia enterocolitica

Gene, 145: 25- 32

DE KONING-WARD, T.F. ROBINS-BROWNE, R.M. (1995)

Contribution to urease to acid tolerance in Yersinia enterocolitica

Infect. Immun. 63: 3790- 3795

DELOR , I., KAECKENBEEK, A., WAUTERS, G., CORNELIS, G.R. (1990)

Nucleotide sequence of yst, the Yersinia enterocolitica gene encoding the heat- stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and non- pathogenic Yersiniae

Infect. Immun. 58: 2983- 2988

DOYLE, M.P., HUGDAHL, M.B. (1983)

Improved procedure for recovery of Yersinia enterocolitica from meats

Appl. Environ. Microbiol., 45: 127- 135

DUDLEY, M.V., SHOTTS, E.B. (1979)

Medium for isolation of Yersinia enterocolitica

J. Clin. Microbiol., 10: 180- 183

DURISIN, M.D., IBRAHIM, A., GRIFFITHS, M.W. (1997)

Detection of pathogenic Yersinia enterocolitica in milk and pork using DIG- labelled probe targeted against the yst gene

Int. J. of Food Microbiol., 37: 2- 3, 103- 112

EL TAHIR, Y., SKURNIK, M. (2001)

YadA, the multifaceted Yersinia adhesin

Int. J. Med. Microbiol., 291: 209- 218

FARMER, J.J., CARTER, G.P., MILLER, V.L., FALKOW, S., WACHSMUTH, I.K.
(1992)

*Pyrazinamidase, CR-MOX agar, salicin fermentation, esculin hydrolysis,
and d-xylose fermentation for identifying pathogenic serotypes of
Yersinia enterocolitica*

J. Clin. Microbiol., 30: 2589- 2594

FENWICK, S.G., MADIE, P., WILKS, C.R. (1994)

*Duration of carriage and transmission of Y. enterocolitica biotype 4,
serotype O:3 in dogs*

Epidemiol. Infect. 113: 471- 477

FREDERIKSEN, W. (1964)

*A study of some Yersinia pseudotuberculosis-like bacteria (Bacterium
enterocoliticum and Pasteurella X)*

14. Scand. Congr. Pathol. Mikrobiol., Oslo, Proc. S. 103- 104

Zit. n. BERCOVIER und MOLLARET (1984)

FREDRIKSSON-AHOMAA, M. (2001)

Molecular epidemiology of yadA- positive Y. enterocolitica

Academic diss., Helsinki, Finland

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., HIELM, S., KORKEALA, H. (1999)

*High prevalence of yadA-positive Yersinia enterocolitica in pig tongues
and minced meat at retail level*

J. Food Prot., 62: 123- 127

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., BUCHER, M. STOLLE, A. (2000a)

*Prevalenz von Yersinia enterocolitica Bioserotype 4/O:3 in Tonsillen bei
Schlachtschweinen in der Region München*

41. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG,
Garmisch-Partenkirchen, Teil I Vorträge, S. 116- 122

- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., KORTE, T., KORKEALA, H. (2000b)
Contamination of carcasses, offals and the environment with yadA-positive Yersinia enterocolitica in a pig slaughterhouse
J. Food Prot., 63: 31- 35
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., HALLANVUO, S., KORTE, T., SIITONEN, A., KORKEALA, A. (2001a)
Correspondence of genotypes of sporadic Yersinia enterocolitica 4/O:3 strains from human and porcine origin
Epidemiol. Infect., 127: 37- 47
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., KORTE, T., KORKEALA, H. (2001b)
Transmission of Yersinia enterocolitica 4/O:3 to pets via contaminated pork
Lett. Appl. Microbiol., 32: 375- 378
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., LYHS, U., KORTE, T., KORKEALA, H. (2001c)
Prevalence of pathogenic Yersinia enterocolitica in food samples at retail level in Finland.
Arch. Lebensmittelhyg., 52: 66- 68.
- FUKUSHIMA, H. (1987)
New selektiv agar medium for isolation of virulent Yersinia enterocolitica
J. Clin. Microbiol., 25: 1068- 1073
- FUKUSHIMA, H., NAKAMURA, R., ITO, Y., SAITO, K., TSUBOKURA, M., OTSUKI, K. (1984)
Ecological studies of Yersinia enterocolitica. II. Experimental infection with Y. enterocolitica in pigs
Vet. Microbiol., 9: 375- 381
- FUKUSHIMA, H., GOMYODA, M. (1986)
Inhibition of Yersinia enterocolitica serotype O:3 by natural microflora of pork
Appl. Environ. Microbiol., 51: 990- 994

- FUKUSHIMA, H., HOSHINA, K., ITOWA, H., GOMYODA, M. (1997)
Introduction into Japan of pathogenic Yersinia through imported pork, beef and fowl
Int. J. Food Microbiol., 35: 205- 212
- GRIPENBERG-LERCHE, C., ZHANG, L., AHTONEN, P., TOIVANEN, P., SKURNIK, M. (2000)
Construction of urease-negative mutants of Yersinia enterocolitica serotypes O:3 and O:8: role of urease in virulence and arthritogenicity
Infect. Immun., 68: 942- 947
- HAHN, G. (1989)
Yersinia – Yersiniosen
In: Heeschen, W. (Hrsg.), Pathogene Mikroorganismen und deren Toxine in Lebensmitteln tierischer Herkunft
Behr's Verlag, Hamburg, S. 127
- HALLMANN, L. (1953)
Bakteriologische Nährmedien – Ausgewählte Nährbodenrezepturen für das medizinisch-bakteriologische Laboratorium
Gerorg Thieme Verlag, Stuttgart, 3. Auflage
- HÄSSIG, A., KARRER, J., PUSTERLA, F. (1949)
Über Pseudotuberkulose beim Menschen
Schweiz. Med. Wschr., 41: 971- 973
- HEESEMAN, J. (1990)
Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische Methoden
Immun. Infekt., 18: 186- 191
- HEESEMAN, J. (1994)
Die Gattung Yersinia, Yersiniosen
In: Brandis, H., Eggers, H.J., Köhler, W., Pulverer, G.(Hrsg.), Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York, S. 313- 317

- HEESEMANN, J., KELLER, C., MOROWA, R., SCHMIDT, N., SIEMENS, H.J.,
LAUFS, R. (1983)
*Plasmids of human strains of Yersinia enterocolitica. Molecular
relatedness and possible importance for pathogenesis*
J. Infect. Dis., 147: 107- 115
- HEESEMANN, J., ALGERMISSEN, B., LAUFS, R. (1984)
Genetically manipulated virulence of Yersinia enterocolitica
Immun. Infekt., 46: 105
- HEESEMANN, J., KALTHOFF, H., KOCH, F. (1986)
*Monoclonal antibodies directed against plasmid-encoded released
proteins of enteropathogenic Yersinia*
FEMS Microbiol. Lett., 36:15-20
- HEESEMANN, J., GRÜTER, L. (1987)
*Genetic evidence that the outer membrane protein YOP1 of Yersinia
enterocolitica mediates adherence and phagocytosis resistance to
human epithelial cells*
FEMS Microbiol. Lett., 40: 37- 41
- HEESEMANN, J., KARCH, H. (1995)
*Diagnostik von Yersiniosen und Infektionen mit enterohämorrhagischen
Escherichia coli (EHEC)*
Internist, 36: 102- 105
- HURVELL, B.(1981)
*Zoonotic Yersinia enterocolitica infection: Host range, clinical
manifestation and transmission between animals and man*
In: Bottone, E.J.(Hrsg.), Yersinia enterocolitica
CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, S. 145- 159
- IBRAHIM, A., MACRAE, I.C. (1991)
*Isolation of Yersinia enterocolitica and related species from red meat
and milk*
J. Food Sci., 56: 1524- 1526

ISBERG, R.R. (1989)

Mammalian cell adhesion functions and cellular penetration of enteropathogenic Yersinia species

Mol. Microbiol., 3: 1449- 1453

ISO (1993)

Microbiology- General guidance for the detection of presumptive pathogenic Yersinia enterocolitica (ISO/DIS 10273)

International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

JACOBS, J., JAMMER, D., VAN DEVEN, J., WAUTERS, M., VERMYLEN, C., VANDEPITTE, J. (1989)

Yersinia enterocolitica in donor blood. A case report and review

J. Clin. Microbiol., 27: 1119- 1121

JOHANNESSEN, G.S., KAPPERUD, G., KRUSE, H. (2000)

Occurrence of pathogenic Yersinia enterocolitica in Norwegian pork products determined by a PCR method and a traditional culturing method

Int. J. Food Microbiol., 54: 75- 80

KAPPERUD, G. (1982)

Enterotoxin production at 4°, 22°, and 37°C among Yersinia enterocolitica-like bacteria

Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B, 90: 185- 189

KAPPERUD, G. (1991)

Yersinia enterocolitica in food hygiene

Int. J. Food Microbiol., 12: 53- 66

KAPPERUD, G., LANGELAND, G. (1981)

Enterotoxin production at refrigeration temperature by Yersinia enterocolitica and Yersinia enterocolitica-like bacteria

Curr. Microbiol., 5: 119- 122

KAPPERUD, G., BERGANN, T. (1984)

Biochemical and serological characterization of Yersinia enterocolitica

In: Bergan, T. und Norris, J.R., (Hrsg.), *Methods in microbiology*

Academic Press, London, 15: 295- 344

KAPPERUD, G., NAMORK, E., SKURNIK, M., NESBAKKEN, T. (1987)

Plasmid-mediated surface fibrillae of Yersinia pseudotuberculosis and

Yersinia enterocolitica: Relationship to the outer membrane protein

YOP1 and possible importance for pathogenesis

Infect. Immun., 55: 2247- 2254

KARIB, H., SEEGER, H. (1994)

Vorkommen von Yersinien- und Campylobacter-Arten in Lebensmitteln

Fleischwirtschaft, 74: 1104- 1106

KERBER, J. (1997)

Untersuchungen zum Vorkommen von Yersinia enterocolitica in den

Luftwegen von Schweineschlachtierkörpern mit bekanntem sowie

unbekanntem serologischen Status und Nachweis von Yersinien im

daraus hergestellten Wurstbrät

Diss. med. vet., FU Berlin

KHALAFALLA, F.A. (1990)

Yersinia enterocolitica bei verarbeitetem Geflügel

Fleischwirtschaft, 70: 351- 352

KIESEWALTER, J. (1992)

Klinische und epidemiologische Bedeutung von Yersinia enterocolitica

für Mensch und Tier

Bundesgesundheitsblatt, 35: 495- 499

KLEEMANN, J., BERGANN, T. (1996)

Model experiments to establish behaviour of Yersinia enterocolitica O:9

strains in various types of fresh dry sausage

J. Appl. Bacteriol., 80: 10-12

KLINGBERG, S. (1982)

Untersuchungen über die Eignung verschiedener Nährmedien zur Anreicherung von Yersinia enterocolitica aus Lebensmittelproben

Dipl. vet. med., Berlin

KNAPP, W. (1988)

Die Gattung Yersinia - Yersiniosen. III. Yersinia enterocolitica

In: Brandis, H., Pulverer, J. (Hrsg.), Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie

Gustav Fischer Verlag Stuttgart, S. 355- 358

KNAPP, W., THAL, E. (1988)

Die biochemische Charakterisierung von Yersinia enterocolitica (syn. Pasteurella X) als Grundlage eines vereinfachten O-Antigenschemas

In: Bisping, W., Amtsberg G. (1988): Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionskrankheiten der Tiere.

Paul Parey Scientific Publishers, Berlin und Hamburg

KOUNEV, Z. (1989)

Effects of enrichment medium and incubation temperature on recovery of Yersinia enterocolitica from cooked sausages

J. Food Prot., 52: 818

LACHICA, R.V., ZINK, D.L., FERRIS, W.R. (1984)

Association of fibril structure formation with cell surface properties of *Yersinia enterocolitica*

Infect. Immun., 46:272-275

LEE, L.A., GERBER, A.R., LONSWAY, M.S., SMITH, J.D., CARTER, G.P.,

NANCY, D.P., PARRISH, C.M., SIKES, R.K., FINTON, R.J., TAUXE, R.V. (1990)

Yersinia enterocolitica O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings

N. Engl. J. Med., 14: 984- 987

LEE, W.H. (1977)

Two plating media modified with Tween 80 for isolating Yersinia enterocolitica

Appl. Environ. Microbiol., 33: 215- 216

LEE, W.H., HARRIS M.E., McCLAIN, D., SMITH, R.E., JOHNSTON, R.W. (1980)

Two modified selenite media for recovery of Y. enterocolitica from meats

Appl. Environ. Microbiol., 39: 205- 209

LOGUE, C.M., SHERIDAN, J.J., WAUTERS, G., MC DOWELL, D.A., BLAIR, I.S. (1996)

Yersinia spp. and numbers, with particular reference to Y. enterocolitica bio/serotypes, occurring on Irish meat and meat products, and the influence of alkali treatment on their isolation

Int. J. Food Microbiol., 33: 257- 274

MANTLE, M., BASARABA, L., PERCOOK, S.C., GALL, D.G. (1989)

Binding of Yersinia enterocolitica to rabbit intestinal brushborder membranes, mucus, and mucin

Infect. Immun., 57: 3292- 3299

MICHIELS, T., WATTIAU, P., BRASSUER, R., RUYSSCHAERT, J.M., CORNELIS, G. (1990)

Secretion of Yop proteins by yersiniae

Infect. Immun., 58: 2840- 2849

MOHAMED, A.A., ALY, S.M. (1998)

Occurrence of Salmonella and Yersinia enterocolitica in some meat products

Assiut veterinary medical Journal, 38: 76, 29- 39; 31 ref.

MOUSTAFA, M.K. (1990)

Occurrence of Yersinia enterocolitica in ice cream in Assiut city

Assiut veterinary medical Journal, 23: 46, 106- 109

MOUSTAFA, M.K., AHMED, A.A.H., MARTH, E.H. (1983)

Occurrence of Yersinia enterocolitica in raw and pasteurised milk

J. Food Prot., 46 (4): 276- 278

MUNDI, J.P.S., JOSHI, D.V., NEELAM, J., JOSHI, N. (1999)

Isolation and characterization of Yersinia enterocolitica from meat and food animals

Indian Journal of comparative microbiology, immunology and infectious diseases, 20: 1, 76- 77

N.N., (1992)

Trockennährböden Handbuch

Biotest AG Dreieich

N.N.,(1996)

Mikrobiologie Handbuch

Merck KgaA, Feinchemikalien und Laborbedarf

N.N. (2000)

Robert Koch Institut

Stellungnahme des Arbeitskreises Blut: Yersinia enterocolitica

Internet: www.rki.de/GESUND/AKBLUT/STELL/ST05.HTM

NCFA (1996)

Yersinia enterocolitica. Detection in foods

Nordic Committee on Food Analysis, Espoo, Finnland, Method no. 117, 3rd ed.

NESBAKKEN, T. (1992)

Epidemiological and food hygienic aspects of Yersinia enterocolitica with special reference to the pig as a suspected source of infection

Diss. med. vet., Oslo, Norwegen

NESBAKKEN, T., GONDROSEN, B., KAPPERUD, G. (1985)

Investigation of Yersinia enterocolitica-like bacteria, and thermotolerant

campylobacters in Norwegian pork products

Int. J. Food Microbiol., 1: 311-320

NESBAKKEN, T., NERBRINK, E., ROTTERUD, O.J., BORCH, E. (1994)

Reduction of Yersinia enterocolitica and Listeria spp. on carcasses by enclosure of the rectum during slaughter

Int. J. Food Microbiol., 23: 197- 208

NEUBAUER, H., SAUER, T., BECKER, H., ALEKSIC, S., MEYER, H. (1998)

Comparison of systems for identification and differentiation of species within the genus Yersinia

J. Clin. Microbiol., 36: 3366-3368

NEUBAUER, H., HENSEL, A., ALEKSIC, S., MEYER, H. (2000)

Identification of Yersinia enterocolitica within the genus Yersinia

System. Appl. Mikrobiol. 23: 58- 62

NOPPINGER, N., STEPHAN, R., UNTERMANN, F. (2000)

Wachstumsverhalten von pathogenen und apathogenen Y. enterocolitica Stämmen im Bezug auf unterschiedliche Extrinsic- und Intrinsic- Faktoren

41. Arbeitstagung der „Lebensmittelhygiene“ in Garmisch-Partenkirchen, S. 639- 642

NORTJE, G.L., VORSTER, S.M., GREEBE, R.P., STEYN, P.L. (1999)

Occurrence of Bacillus cereus and Yersinia enterocolitica in South African retail meats

Food Microbiol., 16: 213- 217

PAERREGAARD, A., ESPERSEN, F., JENSEN, O.M., SKURNIK, M. (1991)

Interaction between Yersinia enterocolitica and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles

Infect. Immun., 59: 253- 260

- PAI, C.H., MORS, V., TOMA, S. (1978)
Prevalence of enterotoxogenicity in human and nonhuman isolates from
Yersinia enterocolitica
Infect. Immun., 22: 334- 338
- PEIXOTTO, S.S., FINNE, G., HANNA, M.O., VANDERZANT, C. (1979)
*presence growth and survival of Yersinia enterocolitica in oysters,
shrimp and crab*
J. Food Prot., 42 (12): 974- 981
- PEPE, J.F., WACHTEL, M.R., WAGAR, E., MILLER, V.L. (1995)
*Pathogenesis of defined invasion mutants of Yersinia enterocolitica in a
BALB/c mouse model of infection.*
Infect. Immun. 63: 4837- 4848
- PICHARDT, K. (1989)
Lebensmittelmikrobiologie - Grundlagen für die Praxis
Springer Verlag, Berlin
- PRPIC, J.K., ROBINS-BROWNE, R.M., DAVEY, R.B. (1985)
*In vitro assessment of virulence in Yersinia enterocolitica and related
species*
J. Clin. Microbiol., 22: 105- 110
- PSCHYREMBEL, W. (1998)
Klinisches Wörterbuch
258. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York
- PULLELA, S., FERNANDES, C.F., FLICK, G.J., LIBEY, G.S., SMITH, S.A.,
COALE, C.W. (1998)
*Indicative and pathogenic microbiological quality of aquacultured finfish
grown in different production systems*
J. Food Prot., 61: 2, 205- 210

- REA, M.C., COGAN, T.M. TOBIN, S. (1992)
Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland
J. Appl. Bacteriol., 73: 331- 336
- RILEY, G., TOMA, S. (1989)
*Detection of pathogenic Yersinia enterocolitica by using Congo Red-
Magnesium Oxalate Agar Medium*
J. Clin. Microbiol., 27: 213- 214
- ROBINS-BROWNE, R.M. (1997)
Yersinia enterocolitica
In: Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Montville, T. J. (Hrsg.). Food
microbiology, fundamentals and frontiers,
ASM Press, Washington D.C, USA, S. 192- 215
- ROBINS-BROWNE, R.M., PRPIC, J.K. (1985)
*Effects of iron and desferrioxamine on infections with Yersinia
enterocolitica*
Infect. Immun., 47: 774- 779
- ROHRBACH, B.W., DRAUGHON, F.A., DAVIDSON, P.M., OLIVER, S.P. (1992)
*Prevalence of Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni, Yersinia
enterocolitica, and Salmonella in bulk tank milk: risk factors and risk of
human exposure*
J. Food Prot., 55: 93- 97
- RUCHI- KUSHAL, ANAND, S.K. und KUSHAL, R. (2001)
*Isolation, biochemical characterization and antibiotic susceptibility of
Yersinia enterocolitica isolates from milk*
Journal of food science and technology mysore, 38: 2, 129- 134
- RUCKDESCHEL, K., ROGGENKAMP, A., SCHUBERT, S., HEESEMANN, J.
(1996)
*Differential contribution of Yersinia enterocolitica virulence factors to
evasion of microbicidal action of neutrophils*
Infect. Immun., 64: 724- 733

SAAD, N.M., MOUSTAFA, S. (1989)

Prevalence of Yersinia enterocolitica in raw milk in Assiut city

Assiut veterinary medical Journal, 22: 43, 95- 99

SAUER, T. (1996)

Zum Vorkommen von Yersinia enterocolitica in Rohmilch

Diss. med. vet., München

SCHIEMANN, D.A. (1979)

Synthesis of a selective agar medium for Yersinia enterocolitica

Can. J. Microbiol., 25: 1298-1304

SCHIEMANN, D.A. (1980)

Isolation of toxigenic Yersinia enterocolitica from retail pork products

J. Food Prot., 43: 360- 365

SCHIEMANN, D.A. (1982)

Development of a two-step enrichment procedure for recovery of Yersinia enterocolitica from food

Appl. Environ. Microbiol., **43**: 14-27

SCHIEMANN, D.A. (1983 a)

Comparison of enrichment and plating media for recovery of virulent strains of Yersinia enterocolitica from inoculated beef stew

J. Food Prot., 46: 957- 964

SCHIEMANN, D.A. (1983 b)

Alkalotolerance of Yersinia enterocolitica as a basis for selective isolation from food enrichments

Appl. Environ. Microbiol., 46: 22- 27

SCHIEMANN, D.A. (1989)

Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis

In: Doyle, M. P. (Ed.). Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker,

New York, USA, S. 601- 672

SCHIEMANN, D.A., WAUTERS, G. (1992)

Yersinia

In: Vanderzant, C., Splitstoesser, D.F. (Hrsg.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, American Public Health Association, Washington, USA, 3rd ed., S. 433- 450

SEELIGER, P.R., SCHRÖTER, G. (1990)

Medizinische Mikrobiologie: Labordiagnostik und Klinik

Verlag Urban & Schwarzenberg, München, 2. Aufl.

SELBITZ, H.-J. (1992)

Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie

Gustav Fischer Verlag Jena

SKURNIK, M., BÖLIN, I., HEIKKINEN, H., PIHA, S., WOLF-WATZ, H. (1984)

Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp.

J. Bacteriol., 158: 1033- 1036

SKURNIK, M., MIKKOLA, P., TOIVANEN, P., TERTTI, R. (1996a)

Passive immunisation with monoclonal antibodies specific for lipopolysaccharide (LPD) O- side chain protects mice against intravenous Yersinia enterocolitica serotyp O:3 infection.

APMIS 104: 598- 602

SKURNIK, M., ZHANG, L. (1996b)

Molecular genetics and biochemistry of Yersinia lipopolysaccharide.

APMIS 104: 849- 872

SOLTESZ, L., SCHALEN, C., MARDH, P.-A. (1980)

An effective, selective medium for Yersinia enterocolitica containing sodium oxalate

Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 88: 11- 16

STEFANOV, I., BOZHKOVA, K. (1998)

Isolation of Yersinia enterocolitica and related species from retail minced

meat

Bulgarian Journal of agricultural science, 4: 4, 547- 550

STENGEL, G. (1983)

Ein Beitrag zum Vorkommen von Yersinia enterocolitica

Diss. med. vet., Berlin

STOLLE, A. (1985)

Die Problematik der Probenentnahme für die Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes von Schlachttierkörpern

Habilitationsschrift, Berlin

STRALEY, S.C., SKRZYPEK, E., PLANO, G.V., BLISKA, J.B., (1993)

Yops of Yersinia spp. pathogenic for humans

Infect. Immun., 61: 3103- 3110

SWAMINATHAN, B., HARMON, M.C., MEHLMANN, I.J. (1982)

A review - Yersinia enterocolitica

J. Appl. Bacteriol., 52: 151- 183

SZABO, E.A., SCURRAH, K.J., BURROWS, J.M. (2000)

Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce

Lett. Appl. Microbiol., 30: 456- 460

TAUXE, R.V., VANDEPITTE, J., WAUTERS, G., GOOSENS, V., VAN NOYEN, R., MARTIN, S.M., DE MOL, P., THIERS, G.(1987)

Yersinia enterocolitica infections and pork: the missing link

Lancet, 1: 1129- 1132

VELAZQUEZ, L.D.C., ESCUDERO, M.A, DE GUZMAN, A.M. (1993)

Biovars, serovars, and phagovars of Yersinia enterocolitica isolated from 450 samples of cold food in San Luis, Argentina

J. Food Prot., 56: 333- 335

- VELAZQUEZ, L.D.C., ESCUDERO, M.A, DE GUZMAN, A.M. (1996)
Prevalence of Yersinia enterocolitica in hake (Merluccius hubbsi) fillets
J. Food Prot., 59: 781- 783
- VIDON, D.J.M., DELMAS, C.L. (1981)
Incidence of Yersinia enterocolitica in raw milk in eastern France
Appl. Environ. Microbiol., 41: 355- 359
- WALKER, S.J., GILMOUR, A. (1986a)
A comparison of media and methods for the recovery of Yersinia enterocolitica and Yersinia enterocolitica-like bacteria from milk containing simulated raw milk microfloras
J. Appl. Bacteriol., 60: 175- 183
- WALKER, S.J., GILMOUR, A. (1986b)
The incidence of Yersinia enterocolitica and Yersinia enterocolitica-like organisms in raw and pasteurised milk in Northern Ireland
J. Appl. Bacteriol., 61: 133- 138
- WAUTERS, G. (1973)
Improved methods for the isolation and the recognition of Yersinia enterocolitica
Contr. Microbiol. Immunol., 2: 68- 70
- WAUTERS, G., KONDOLO, K., JANSSENS, M. (1987)
Revised biogrouping scheme of Yersinia enterocolitica
Contrib. Microbiol. Immunol., 9:14-21
- WAUTERS, G., GOOSSENS, V. ,JANSSENS, M. ,VANDEPITTE, J. (1988)
New enrichment method for isolation of pathogenic Yersinia enterocolitica Serogroup O:3 from Pork
Appl. Environ. Microbiol., 54: 851- 854
- WAUTERS, G., ALEKSIC, S., CHARLIER, J., SCHULZE, G.(1991)
Somatic and flagellar antigens of Yersinia enterocolitica and related

species

Contr. Microbiol. Immunol. 12: 239- 243

WEAGANT, S.D., KAYSNER, C.A. (1983)

Modified enrichment broth for isolation of Yersinia enterocolitica from nonfood sources

Appl. Environ. Microbiol., 45: 468- 471

WEBER, A. (1982)

Zur Isolierung von Yersinia enterocolitica aus tierischem

Untersuchungsmaterial und Identifizierung humanpathogener Serotypen

Fortschritte der Veterinärmedizin, 35: 210- 214

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei **Herrn Univ.-Prof. Dr. A. Stolle** für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte, freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt **Frau Dr. M. Fredriksson-Ahomaa** und **Dr. M. Bucher** für die Möglichkeit zur Mitarbeit in ihrem Forschungsprojekt und die stets kompetente und überaus hilfsbereite Betreuung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin **Frau Dr. B. Sperner**, die mir bei der Korrektur der Arbeit behilflich war.

Frau M. Schmidt danke ich herzlich für die freundliche Hilfe bei der Erstellung meiner Literaturliste.

Nicht zuletzt möchte ich **Frau H. Dietz, Frau C. Wendt da Cruz, Frau S. Holzmann, Frau I. Fietzek**, ganz herzlich für die Geduld, die nette Atmosphäre und die jederzeit gewährte Hilfe im Bereich der Mikrobiologie danken.

Ebenso sei an dieser Stelle allen anderen **Mitarbeitern des Institutes** ein Dank für das Entgegenkommen bei Problemen und Sorgen ausgesprochen.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinen **Eltern** und meinem **Mann Michael** dafür bedanken, dass sie mir dieses Projekt ermöglicht haben und immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Lebenslauf

Anschrift

Christina Madeleine Charlotte Hank
geb. Flaschenträger
Angerweg 1
86981 Kinsau
Telefonnummer: (08869) 912535
Faxnummer: (08869) 912567
E-Mail: christinahank@gmx.de

Ausbildung

1979- 1983 Besuch der Volksschule an der Ostpreußenstr., München
1983- 1992 Besuch des Wilhelm- Hausenstein- Gymnasiums, München
1992 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
1993- 1999 Studium der Tiermedizin an der LMU München
April 2000 Erteilung der Approbation

Berufliche Tätigkeiten

Seit Februar 2001 Assistent in einer Praxis bei Landshut mit 60% Grosstier- und 40% Kleintieranteil
Ebenfalls seit Februar 2001 gelegentliche Mithilfe in einer Grosstierpraxis in Dörfern (Massentätigkeiten)

Daten

Geburtsdatum: 27.03.73
Geburtsort: München
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet