

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

Lehrstuhl: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Stolle

**Ein Beitrag zum Vorkommen von
stx-positiven *Escherichia coli*
und *ail*-positiven *Yersinia enterocolitica*
bei kleinen Wiederkäuern aus unterschiedlichen
Haltungssystemen in Bayern**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Susanne Karpf
aus Donauwörth

München 2009

Veröffentlicht und gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Stolle

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Klee

Tag der Promotion: 06. Februar 2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	ix
Einleitung	1
Literaturübersicht	2
1. Die Bedeutung und Entwicklung der Schaf- und Ziegenhaltung im Weltmaßstab, innerhalb Europas und in Deutschland	2
1.1. Schaf und Ziege in der Welt und in Europa.....	2
1.2. Schaf und Ziege in Deutschland und insbesondere in Bayern	8
1.3. Schaf-und Ziegenrassen und deren Haltung	12
2. Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i> und <i>Y. enterocolitica</i>	22
2.1. Taxonomie und Eigenschaften von Shigatoxin-bildenden <i>E. coli</i>	22
2.2. Pathogenitätsfaktoren und Pathogenese von STEC	24
2.3. Krankheitsbild beim Menschen	28
2.4. Epidemiologie von STEC	29
2.4.1. STEC beim Menschen	29
2.4.2. STEC bei Tieren.....	30
2.5. STEC bei kleinen Wiederkäuern	31
2.6. Nachweismethoden für STEC	37
2.7. Taxonomie und Eigenschaften von <i>Y. enterocolitica</i>	38
2.7.1. Biotyp.....	39
2.7.2. Serotyp	39
2.8. Pathogenitätsfaktoren von <i>Y. enterocolitica</i>	40
2.9. Pathogenese von <i>Y. enterocolitica</i>	41
2.10. Krankheitsbild beim Menschen.....	42
2.11. Epidemiologie von <i>Y. enterocolitica</i>	43
2.11.1. <i>Y. enterocolitica</i> beim Menschen	43
2.11.2. <i>Y. enterocolitica</i> bei Tieren.....	44
2.12. <i>Y. enterocolitica</i> bei kleinen Wiederkäuern.....	45
2.13. Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i>	49
3. PCR- Nachweisverfahren für STEC und <i>Y. enterocolitica</i>	52

3.1.	Polymerase-Ketten-Reaktion	52
3.2.	Inhibitorische Faktoren und PCR von Kotproben	55
3.3.	PCR-Nachweisverfahren für STEC	58
3.4.	PCR Nachweisverfahren für <i>Y. enterocolitica</i>	59
	Eigene Untersuchungen	61
4.	Material.....	61
4.1.	Probenmaterial	61
4.1.1.	Kotproben	61
4.1.2.	Tonsillenproben	64
4.2.	Probennahme	66
5.	Methoden	67
5.1.	Real-Time PCR Ansatz zum direkten Nachweis von STEC und <i>Y. enterocolitica</i> aus Kot und Tonsillen	68
5.2.	Kultureller Nachweis von STEC und <i>Y. enterocolitica</i>	74
5.3.	Real-Time PCR zur Identifizierung der STEC-Virulenzgene <i>stx1</i> und <i>stx2</i>	75
6.	Ergebnisse	78
6.1.	Nachweis von STEC	78
6.1.1.	Kotproben	78
6.1.2.	Tonsillenproben	79
6.1.3.	Ergebnis des spezifischen Nachweises von <i>stx1</i> und <i>stx2</i>	80
6.2.	Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i>	81
6.2.1.	Kotproben	81
6.2.2.	Tonsillenproben	81
6.3.	Ergebnisse bezogen auf die Betriebsstruktur und das Haltungssystem	82
	Diskussion	86
7.	Vorkommen von STEC in Schaf- und Ziegenbetrieben.....	86
7.1.	STEC-Nachweis von Kotproben.....	86
7.2.	STEC-Nachweis von Tonsillen	92
7.3.	Spezifischer Nachweis der Virulenzgene <i>stx1</i> und <i>stx2</i>	94
8.	Vorkommen von <i>Y. enterocolitica</i> in Schaf- und Ziegenbetrieben.....	95
8.1.	<i>Y. enterocolitica</i> -Nachweis von Kotproben.....	95
8.2.	<i>Y. enterocolitica</i> -Nachweis von Tonsillenproben.....	96
9.	Betrachtung der Ergebnisse in Bezug auf die Betriebsstruktur und das Haltungssystem.....	98
9.1.	<i>STEC</i>	98
9.2.	<i>Y. enterocolitica</i>	100

10. Schlussfolgerung	101
Zusammenfassung	102
Summary	105
Anhang	107
1. Anhang zu Material und Methoden	107
1.1. Medien zur Aufbewahrung, Anreicherung und Identifizierung von <i>Y. enterocolitica</i> und STEC	107
1.1.1. Flüssige Medien	107
1.1.2. Feste Medien.....	107
1.1.3. Aufbewahrungsmedium.....	109
1.2. Testsysteme und Reagenzien	110
1.3. Geräte und Hilfsmittel.....	110
1.4. PCR.....	112
1.4.1. Reagenzien zur Probenvorbereitung.....	112
1.4.2. Geräte und Hilfsmittel.....	112
1.4.3. Reagenzien für die PCR.....	112
2. Anhang Ergebnisse	113
Literaturverzeichnis	122

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nutztierbestände im weltweiten Vergleich	3
Abbildung 2: Weltkarte der Schafpopulation.....	4
Abbildung 3: Weltkarte der Ziegenpopulation.....	4
Abbildung 4: Anzahl der Schafe und Ziegen in Europa	5
Abbildung 5: Deutschlandkarte der Population von kleinen Wiederkäuern	9
Abbildung 6: Merinoschaf.....	13
Abbildung 7: Merinofleischschaf.....	13
Abbildung 8: Schwarzköpfiges Fleischschaf.....	14
Abbildung 9: Texelschaf	15
Abbildung 10: Suffolk.....	15
Abbildung 11: Deutsches Bergschaf.....	16
Abbildung 12: Braunes Bergschaf	16
Abbildung 13: Tiroler Steinschaf.....	17
Abbildung 14: Krainer Steinschaf	17
Abbildung 15: Bunte deutsche Edelziege	18
Abbildung 16: Weiße deutsche Edelziege	18
Abbildung 17: Toggenburger Ziege	19
Abbildung 18: Burenziege	19
Abbildung 19: Skizzierter Funktionsmechanismus des Shiga-Toxins.....	27
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Untersuchung pathogener Yersinien (nach DIN EN ISO 10273).....	50
Abbildung 21: Darstellung der Fluoreszenzzunahme einer Real-Time PCR	54
Abbildung 22: Darstellung der Schmelzkurve einer Real-Time PCR	54
Abbildung 23: Ablaufschema des Real-Time PCR- und kulturellen Probenansatzes	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Entwicklung auf dem Schafffleischmarkt.....	6
Tabelle 2: Bruttoeigenerzeugung von Schaf- und Ziegenfleisch (in 1000 t)	7
Tabelle 3: Milchproduktion (in 1000 t) in verschiedenen Teilen der Erde (2006)	8
Tabelle 4: Betriebsgrößenstruktur der Ziegenhaltung in Bayern.....	10
Tabelle 5: Betriebsgrößenstruktur der Schafhaltung in Bayern	11
Tabelle 6: Serotypische Charakterisierung von Diarrhoe-auslösenden <i>E. coli</i>	24
Tabelle 7: Vorkommen von STEC bei Schaf und Ziege	35
Tabelle 8: Vorkommen von <i>Y. enterocolitica</i> bei Schaf und Ziege.....	48
Tabelle 9: Übersicht über sinnvolle Genkombinationen zur Identifizierung von pathogenen <i>Y. enterocolitica</i>	60
Tabelle 10: Verteilung der Sammelkotproben auf die Betriebe.....	61
Tabelle 11: Verteilung der Schaf- und Ziegenrassen je Betriebsgröße	62
Tabelle 12: Anzahl der Sammelkot-beprobten Zucht- und Jungtiere in verschiedenen Haltungssystemen	63
Tabelle 13: Verteilung der Tonsillenproben auf die Betriebe	64
Tabelle 14: Verteilung der Schaf- und Ziegenrassen je Betriebsgröße	65
Tabelle 15: Anzahl der Tonsillen-beprobten Zucht- und Jungtiere in verschiedenen Haltungssystemen	65
Tabelle 16: Mastermix für die Real-Time PCR zum Nachweis von STEC	70
Tabelle 17: PCR-Programm zum Nachweis von STEC.....	71
Tabelle 18: PCR-Programm zum Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i>	73
Tabelle 19: Mastermix für die Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis der Virulenzgene <i>stx1 und stx2</i>	76
Tabelle 20: PCR-Programm zum spezifischen Nachweis von <i>stx1 und stx2</i>	77
Tabelle 21: Nachweis von STEC aus Sammel-Kotproben mittels Real-Time PCR ..	78
Tabelle 22: Nachweis von STEC aus Sammel-Kotproben mittels kulturellem Verfahren.....	79
Tabelle 23: Nachweis von STEC aus Tonsillenproben mittels Real-Time PCR.....	79
Tabelle 24: Häufigkeitsverteilung der Virulenzgene <i>stx1 und stx2</i> aus STEC-positiv getesteten Kotproben	80
Tabelle 25: Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> aus Tonsillenproben mittels Real-Time PCR.....	82

Tabelle 26: Verteilung der positiv getesteten Betriebe und die Nachweishäufigkeit der Virulenzgene <i>stx1</i> , <i>stx2</i> und <i>ail</i>	83
Tabelle 27: Anzahl der auf STEC untersuchten Herden bezogen auf die Betriebsgröße und -struktur	84
Tabelle 28: STEC- und <i>Y. enterocolitica</i> -positive Kot- und Tonsillenproben nach Haltungssystemen differenziert.	85
Tabelle 29: Übersicht über die untersuchten Proben.....	113

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Adenin
<i>Ail</i>	attachment invasion locus
Aqua bidest	Aqua bidestillata
BHI	Brain-Heart-Infusion
bp	Basenpaare
C	Cytosin
C _t	Threshold Cycle
CASO	Casein-Sojamehl-Pepton
cDNA	complementary DNA
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
cm	Zentimeter
CRMOX	Kongorot-Magnesium-Oxalat
d	Tag
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	(lat. et alli) und andere
FAE	Folliel-assoziiertes Gewebe
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FRET	fluoreszenz resonanz energy transfer
g	Gramm
G	Guanin
GALT	gut associated lymphoid tissue
Gb3	Globotriacylceramid-Rezeptor
GKZ	Gesamtkeimzahl
h	Stunde
HC	Hämorrhagische Colitis

Abkürzungsverzeichnis

H-Antigene	Geißel-Antigene
HUS	Hämorrhagisches Urämisches Syndrom
Ig	Immunglobulin
IMS	Immunomagnetische Separation
<i>inv</i> -Gen	Invasin-Gen
ISO	International Organization for Standardization
ITC	Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat
KbE	Kolonien bildende Einheiten
KOH	Kalium-Hydroxid
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LPS	Lipopolysaccharide
M-Zellen	Microford-Zellen
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRB	modifizierte Rappaport-Bouillon
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTSB	modifizierte Trypton-Soja-Bouillon
n	absolute Zahl
NCFA	Nordic Committee of Food Analysis
ng	Nanogramm
O-Antigene	Oberflächenantigene
ON	over night (Übernachtenreicherung)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PC	Plate Count
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PSB	peptone-sorbitol-bile
pYV	plasmid for <i>Yersinia</i> virulence (Virulenzplasmid)
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)

Abkürzungsverzeichnis

RT	reverse transcription
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SG	Schlachtgewicht
SMAC	Sorbitol-MacConkey
SSDC	Salmonella-Shigella-Desoxycholate-Calcium-Chlorate
ssp.	Subspezies
T	Thymin
t	Tonne
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBA	Tris-Bor-EDTA-Puffer
TSA	Trypton-Soja-Agar
TSB	Tryptone-Soja-Bouillon
TTP	trombotisch-trombozytopenische Purpura
U	Unit
Urea	Harnstoff
Ure	Urease
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
WHO	World Health Organization
Y.	<i>Yersinia</i>
Yad	<i>Yersinia</i> adhesin
Ylp	<i>Yersinia</i> Lipoprotein
Yop	<i>Yersinia</i> outer membrane protein
Yst-Gen	heat-stable enterotoxine (hitzestabiles Enterotoxin)

Einleitung

Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) sind ein bedeutender Erreger humaner Gastroenteritiden in deren Folge es zu schweren Komplikationen kommen kann. Und auch *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) stellen einen wichtigen Zoonoseerreger dar, der Durchfallerkrankungen auslöst und in der Lage ist Gelenksentzündungen hervorzurufen.

STEC scheint bei Wiederkäuern ein Reservoir zu besitzen, vor allem beim Rind wurden häufig Nachweise erbracht, aber auch Schaf und Ziege stehen im Verdacht STEC zu beherbergen. Die Epidemiologie von *Y. enterocolitica*-Infektionen ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Dennoch ist anzunehmen, dass Rinder neben Schweinen ein wichtiges Reservoir darstellen. Über das Vorkommen von *Y. enterocolitica* bei kleinen Wiederkäuern ist dagegen wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob kleine Wiederkäuer ein Reservoir für STEC und *Y. enterocolitica* in Bayern darstellen. Zu diesem Zweck wurden zunächst Kotproben von Schafen und Ziegen aus Betrieben unterschiedlichster Größe und Betriebsform aus dem Gebiet Bayerns gesammelt. Anschließend wurden diese sowohl mit kulturellen Verfahren, als auch mit Real-Time PCR auf das Vorhandensein von STEC und pathogenen *Y. enterocolitica* untersucht. Des Weiteren wurden Tonsillenproben von Schlachttieren gesammelt und diese wiederum, mit der gleichen Methodik auf das Vorhandensein dieser beiden Mikroben geprüft.

Literaturübersicht

1. Die Bedeutung und Entwicklung der Schaf- und Ziegenhaltung im Weltmaßstab, innerhalb Europas und in Deutschland

Schaf und Ziege zählen zu den ältesten und wichtigsten Haustieren des Menschen. Wegen ihrer Anspruchslosigkeit und der vielseitigen Nutzungsmöglichkeiten, wie Wolle, Fleisch, Milch, Häute und Felle sowie Därme und Dung, sind sie in vielen Teilen der Welt verbreitet. Als Wiederkäuer können Schaf und Ziege Futtermittel mit geringer Nährstoffkonzentration und hohem Rohfasergehalt optimal nutzen und verwandeln für den Menschen unbrauchbare Nährstoffe in eiweißreiche Lebensmittel (STRITTMATTER et al. 2003a).

1.1. Schaf und Ziege in der Welt und in Europa

Das domestizierte Schaf stammt ursprünglich vom asiatischen und europäischen Mufflon ab, während die Ziege aus den Gebirgsregionen Kleinasiens stammt und dann in weiten Teilen der Welt Verbreitung fand. Ziegen waren, noch vor dem Schaf, die ersten Huftiere die im 8. bis 7. Jahrtausend v. Chr. von Menschen domestiziert wurden. Die Selektion auf Wolle, Fleisch, Milch und andere ökonomisch wichtige Merkmale resultiert heute in einer Vielzahl von 783 Schafrassen und 313 Ziegenrassen weltweit (FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations 2006a). Der Gesamtbestand an Schafen in der Welt wird auf 1,102 Milliarden (Mrd.) Tiere beziffert (FAO 2006a). Weit mehr als 50 % des weltweiten Schafbestandes wird in Entwicklungs- und Schwellenländern, wie beispielsweise Pakistan, Iran, Türkei, China, Indien, Sudan, Äthiopien und Somalia gehalten (Abbildung 1 und Abbildung 2). Die Population an Ziegen beläuft sich weltweit auf rund 837 Millionen (Mio.) Tiere (FAO 2006a). Bei den Ziegen finden sich sogar über 90 % des Weltziegenbestandes in Entwicklungs- und Schwellenländern wieder (Abbildung 1 und Abbildung 3). Im Vergleich dazu gibt es weltweit etwa 1,383 Mrd. Rinder, 990 Mio. Schweine und 59 Mio. Pferde. Den größten Anteil des weltweiten Rinder- und Pferdebestandes hält Amerika, etwa $\frac{2}{3}$ aller Schweine werden in Asien gehalten (FAO 2006a) (Abbildung 1).

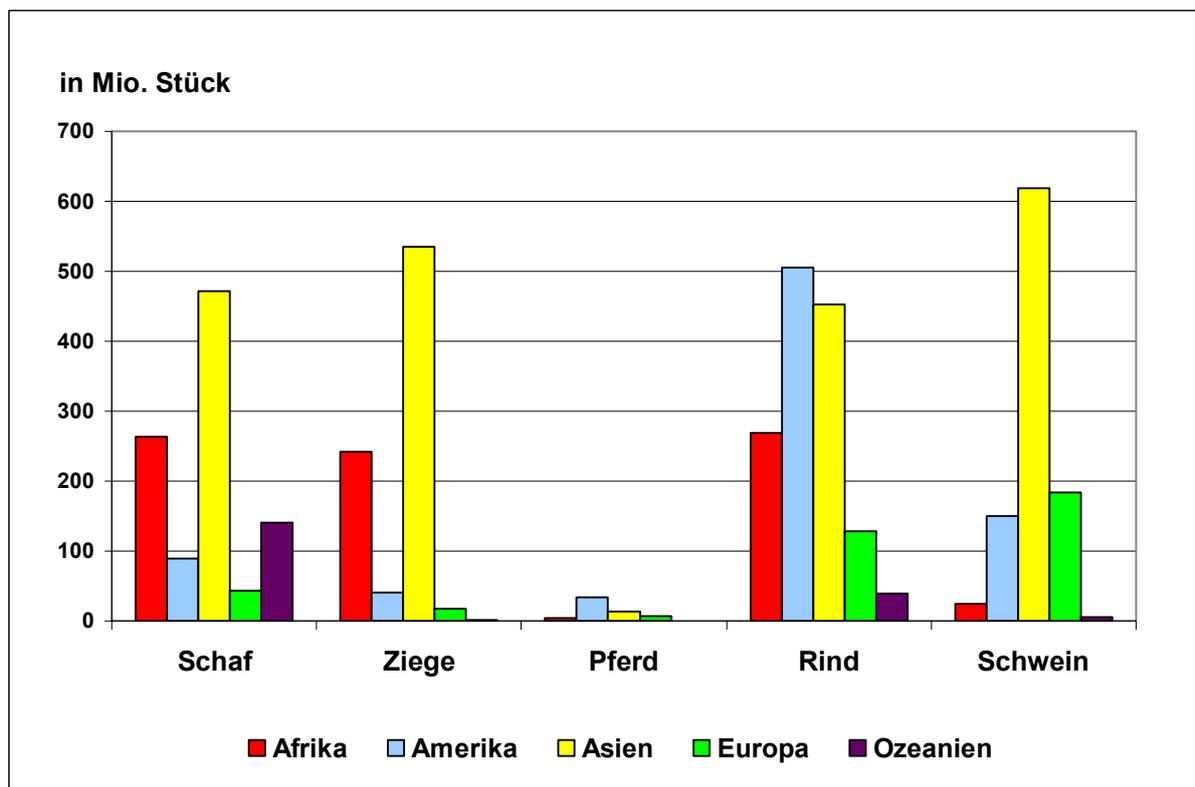


Abbildung 1: Nutztierbestände im weltweiten Vergleich

Quelle: Eigene Darstellung nach FAO, 2006a

In Entwicklungsländern werden Ziegen als Milch- und Fleischlieferant mit geringen Ansprüchen an das Futter, hauptsächlich zur Eigenversorgung der Ziegenhalter genutzt. Aufgrund der höheren Milchproduktivität, bezogen auf das Körpergewicht, wird den Ziegen in ärmeren Regionen oft der Vorzug vor Rindern gegeben. In Ländern wie China, Indien, Pakistan, Sudan, Kenia, Somalia und Nigeria ist daher die Ziegenpopulation sehr hoch (Abbildung 3). Mit steigendem Pro-Kopf-Einkommen jedoch geht der Ziegenbestand deutlich zurück und macht Tierarten mit hoher Produktivität, aber damit verbunden auch höheren Ansprüchen, Platz (MOHRAND-FEHR und BOYAZOGLU 1999).

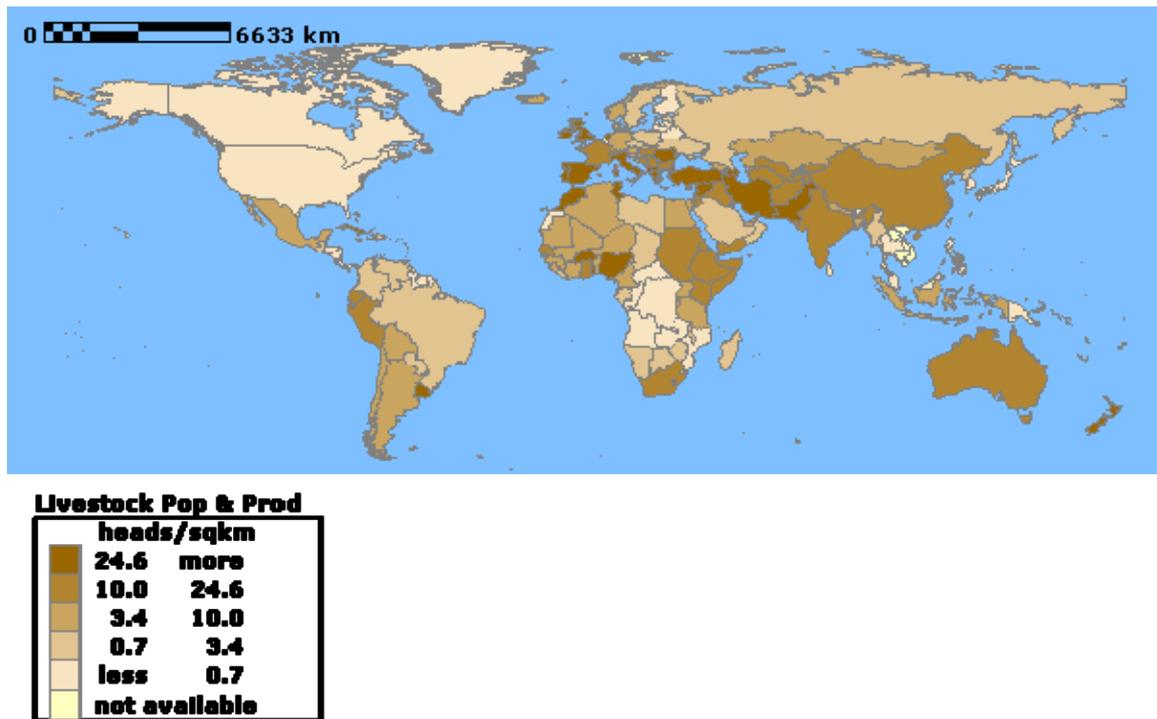


Abbildung 2: Weltkarte der Schafpopulation

Quelle: GliPHA 2004

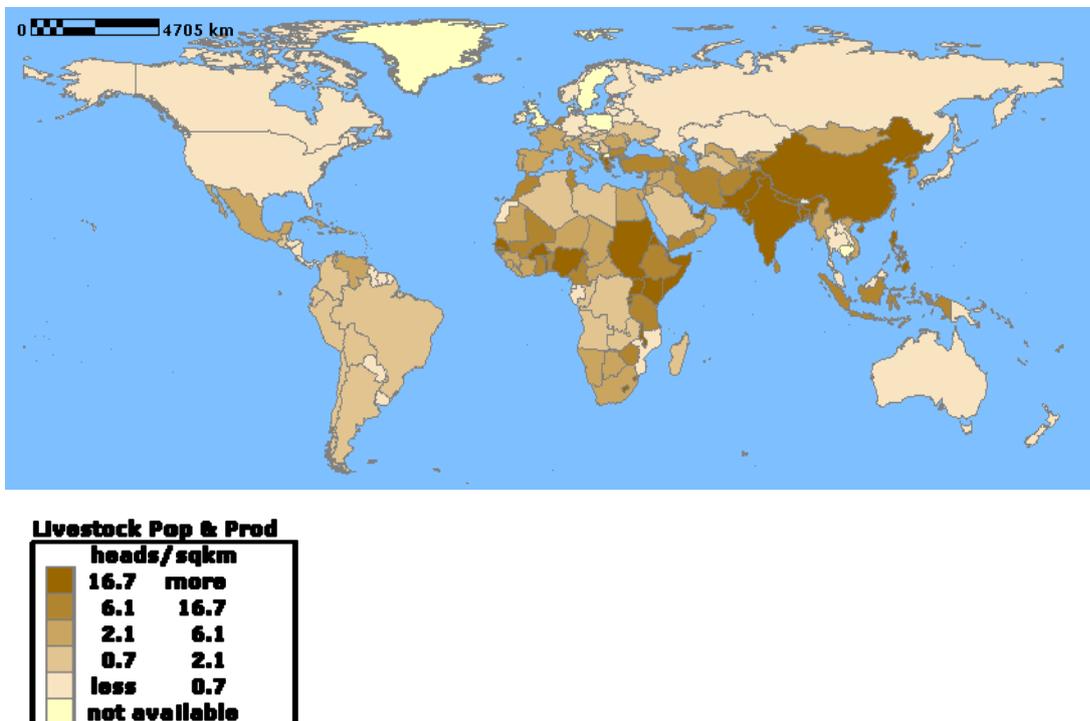


Abbildung 3: Weltkarte der Ziegenpopulation

Quelle: GliPHA 2004

In Europa werden derzeit 4,3 % der Wertschöpfungsbestände und 0,75 % der Weltziegenbestände gehalten. Gerade bei der Schafhaltung ist ein anhaltender, wenn auch geringgradiger Rückgang der Schafbestände zu verzeichnen (Abbildung 4). Während im Jahr 2001 in Europa noch 90,50 Mio Tiere gezählt wurden, waren es 2006 nur noch 86,77 Mio. Schafe, etwa zwei Prozent weniger als noch im Jahr zuvor. Das hängt unter anderem mit der Reform der gemeinsamen EU- Agrarpolitik und der Entkoppelung der Prämien von der Produktion zusammen (ZMP- Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle 2006a).

In der Ziegenhaltung sind innerhalb Europas seit 2001 die Ziegenbestände relativ konstant. In den 5 Jahren zuvor allerdings stieg die Ziegenpopulation um 2 % an und hat sich nun auf einer Gesamtzahl von ca. 11,50 Mio Tieren eingependelt (Abbildung 4).

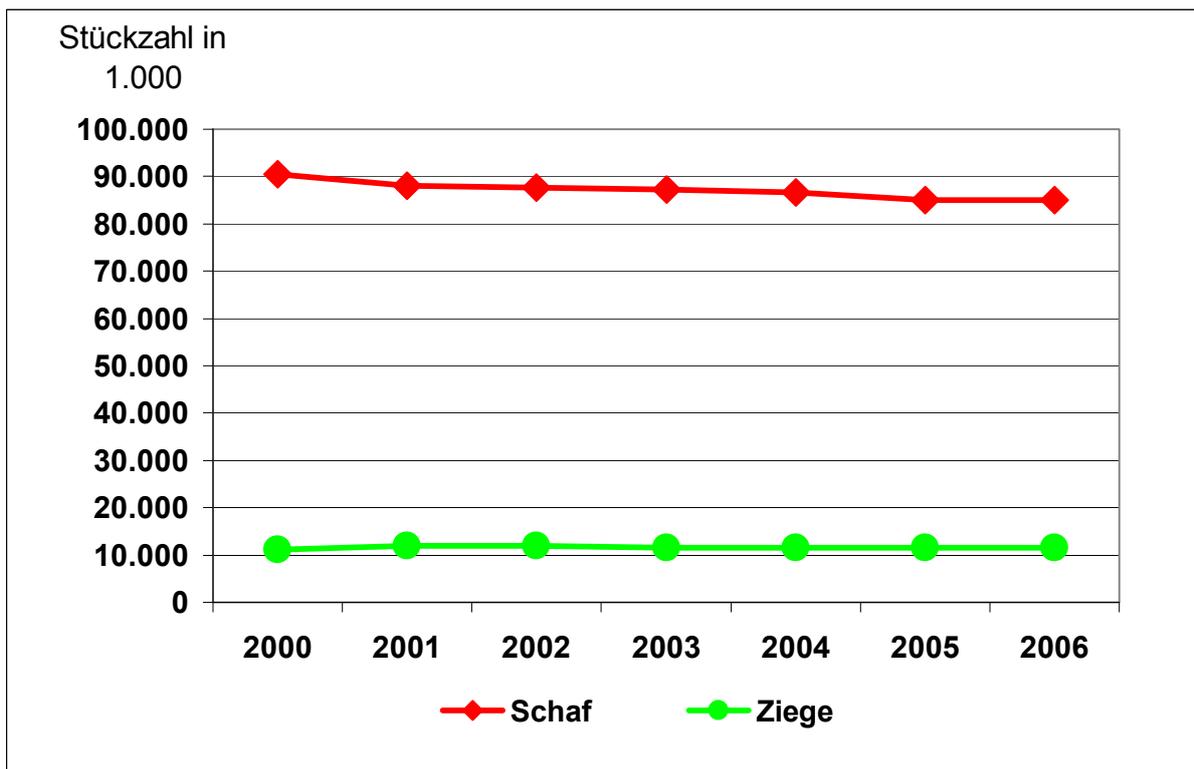


Abbildung 4: Anzahl der Schafe und Ziegen in Europa

Das Hauptziel der Schafhaltung besteht in der Erzeugung von Schlachtlämmern und in der Milchproduktion. Wolle ist zum Beiprodukt geworden und inzwischen ohne nennenswerte wirtschaftliche Bedeutung. Gegenwärtig macht Wolle weltweit nur noch 2 % am Rohstoffverbrauch der Textilindustrie aus. Dennoch erfolgt seit den neunziger Jahren international gesehen, ein Rückgang der in den letzten Jahrzehnten dominierenden Bestandserweiterung bei Schafen und damit ein Abbau der Schafbestände im Weltmaßstab (STRITTMATTER et al. 2003b).

Anders als bei der Wolle, führt eine Verringerung der Bestände zu einer Erhöhung des Schlachtaufkommens. Im Jahr 2006 machte das Schaf- und Ziegenfleisch-aufkommen etwa 5 % der Fleischproduktion im Weltmaßstab aus. Das entspricht einem weltweiten Anstieg der Schaffleischproduktion um 2,6 % im Vergleich zum Vorjahr, auf eine Rekordmenge von 13,5 Mio. Tonnen Fleisch insgesamt (Tabelle1). Den größten Anteil der Fleischproduktion von kleinen Wiederkäuern trägt Asien mit 60 %. China ist dort der größte Produzent. Die Ozeanischen Länder sind Exportweltmeister und liefern bereits 80 % der Lammfleischausfuhren (FAO Food Outlook 2007).

Tabelle 1: Entwicklung auf dem Schaffleischmarkt

	2006	2007
Erzeugung (in Mio. t. SG)	Schätzung	Prognose
Asien	8,1	8,4
Afrika	2,1	2,2
Zentral-Amerika	0,1	0,1
Süd-Amerika	0,3	0,4
Nord-Amerika	0,1	0,1
Europa	1,4	1,4
Australien/Neuseeland	1,2	1,3
Welt	13,5	13,8

Quelle: FAO Food Outlook 2007

Mio: Million

t: Tonne

SG: Schlachtgewicht

Die ebenfalls rückläufigen Bestandszahlen bei der europäischen Schafhaltung machen sich auch bei der Erzeugung bemerkbar. Die durch diesen Umstand seit 2003 angestiegene Bruttoeigenerzeugung an Schaf- und Ziegenfleisch erlebte 2006 eine Trendwende und sank um 1,5 %. Die geringere Menge an Schaf- und Ziegenfleisch auf dem EU-Markt führt zu einem rückläufigen Pro-Kopf-Verbrauch auf 2,9 kg/Kopf in der Europäischen Union. Dennoch steigt der Importbedarf für Schaf- und Ziegenfleisch aufgrund des Missverhältnisses von rückläufiger Erzeugung aber geringeren rückläufigen Fleischverbrauchs. Die wichtigsten Importländer für Schaf- und Ziegenfleisch sind Neuseeland und Australien (ZMP 2006b). Deutschland produzierte im Jahr 2006 44.000 t Schaf- und Ziegenfleisch und liegt, bezüglich der Bruttoeigenerzeugung, an letzter Stelle im europäischen Vergleich (Tabelle 2).

Tabelle 2: Bruttoeigenerzeugung von Schaf- und Ziegenfleisch (in 1000 t)

Land	2005	2006
Deutschland	52	44
Griechenland	117	155
Spanien	244	241
Frankreich	133	132
Irland	69	67
Großbritannien	330	327
Europäische Union insgesamt	1.067	1.095

Quelle: ZMP 2007

In der Schafmilcherzeugung dominieren die Erdteile Asien mit 45,6 % der Milchmenge am Weltanteil und Europa mit einem Anteil von 33,4 %. Weltweit werden rund 8,7 Mio. t Schafmilch hergestellt (FAO 2006b) (Tabelle 3). Das entspricht einem Anteil der Schafmilch von 1,55 % an der gesamten erzeugten Milch im Weltmaßstab. In einigen Entwicklungs- und Schwellenländern hat Schaf- und Ziegenmilch jedoch eine wichtige Bedeutung und dient meist der Eigenversorgung der ländlichen Bevölkerung. Die Schafmilchproduktion in Europa liegt bei einer Gesamtzahl von rund 2,9 Mio. t Schafmilch, was einem Anteil von 33,9 % der Weltproduktion entspricht (Tabelle 3). Die Produktion der Ziegenmilch liegt mit ca. 2,5 Mio. t Milch etwas unter der Schafmilchproduktion. Das entspricht einem Anteil von 18 % an der

Weltproduktion von Ziegenmilch (FAO 2006b).

Tabelle 3: Milchproduktion (in 1000 t) in verschiedenen Teilen der Erde (2006)

Erzeugung	Kuhmilch	Schafmilch	Ziegenmilch
Afrika	24.673	1.719	3.128
Amerika	156.594	356	372
Asien	134.170	4.006	7.821
Europa	209.441	2.963	2.479
Ozeanien	24.813	-	-
Welt	549.693	8.723	13.801

Quelle: Eigene Darstellung nach FAO 2006b

1.2. Schaf und Ziege in Deutschland und insbesondere in Bayern

Die Zahl der in Deutschland gehaltenen Schafe ist nach wie vor rückläufig. Im Jahr 2006 belief sich der Bestand hierzulande auf 2,6 Mio. Tiere insgesamt. Das entspricht einem Rückgang von etwa 5 % zum Vorjahr (ZMP 2006a). In Bayern fiel der Bestandsrückgang der Schafe mit 0,2 % zum Vorjahr jedoch sehr gering aus. Der Schafbestand in diesem Bundesland bleibt mit 449.000 Tieren einigermaßen konstant (Bayerisches Landesamt für Statistik und Datenverarbeitung 2007a).

Die Anzahl der in Deutschland gehaltenen Ziegen beläuft sich auf 170.000 Tiere (FAO 2006b) und stellt damit einen unwichtigen Wirtschaftszweig in der Agrarproduktion dar. Dies gilt auch für Bayern. Dort wird der derzeitige Ziegenbestand auf etwa 22.000 Tiere geschätzt. Dennoch ist Bayern, neben Baden-Württemberg, Hessen, Thüringen und Schleswig-Holstein, eines jener Bundesländer mit vergleichsweise hoher Schaf- und Ziegendichte (Abbildung 5). Eine genaue Auskunft über die tatsächlich in Bayern gehaltenen Ziegen ist nicht möglich, da bereits seit 1977 für diesen Bereich keine amtlichen Viehzählungen mehr durchgeführt werden (STMLF Bayern 2006).

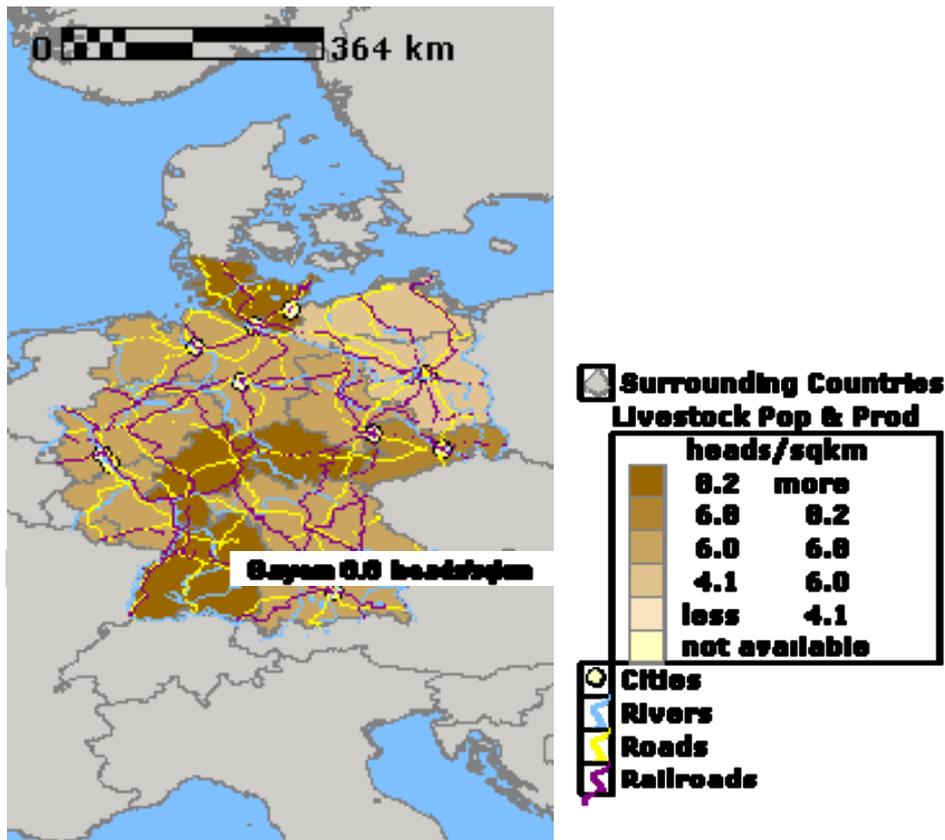


Abbildung 5: Deutschlandkarte der Population von kleinen Wiederkäuern

Quelle: GliPHA, 2004

Ziegen werden in Deutschland, im Gegensatz zum Schaf, vielfach zur Hobbyhaltung aus Freude am Tier gehalten. Die Erzeugung von Milch und Fleisch stehen daher sehr häufig nicht im Vordergrund. Die Ziegenhaltung ist eine Nischenproduktion für einige wenige landwirtschaftliche Unternehmen. Allerdings gewinnen die Erzeugung von Fleisch und die Milchproduktion von kleinen Wiederkäuern zunehmend an Bedeutung. Die Ursachen für diese Entwicklung sind einerseits, dass landwirtschaftliche Flächen mit geringem Nutzungswert in die Schaf- und Ziegenhaltung sinnvoll eingebracht werden können, also der Aspekt der Landschaftspflege. Zum anderen unterliegen Schaf und Ziegenmilch keiner Kontingentierung und des Weiteren werden Produkte von Schaf und Ziege vom Verbraucher mit gesund und naturbelassen verbunden und finden so ihren Platz auf der Bio-Schiene (LfL Sachsen 2004).

In Bayern erfolgt der überwiegende Teil der Vermarktung von Schaf- und Ziegenprodukten im Direktabsatz ab Hof oder auf Wochenmärkten. Für einige Milchviehbetriebe stellt die Ziegenhaltung mit der Möglichkeit zum Direktabsatz sogar eine Einkommensalternative zur Milchviehwirtschaft dar. Der überwiegende Anteil der bayerischen Ziegen wird in Kleinbetrieben mit bis zu 10 Ziegen gehalten, doch steigt die Zahl jener Betriebe, die eine größere Anzahl Ziegen halten (Tabelle 4). Rund 130 Betriebe in Bayern mit insgesamt ca. 9400 Ziegen haben sich der intensiveren Ziegenhaltung verschrieben und wirtschaften mit rationelleren Arbeitsmethoden, wie etwa durch den Einsatz von speziellen Ziegenmelkmaschinen (STMLF Bayern 2006).

Tabelle 4: Betriebsgrößenstruktur der Ziegenhaltung in Bayern

Ziegenbestandsgröße	Ziegen		Betriebe	
	Stück	%	Anzahl	%
1 bis 4	3 196	18,6	1 501	68,9
5 bis 9	2 254	13,1	359	16,5
10 bis 19	2 335	13,6	185	8,5
20 bis 49	1 602	9,3	59	2,7
50 und mehr	7 827	45,4	73	3,4
Gesamt	17 208	100	2 177	100

Quelle: eigene Darstellung nach STMLF Bayern 2006

Die Schafhaltung in Deutschland ist nach wie vor rückläufig. Dies schlägt sich auch in der Produktion nieder. Demnach kam es zu einem deutlichen Rückgang bei der Erzeugung. Der Pro-Kopf-Verbrauch für Fleisch von kleinen Wiederkäuern lag 2006 bei 1,1 kg. Das liegt im EU-Vergleich im unteren Drittel. Insgesamt standen für den Konsumenten in Deutschland rund 922.000 t Schaf- und Ziegenfleisch zum Verbrauch zur Verfügung. Davon stammt etwa die Hälfte (53 %) aus heimischer Produktion (ZMP, 2006b). In Bayern lag die Produktion von Schaffleisch 2006 bei einer Menge von 26.000 t. Das entspricht einem deutlichen Anstieg der Schlachtmenge zum Vorjahr um 8 %. Bei den Schlachtmengen von Ziegen ist sogar eine Steigerung um 14 % von 94 t (2005) auf 109 t (2006) zu verzeichnen (Bayerisches Landesamt für Statistik und Datenverarbeitung 2007b).

Während deutschlandweit die Schafbestände sinken, blieben sie in Bayern die letzten Jahre konstant bei ca. 450.000 Tieren. Bayern gehört, neben Baden-Württemberg und Schleswig-Holstein, zu jenen Ländern, in denen sich mit 40 % des deutschen Bestandes die Schafhaltung konzentriert. Durchschnittlich hält dort jeder Betrieb etwa 55 Schafe. (STLMF Bayern 2006). Jedoch überwiegt nach wie vor die kleinbetriebliche Struktur. Etwa 30 % aller Betriebe halten bis zu 10 Schafe. Die größte Fraktion mit annähernd 49 % bilden jene Betriebe, die zwischen 10 und 50 Tiere halten. Dennoch konzentriert sich mit über 52 % die größte Fraktion der bayerischen Schafe auf einige wenige Haupterwerbsbetriebe, mit Tierzahlen von 200 Schafen und mehr, bis hin zu 1500 Schafen (Bayerisches Landesamt für Statistik und Datenverarbeitung 2007a). Einen Überblick über die Struktur der Betriebsgrößen gibt Tabelle 5.

Tabelle 5: Betriebsgrößenstruktur der Schafhaltung in Bayern

Schafbestandsgröße	Schafe		Betriebe	
	Stück	%	Anzahl	%
1 bis 9	11 448	2,5	2 384	29,9
10 bis 49	95 598	20,6	3 888	48,7
50 bis 199	112 839	24,4	1 294	16,2
200 und mehr	242 976	52,5	416	5,2

Quelle: eigene Darstellung nach STMLF Bayern 2006

Zur Produktion von Schafmilch und Schafmilchprodukten werden in Deutschland keine Daten ausgewiesen, da die erzeugten Mengen nicht systematisch erfasst werden. Für Ziegenmilch gibt die FAO für die Bundesrepublik Deutschland eine Produktion von 35.000 t im Jahr 2006 an.

1.3. Schaf-und Ziegenrassen und deren Haltung

Schafressen

Schafe waren unter anderem die ersten Tiere, die domestiziert wurden. Bereits vor ca. 6000 Jahren wurde damit begonnen, Schafe auf ihre Wolle zu selektieren. Dennoch stimmen die meisten Merkmale der heutigen Schafe mit dem ursprünglichen Schaftyp überein. Die Selektion der Schafe auf bestimmte Wolltypen, Fleischigkeit und andere Merkmale, über Jahrhunderte hinweg, brachten schließlich eine Vielzahl von über 200 Rasse-Arten weltweit hervor (OSU- Oklahoma State University 1995).

In Deutschland werden die verschiedenen Rassen in 4 Rassegruppen zusammengefasst. Dazu zählen nach Dittrich und Seuser (1996):

Merinoschafe

- Merinolandschaf
- Merinofleischschaf
- Merinolangwollschaf

Fleischschafe

- Deutsches Schwarzköpfiges Fleischschaf
- Deutsches weißköpfiges Fleischschaf
- Blauköpfiges Fleischschaf
- Texelschaf
- Leineschaf
- Suffolk
- Charolaisschaf

Milchschafe

- Ostfriesisches Milchschaft

Landschafe

- Heidschnucken
- Rhönschaf
- Coburger Fuchsschaf
- Bentheimer Landschaf
- Waldschaf

Merinoschafe:



Abbildung 6: Merinoschaf

Quelle: aid-Infodienst, 2007

Das Merinolandschaf entstand im 18. Jahrhundert aus einer Kreuzung vom Süddeutschen Landschaf und feinwolligen, spanischen Merinos. Sie ist heute mit 30,1 % der gesamten Schafpopulation, die häufigste Rasse in Deutschland. Ihre Beliebtheit resultiert aus der problemlosen Haltung mit hohen Aufzuchtquoten, der guten Wollleistung, guten Gewichtszunahmen und einer guten Fleischleistung. Das Merinolandschaf ist sehr widerstandsfähig, marsch- und sehr gut pferchfähig und wird deshalb häufig in der Hütehaltung zur Landschaftspflege eingesetzt (DITTRICH und SEUSER 1996).



Abbildung 7: Merinofleischschaf

Quelle: aid-Infodienst, 2007

Das Merinofleischschaf entstand im 19. Jahrhundert aus deutschen Merinos unter Einkreuzung französischer Merino-Kammwollschafe und englischer Fleischrassen. In Deutschland ist sie heute überwiegend in Niedersachsen, Sachsen-Anhalt, Sachsen,

Mecklenburg-Vorpommern und Brandenburg verbreitet. Die vom Aussterben bedrohte Rasse hat ein schnelles Wachstum mit betonter Fleischleistung und einen nicht-saisonalen Fruchtbarkeitszyklus mit drei Ablammungen in zwei Jahren. Ihre hohe Fruchtbarkeit und der gute Fleischansatz machen diese Rasse hervorragend geeignet für eine intensive Milchlamm-Produktion (MASON 1996, DITTRICH und SEUSER1996)

Fleischschafe:



Abbildung 8: Schwarzköpfiges Fleischschaf

Quelle: aid-Infodienst, 2007

Das Schwarzköpfige Fleischschaf geht im Wesentlichen auf englische Fleischschaffrassen wie Leicester, Southdown und Hampshire zurück, die 1850 in deutsche Rassen eingekreuzt wurden, um die Fleischleistung zu steigern. Die Wollpreise waren zu dieser Zeit sehr schlecht, dagegen erzielte das Fleisch höhere Preise. Die Hauptverbreitungsgebiete liegen in Hessen, Rheinland-Pfalz, Schleswig-Holstein, Niedersachsen und zum Teil in Süddeutschland. Mit 17 % Rasseanteil steht sie an zweiter Stelle der weitverbreitetsten Schafrassen in Deutschland (DITTRICH und SEUSER 1996, MASON 1996).



Abbildung 9: Texelschaf

Quelle: aid-Infodienst, 2007

Anfang des 19. Jahrhunderts wurde das Texelschaf auf der Insel Texel an der niederländischen Küste gezüchtet. Damals wurden englische Fleischrassen in die dort ansässige hochbeinige Schafrasse eingekreuzt. Das Zuchtziel war die Produktion schwer bemuskelter Lämmer von vorzüglicher Fleischqualität. Auch heute noch ist das hervorstechende Merkmal des Texelschafes seine starke Bemuskelung (MASON 1996).



Abbildung 10: Suffolk

Quelle: aid-Infodienst, 2007

Die Rasse Suffolk entstand 1810 aus einer Kreuzung von einem Southdown Hammel und einem Norfolk Horned Mutterschaf und vereint deren gute Merkmale. Es ist ein sehr frühreifes Fleischschaf mit ausgeprägten Fleischformen an Keule, Rücken und Brust und einer sehr guten Schlachtkörperqualität. Im Gegensatz zum schwarzköpfigen Fleischschaf ist der Kopf bis hinter die Ohren unbewollt (DITTRICH und SEUSER 1996, MASON 1996).

Landschafe:



Abbildung 11: Deutsches Bergschaf

Quelle: Nö LZV für Schafe und Ziegen, 2007

Das Deutsche Bergschaf stammt vom Stein- und Bergamaskerschaf ab. Sein Hauptverbreitungsgebiet sind die Alpen und der Alpenvorraum. Es handelt sich um ein anspruchsloses, den teils widrigen Witterungsverhältnissen angepasstes Tier. Es hat zum Schutz vor Kälte und Nässe eine sehr lange Wolle und harte Klauen und ist deshalb zur Landschaftspflege im Hochgebirge prädestiniert. (DITTRICH und SEUSER 1996).



Abbildung 12: Braunes Bergschaf

Quelle: Nö LZV für Schafe und Ziegen, 2007

Das Braune Bergschaf stammt vom weißen deutschen Bergschaf ab, unter denen es schon immer braune Tiere gegeben hatte. Mittlerweile wurde es als leichter Typ des weißen Bergschafes weiter gezüchtet. Durch seine harten Klauen ist das Braune Bergschaf steig- und trittsicher und an die raue und niederschlagsreiche Witterung im Hochgebirge angepasst (Nö LZV für Schafe und Ziegen 2007).



Abbildung 13: Tiroler Steinschaf

Quelle: Nö LZV für Schafe und Ziegen, 2007

Das Tiroler Steinschaf ist die älteste Schafrasse Tirols und an das raue Hochgebirgsklima angepasst. Durch die harten Klauen, straffen Fesseln und kräftigen Beine ist diese Rasse an niederschlagsreiche Hochgebirgslagen gut angepasst (Niederösterreichischer Landeszuchtverband (Nö LZV) für Schafe und Ziegen 2007).



Abbildung 14: Krainer Steinschaf

Quelle: Nö LZV für Schafe und Ziegen, 2007

Das Krainer Steinschaf kommt in Kärnten, der Steiermark, im Burgenland, Niederösterreich und in Bayern vor und stammt ursprünglich vom Zaupelschaf ab. Das besondere Merkmal dieser Milchschafrasse ist die Mischwolle mit etwas grobem Langhaar und feinen Wollfasern (Nö LZV für Schafe und Ziegen 2007).

Ziegenrassen

Die Ziege ist neben dem Schaf eines der ältesten domestizierten Tierarten. Über 200 Ziegenrassen sind bekannt. Dennoch gleichen diese Rassen dem Urtyp der Ziege noch sehr (OSU 1995). Nachfolgend werden jene Ziegenrassen vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit beprobt wurden.



Abbildung 15: Bunte deutsche Edelziege

Quelle: aid-Infodienst, 2007

Im Jahr 1928 wurden alle braunen Ziegenschläge zu der Bunten Deutschen Edelziege zusammengefasst. Die heute unverwechselbare Rasse, wurde durch Selektion innerhalb lokaler Ziegenschläge gezüchtet. Das Hauptverbreitungsgebiet ist Bayern und Baden-Württemberg. Es handelt sich um eine widerstandsfähige, futterdankbare und langlebige Ziege mit typischem schwarzem Aalstrich auf dem Rücken (DITTRICH und SEUSER 1996).



Abbildung 16: Weiße deutsche Edelziege

Quelle: aid-Infodienst, 2007

Die weiße Deutsche Edelziege entstand Ende des 19. Jahrhunderts durch Kreuzung der deutschen, weißen Landschläge mit italienischen Saanenziegen. Diese Rasse kommt insbesondere in der nördlichen Hälfte Deutschlands vor. Neben der Saanenziege ist die weiße deutsche Edelziege eine sehr leistungsfähige Milchziegenrasse. Die Milchleistung liegt bei Spitzentieren bei über 1500 kg. Das entspricht ca. dem 20fachen des Körpergewichts (DITTRICH und SEUSER 1996 und SAMBRAUS 1993).



Abbildung 17: Toggenburger Ziege

Quelle: aid-Infodienst, 2007

Wie der Name schon sagt, kommt diese Ziege ursprünglich aus dem Raum Toggenburg in der Schweiz, wo sie zunächst nur als lokale Rasse vorkam. Heute kommt sie in Deutschland relativ häufig vor. Die Jahresmilchmenge liegt bei 800 kg und damit etwas niedriger als bei den Edelziegen. (DITTRICH und SEUSER 1996).



Abbildung 18: Burenziege

Quelle: aid-Infodienst, 2007

Die Burenziege ist eine gut bemuskelte Fleischziege mit mittlerem bis großem Rahmen. Da es sich um eine Fleischziege handelt, sind für die Zucht hohe Ablammraten gefordert. Mindestens eine Lammung pro Jahr und tägliche Gewichtszunahmen der Lämmer von 200 bis 250 g sind die Regel. Wegen ihres ruhigen Temperamentes hält man diese Fleischziegenrasse gerne gemeinsam mit Schafen. Sie werden zur Landschaftspflege eingesetzt, im Besonderen dann, wenn die Verbuschung von Landstrichen verhindert werden soll (DITTRICH UND SEUSER 1996).

Haltung von Schaf und Ziege

In der Schafhaltung gibt es spezielle Haltungsformen, die bei anderen Nutztieren nicht oder nicht mehr existieren. Man unterscheidet die Koppel- und Einzelschafhaltung, die standortgebundene Hütehaltung, die Wanderschafhaltung und die ganzjährige Stallhaltung:

- 1.) Bei der Koppelschafhaltung werden die Tiere auf umzäunten Weideflächen ohne ständige Beaufsichtigung gehalten. Zu den Weideverfahren zählt die Standweide, bei der eine Parzelle dauerhaft beweidet wird, und die Umtriebsweide, bei der ein turnusmäßiger Wechsel zwischen Weiden und Mähen erfolgt. Auf diese Weise wird etwa 42 % des deutschen Schafbestandes gehalten.
- 2.) Die standortgebundene Hütehaltung ist gekennzeichnet durch einen Schäfereibetrieb, der seine Tiere auf nahegelegenen Dauergrünland oder Brachflächen weiden lässt, und bei Gelegenheit auch Stoppelweiden, Zwischenfruchtanbauflächen, Kleeschläge oder Hackfruchtflächen be- oder nachweidet. Nachts werden die Schafe entweder gepfercht oder in den Stall gebracht. Im Winter erfolgt die Aufstallung. Ca. 39 % des deutschen Schafbestandes wird so gehalten.
- 3.) Die Wanderschäferei zeichnet sich durch den jahreszeitlichen Standortwechsel der Schafherde zwischen oft weit auseinander liegenden Weideplätzen aus. Sie folgt dem Vegetationsverlauf. Im Sommer weiden die meist sehr großen Herden in Höhenlagen, auf Grenzertragsböden und landwirtschaftlich nicht mehr genutzten Flächen. Zur Herbst- und Winterweide werden die Schafe in klimatisch günstigere Regionen, wie etwa Flusstäler getrieben. Für die Landschaftspflege ist diese Form der

Schafhaltung besonders wertvoll, da sie durch ihre Flexibilität in der Lage ist, nicht ständig beweidbare, schutzwürdige Flächen zu pflegen. 18,3 % aller deutschen Schafe werden auf diese Weise gehalten.

- 4.) Die ganzjährige Stallhaltung ist wenig verbreitet und kommt nur in solchen Betrieben zur Anwendung, die eine zweimalige Ablammung im Jahr anstreben und eine intensive Lämmermast betreiben (BUCHENAUER 1997a).

Bei den Ziegen unterscheidet man grundsätzlich in Weide- und Stallhaltung. Eine Kombination dieser beiden Haltungsformen kommt ebenfalls vor. Zur Weidehaltung gehören die Standweide und die Umtriebsweide, die auch als Mischweiden mit anderen Tieren gemeinsam genutzt werden. Bei der Stallhaltung unterscheidet man den Anbindestall, den Einzelboxenlaufstall und den Laufstall:

- 1.) Im Anbindestall wird die Ziege am Fressplatz angebunden und damit ihr Bewegungsradius erheblich eingeschränkt. Diese Form der Haltung ist am wenigsten geeignet für eine artgerechte Haltung.
- 2.) Der Einzelboxenlaufstall eignet sich nur für kleine Betriebe. Jedes Tier wird bei diesem System in einer eingestreuten Box gehalten. Durch die gute Beobachtungsmöglichkeit des Einzeltieres eignet sich dieses System gut für die Lämmeraufzucht.
- 3.) Der Laufstall ist ein weit verbreitetes System bei der Milchziegenhaltung und in Liege-, Fress- und Melkbereich unterteilt. Oftmals wird der Laufstall mit einem Laufhof oder einer nahe gelegenen Wiese kombiniert. Dies dient der Steigerung des Wohlbefindens und damit der Leistungssteigerung der Milchziegen.

Selten werden Ziegen, zusammen mit Schafen, in der Hütehaltung gehalten. Das erfolgt in einem größeren Ausmaß nur in der hessischen Rhön und auf der Schwäbischen Alb und dient der Landschaftspflege, um eine Verbuschung dieser Biotope zu verhindern. (BUCHENAUER, 1997b).

2. Shigatoxin-bildende *E. coli* und *Y. enterocolitica*

2.1. Taxonomie und Eigenschaften von Shigatoxin-bildenden *E. coli*

Die Spezies *Escherichia coli* wurde erstmals 1885 durch den Kinderarzt Escherich aus Stuhlproben von Säuglingen isoliert. Sie zählt zu der Gattung *Escherichia* und wird der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet. Es handelt sich um ein gramnegatives, fakultativ anaerobes, nicht sporenbildendes, peritrich begeißeltes, gerades Stäbchenbakterium. Als wichtiger Kommensale im Intestinaltrakt von Mensch und Tier besitzt *E. coli* keine Pathogenität. Daneben gibt es aber auch *E. coli* Varianten, die für Mensch und Tier pathogen sind und als Pathovare bezeichnet werden (HACKER und HEESEMANN 2000). Diese sind durch Übertragung von Pathogenitätsfaktoren aus ehemals apathogenen *E. coli* entstanden. Ihre Pathogenität liegt darin begründet, dass die verschiedenen Pathovare bestimmte genetisch und biochemisch zu definierende Faktoren, wie Adhäsine (Fimbrien), Invasine, Toxine, Moduline, Effektorproteine, Siderophore und andere Überlebensfaktoren bilden, die für die Pathovare charakteristische Virulenzmuster ausbilden und mit Hilfe dieser Determinanten auch diagnostisch erkannt werden können (LEVIN 1987, TSCHÄPE und FRUTH 2001).

Insgesamt sind 9 *E. coli* Pathovare bekannt. Sechs davon sind als darmpathogen anzusehen, während die übrigen Pathovare ihre hauptsächliche Wirkung im extraintestinalen Bereich entfalten. Diese werden als uropathogene (UPEC), nephropathogene (NPEC) und septo-pathogene (SPEC) *E. coli* bezeichnet. Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC), auch Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC), oder im Bezug auf humanmedizinische Erkrankungen, Enterohaemorrhagische *E. coli* (EHEC) genannt (BEUTIN et al. 1994), zählen zu den darmpathogenen *E. coli* und stehen in der epidemiologischen Bedeutung für die Industrieländer an vorderster Stelle. Ihnen folgen in der Reihenfolge: Enteropathogene *E. coli* (EPEC), Enterotoxische *E. coli* (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Enteroaggregative *E. coli* und Diffus adhärente *E. coli* (DAEC).

E. coli ist also nicht nur in seinen Pathovaren außerordentlich divers, sondern auch in seinen speziesspezifischen Eigenschaften, wie etwa die Fermentation von Kohlenhydraten, der Bildung von Sekundärprodukten oder Oberflächenstrukturen. Im Allgemeinen fermentieren *E. coli* Glukose, Laktose und Sorbitol. Sie sind Oxidase negativ, die überwiegende Anzahl der Stämme außerdem Katalase positiv. *E. coli* können weiterhin Arabinose, Trehalose, Maltose, Mannit und Glycerin verwerten. Viele Stämme sind durch ihre peritriche Begeißelung beweglich, einige besitzen die Fähigkeit zur Kapselbildung. Auch in ihrer Kolonieförmigkeit weisen *E. coli* Unterschiede auf. Man unterscheidet eine smooth-(s)-Form: leicht konvexe Kolonien mit feuchter, glänzender Oberfläche und glattem Rand, eine rough-(r)-Form: trockene Kolonien mit rauer Oberfläche und gezähntem Rand und eine schleimproduzierende Form.

Serotyp

Die serologische Einteilung der unterschiedlichen *E. coli* Stämme ermöglicht die Einteilung nach Kaufmann (1947) über O- H- und K-Antigene. O-Antigene sind thermostabile Lipopolysaccharide (LPS) und Bestandteil der Bakterienzellwand. Das H-Antigen stellt das thermolabile Geißel-Antigen dar, während das K-Antigen, das sogenannte Kapsel-Antigen, eine eigene serologische Spezifität aufweist, da es chemisch von Genus zu Genus verschieden ist. Mit Hilfe dieser Gruppen von Antigenen wurde ein System der Subdifferenzierung entwickelt, welches als Serotypie bezeichnet wird. Gegenwärtig lassen sich über 170 O-, ca. 100 K- und 56 H-Antigene differenzieren (ROLLE und MAYR 1993). Die Serotypie stellt demnach aufgrund des umfangreichen Polymorphismus der O- und H-Antigene für die Untersuchung von *E. coli*-Bakterien, im Gegensatz zur Chemo- und Biotypie, eine grundlegende Methode dar (NATARO und KAPER 1998). Tabelle 6 zeigt einige Beispiele der Serotypisierung von *E. coli*.

Tabelle 6: Serotypische Charakterisierung von Diarrhoe-auslösenden *E. coli*.

Kategorie	Serogruppe	Assoziiertes H-Antigen
EHEC	O157	H7
	O26	H11, H32
	O55	H7
EPEC	O86	H34
	O11	H2, H12
ETEC	O6	H16
	O148	H28
EAEC	O3	H2
EIEC	O167	H4, H5

Quelle: Eigene Darstellung nach NATARO und KAPER (1998)

2.2. Pathogenitätsfaktoren und Pathogenese von STEC

Vor über dreißig Jahren wurde zum ersten Mal bekannt, dass einige *E. coli*-Arten in der Lage sind, Toxine zu produzieren, die Vero-Zellen in Kultur beeinflussen können (KONOWALCHUCK et al. 1977). Dieses pathogene Agens, später als VTEC, synonym auch als STEC bekannt, wurde als Ursache für die Hämorrhagische Colitis (HC) und das Hämolytische Urämische Syndrom (HUS) erkannt (WILSON und BETTELHEIM 1980). Man entdeckte 1982 erstmals den Zusammenhang zwischen zwei Ausbrüchen von HC in den USA mit STEC des Serotyps O157:H7 (RILEY et al. 1983). Jene STEC, die solche Erkrankungen beim Menschen auslösen können, werden seither EHEC genannt (BEUTIN et al. 1994). STEC weisen ein breites Spektrum verschiedener Pathogenitätsfaktoren auf, deren Relevanz aber in vielen Fällen noch nicht vollständig geklärt ist. Das Robert-Koch-Institut (RKI) schlägt daher vor, jeden STEC/VTEC als potenziellen EHEC anzusehen, auch im Hinblick darauf, dass immer wieder neue Serotypen ermittelt werden und so eine endgültige Definition humanpathogener STEC nicht möglich ist (RKI 2006).

Der wichtigste Virulenzfaktor und das definierende Charakteristikum von EHEC ist das Zytotoxin Shigatoxin (Stx). Zur Shigatoxin-Familie zählen zwei Gruppen, die Stx1 und die Stx2 Gruppe. Das Stx1 ist identisch mit dem Shigatoxin von *Shigella*

dysenteriae und hoch konserviert, während bei Stx2 einige Sequenzvarianten vorkommen. Diese Subtypen werden Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f genannt (MELTON-CELSA und O'BRIAN 1998; DUFFY et al. 2001 und THORBE et al. 2002). Das Shigatoxin besteht aus einer A- und einer fünfteiligen B-Untereinheit. Das A-Peptid vermittelt die enzymatische, also die Toxin Aktivität, während die B-Einheit als Glykolipid Rezeptor an Globotriasylceramide (Gb3) der eukaryonten Zellen andockt. Nach erfolgter Endozytose entfernt die A-Einheit, eine N-Glykosidase, ein Adenin aus der 28S rRNA und verhindert so die Proteinsynthese. Die Zelle, ob renale Endothelzelle oder intestinale Epithelzelle, jene Zelle mit einem Gb3-Rezeptor stirbt ab. Sowohl das *stx1*-Gen, als auch das *stx2*-Gen sind auf lamdoiden Prophagen lokalisiert, die in das EHEC-Chromosom integriert sind (SANDVIG und VAN DEURS 1994; SANGER et al. 1996).

Das enteroaggregative Shigatoxin (EAST1), ein hitzestabiles Enterotoxin und erstmals bei EAEC nachgewiesen, findet sich auch bei sehr vielen EHEC Arten. Es wird von dem Gen *astA* kodiert, welches im Chromosom lokalisiert ist (SAVARINO et al. 1996). Welche Rolle das EAST1 bei der Pathogenese von EHEC spielt ist nicht genau bekannt. Es wird jedoch sehr häufig bei Patienten nachgewiesen die an einer unblutigen Diarrhoe durch EHEC erkrankt sind (NATARO und KAPER 1998). Das Enterohämolysin (Ehly bzw. Ehx) wird von 4 Genen kodiert (*ehxA*, *ehxB*, *ehxC*, *ehxD* bzw. *hlyA*). Diese liegen auf dem Virulenzplasmid p0157. Beim Ehx handelt es sich um ein porenbildendes Zytotoxin, das der Familie der RTX-Toxine (repeats in toxin) angehört. Es kommt in Deutschland bei über 90 % der *stx*-positiven *E. coli*-Arten vor und wird auch oft bei HUS Patienten nachgewiesen. Welche Rolle es genau spielt wird kontrovers spekuliert. Man vermutet, dass das Enterohämolysin zur Lyse von Erythrozyten befähigt ist. Dadurch wird u.a. Hämoglobin frei, welches dem Wachstum von *E. coli* förderlich ist (KARCH et al. 1998, BEUTIN 2000).

Ein weiteres Merkmal zahlreicher EHEC-Stämme ist die Bildung von Attaching and Effacing (A/E)-Läsionen an Enterozythen. Das geschieht mit Hilfe des Proteins Intimin, welches von dem Gen *eae* kodiert wird. Dieses Gen liegt auf einer als LEE (Locus of Enterocyte Effacement) bezeichneten Pathogenitätsinsel im Chromosom. Diese Region enthält außerdem noch weitere Virulenzgene wie das *esp*, *esc*, *sep* und *tir*. Diese Gene kodieren für ein Typ-III-Sekretionssystem, mittels welchem die

Virulenzdeterminanten in die Wirtszelle transportiert werden. Der erste Schritt besteht zunächst in der Anheftung des Bakteriums an die epitheliale Zellmembran (attaching), bevor es im zweiten Schritt durch die Proteine des Typ-III-Sekretionssystem zur Polymerisation von Aktin und zum Umbau des Zytoskelettes kommt, wodurch ein Eindringen in die Zelle möglich ist, und damit die Zerstörung der Mikrovilli eingeleitet wird (MAINIL und DAUBE 2005).

Weitere Pathogenitätsfaktoren sind die Serinprotease (EspI), die Katalase/Peroxidase (KatP), der Marker eines Typ-II-Sekretionssystems (EtpD), das bereits erwähnte Typ-III-Sekretionssystem mit seinen Effektorproteinen z.B. (EspB), ein Adhäsion (Iha), das Eisenaufnahmesystem (HPI) sowie die Endotoxine (LPS).

Die Pathogenese einer typischen EHEC-Infektion stellt man sich folgendermaßen vor: EHEC weisen eine hohe Säuretoleranz auf, dadurch übersteht es die Passage durch den Magen mit seinem sauren Milieu sehr gut. Dementsprechend gering ist die benötigte Dosis an EHEC um eine Infektion auszulösen. Anschließend folgt die Kolonisierung der intestinalen Schleimhaut, überwiegend im Dickdarmbereich. Die Adhäsion gelingt durch Pathogenitätsfaktoren wie etwa Fimbrien und das Eae-Protein Intimin, welches eine sehr enge Bindung an die Enterozythen bedingt (KARCH et al. 2000, TSCHÄPE und FRUTH 2001). Mit Hilfe des Typ-III-Sekretionsapparates kommt es zu Umbauvorgängen und schließlich zum Auslösen der betroffenen Zelle (attaching and effacing). Schließlich werden die Stx-Toxine freigesetzt. Diese gelangen über die Blutbahn (Toxämie) zu ihren hauptsächlichen Zielzellen, den Endothelzellen kleiner Arterien des Gastrointestinaltraktes, der Niere, und des Gehirns (MAINIL und DAUBE 2005). Dort bindet das Toxin mit seiner B-Untereinheit an Gb3-Rezeptoren. Diese Globotriacylceramid-Rezeptoren (Gb3) sind nicht gleichmäßig im Körper verteilt, manche Organe besitzen eine höhere Rezeptorendichte als andere. Das erklärt, warum besonders die Niere befallen wird. Insbesondere Säuglinge und Kleinkinder haben eine sehr hohe Rezeptorendichte und sind deshalb anfälliger für HUS (LINGWOOD 2003). Die A-Untereinheit des Stx, eine N-Glycosidase, spaltet einen Purin-Rest von der 28S rRNA, ändert damit die Funktion des Ribosoms, welches dadurch zu einer Interaktion mit dem Elongationsfaktor nicht mehr in der Lage ist. Es kommt zum Proteinsynthesestopp und damit zum Tod der Zielzelle (MAINIL und DAUBE 2005). Abbildung 19 zeigt diesen Vorgang schematisch.

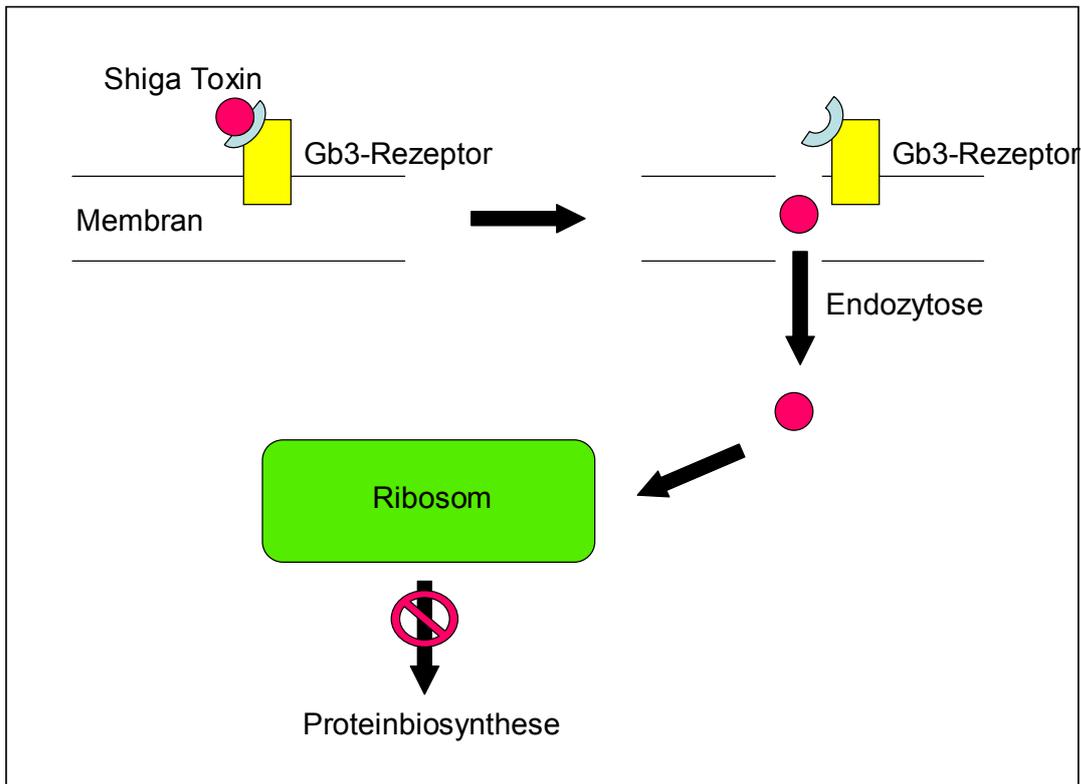


Abbildung 19: Skizzierter Funktionsmechanismus des Shiga-Toxins

Gb3: Globotriacyceramid-Rezeptor

Die A-Untereinheit des Stx, hier als rote Kugel dargestellt, löst sich von seiner zweiten Komponente, der B-Untereinheit, hier als helle Sichel dargestellt. Diese B-Untereinheit ist an einen Gb3-Rezeptor, gelber Block im Schaubild, gebunden. Der Gb3-Rezeptor ist in der Membran einer Zelle verankert. Die A-Untereinheit des Stx gelangt durch Endozytose in die Zelle und stört die Funktion des Ribosoms. Daraufhin kommt es zum Proteinsynthesestopp und somit zum Absterben der betroffenen Zelle.

Die Schädigung des Endothels bewirkt die Freisetzung des von-Willebrandt-Faktors. Die Freilegung der Basalmembran ist ein potenter Stimulus für die Aggregation von Thrombozyten mit anschließender Fibrinablagerung. Diese Veränderungen kann man bei HUS-Patienten vor allem in den kleinen Gefäßen der Niere, im Vas afferens, und in den glomerulären Kapillaren nachweisen. Aber auch in anderen Organen kommen diese mikroangiopathischen Veränderungen vor. Besonders gefürchtet ist

das Auftreten von zerebralen Manifestationen, da diese mit einer besonders hohen Letalität verbunden sind (BOYD und LINGWOOD 1989, LOUISE und OBRIG 1995).

2.3. Krankheitsbild beim Menschen

Eine Ansteckung des Menschen mit EHEC kann zu mehreren Krankheitsbildern führen und reicht von asymptomatischen Infektionen bis hin zum Tod. Nach einer Inkubationszeit von ein bis drei, bis hin zu acht Tagen kommt es zu einem wässrigen Durchfall mit abdominalen Krämpfen. Dieser wässrige Durchfall kann innerhalb der nächsten zwei, drei Tage in einen blutigen Durchfall übergehen (GRIFFIN 1995). Bei Kindern kommen oft noch Übelkeit, Erbrechen und Fieber hinzu. Säuglinge sind selten auch von einer nekrotisierenden Kolitis oder einer Dickdarminvagination mit Ileus betroffen. Erwachsene hingegen sind oft symptomlos oder zeigen uncharakteristisch, selbstlimitierende, wässrige Enteritis, die sich von Durchfallerkrankungen anderer infektiöser Genese klinisch nicht unterscheidet. Auch bei chronischer Kolitis konnte EHEC nachgewiesen werden (KARCH et. al. 2000).

Neben den vielfältigen intestinalen Krankheitsbildern wie den akuten lokal entzündlichen Prozessen des Dickdarms können sich über eine HC, lebensbedrohliche postinfektiöse Syndrome wie HUS oder die thrombotisch-thrombocytopenisch-Purpura (TTP) entwickeln (ACHESON et al. 1997). HUS, früher auch als Morbus Gassner bezeichnet, kann in jedem Lebensalter auftreten, ist aber überwiegend eine Erkrankung von Säuglingen und Kleinkindern und immungeschwächten, älteren Menschen. HUS zeichnet sich durch die Trias der mikroangiopathischen-hämolytischen Anämie, Thrombozytopenie und akutes Nierenversagen aus. Sie gilt als die häufigste Ursache für Nierenversagen im Kindesalter. Einige Tage nach Beginn oder kurz nach Besserung der Durchfälle kommt es zu hämatologischen Veränderungen, wie mikroangiopathische Hämolyse mit Fragmentation der Erythrozyten und akutem Hämoglobinabfall, massive LDH-Erhöhung, Thrombozyten-Sturz im peripheren Blut, und nephrologischen Veränderungen, wie stetiger Anstieg der harnpflichtigen Substanzen, Anurie, Elektrolyt-Entgleisung, Überwässerung bis hin zu akutem Nierenversagen, das in zwei bis zehn Prozent der Fälle tödlich endet, oder bei Überleben, in über zehn Prozent zu terminalem Nierenversagen führt. Auch extrarenale Komplikationen wie

zerebrale Krampfanfälle, Koma und Hirnödeme können auftreten (KARCH und BOCKEMÜHL 1989, KARCH et al. 1996).

Man unterscheidet verschiedene Ursachen für ein HUS. Das infektionsassoziierte, durch STEC ausgelöste HUS, auch enteropathisches HUS genannt (D+HUS) mit einem vorausgegangenem Durchfallkomplex, und ein atypisches, sporadisches HUS (D-HUS), dem keine Durchfallproblematik vorausgegangen ist und dessen Ätiologie in vielen Fällen ungeklärt bleibt (IRADJ und BARDIA 2006). Die TTP tritt fast nur im Erwachsenenalter auf und zeichnet sich, neben ähnlichen Symptomen wie bei HUS, durch neurologische Probleme aus.

2.4. Epidemiologie von STEC

Die Epidemiologie von STEC ist immer noch unvollständig geklärt. Jedoch haben epidemiologische Studien gezeigt, dass STEC in einer Vielzahl von Serotypen weltweit vorkommt und zwar unabhängig sowohl von der geographischen Region als auch vom Klima (BEUTIN 2006). In den meisten Fällen ist eine Infektion des Menschen mit STEC nahrungsmittelassoziiert. Das Hauptreservoir stellen Rinder da. Aber auch Schafe, Ziegen, Wildwiederkäuer, Katzen, Hunde und Geflügel beherbergen Stx produzierende *E. coli* (BEUTIN et al. 1993, GRIFFIN und TAUXE 1991).

2.4.1. STEC beim Menschen

STEC gehören zu den Zoonose Erregern. Dementsprechend ist der direkte oder indirekte Nachweis enterohämorrhagischer Stämme laut § 7 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) meldepflichtig, sofern der Nachweis auf eine akute Infektion hindeutet. Für das Jahr 2006 ermittelte das Robert-Koch-Institut für Deutschland eine Anzahl von 1183 EHEC-Infektionen. Das entspricht einer Inzidenz von 1,4 pro tausend Einwohner. Im Jahr zuvor wurden 1161 Fälle erfasst und 2003 waren es 925 Fälle. In den Sommermonaten kommt es in jedem Jahr zu einem Anstieg der EHEC-Enteritis-Fallzahlen. Betroffen sind vor allem Kinder unter 5 Jahren, sie stellen mit 53 % aller Fälle die größte Fraktion dar. Einen zweiten

Häufigkeitsgipfel bei Menschen in höherem Lebensalter, wie er in der internationalen Literatur beschrieben wird, konnte das RKI aber nicht feststellen. Das mag auch daran liegen, dass bei Erwachsenen häufig keine Untersuchung des Stuhls auf EHEC erfolgte (RKI 2006).

Die Verteilung der Serotypen ist außerordentlich divers. Bei den meisten Ausbrüchen von EHEC Infektionen wurde weltweit der Serotyp 0157:H7 am häufigsten nachgewiesen. Man nimmt an, dass dieser Typ eine besonders hohe Virulenz und Transmissionsrate hat. BEUTIN et al. (2003) konnten jedoch, zumindest für Deutschland, nachweisen, dass eine Vielzahl von STEC-Typen eine Infektion des Menschen hervorrufen können. Diese erfolgt vor allem durch kontaminierte Lebensmittel. Dabei spielen rohe und ungenügend erhitzte Produkte vom Rind die Hauptrolle. Auch eine Übertragung durch kontaminiertes Wasser, sowie eine Übertragung beim Kontakt von Tier zu Mensch und eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist möglich (NATARO und KAPER 1998).

2.4.2. STEC bei Tieren

stx-positive *E. coli* können bei einer Vielzahl von Tieren in der fäkalen Flora nachgewiesen werden. Dazu zählen vor allem Wiederkäuer wie Rinder, Schafe, Ziegen und Wildwiederkäuer, als auch Schweine, Hunde, Katzen und Geflügel (GRIFFIN und TAUXE 1991, BEUTIN et al. 1993, JOHNSON et al. 1996, WALLACE et al. 1997).

Das **Rind** scheint bezüglich humanpathogener *E. coli* das wichtigste Reservoir zu sein. In vielen Ländern wurden hohe Kolonisationsraten von *Stx*-positiven *E. coli* bei Rinderherden nachgewiesen (GRIFFIN 1991, BEUTIN et al 1993, CLARK et al. 1994, HANCOCK et al. 1994, BURNENS et al. 1996, ZWEIFEL et al. 2004a, HUSSEIN 2005). HUSSEIN (2005) kommt bei seiner Literaturrecherche zu dem Ergebnis, dass STEC weltweit bei Rindermastherden weit verbreitet ist. In 0,2 bis 27,8 % der Fälle gehören diese STEC dem Typ 0157 an, während bis zu 70% Non-0157 STEC sind. Insgesamt wurden bei Mastrindern bei globalen Tests 261 verschiedene Serotypen gefunden, 44 davon können HUS auslösen. Bei Milchkühen fand HUSSEIN (2005) eine ähnliche Verteilung vor: dort gehören 0,2 bis 48,8 % aller

gefundenen STEC dem 0157-Typ an und 0,4 bis 74 % sind Non-0157 Arten. Von den 193 registrierten STEC-Serotypen wurden 24 auch bei an HUS erkrankten Patienten nachgewiesen. Es deutet also vieles darauf hin, dass das Rind ein wichtiges Reservoir für STEC ist, jedoch viele der isolierten Serotypen nicht humanpathogen sind (ZSCHÖCK et al. 2000). Das Rind selbst erkrankt in der Regel nicht an humanpathogenen Arten wie STEC 0157:H7. QUANTRELL et al. (2004) untersuchten, weshalb dies so ist. Sie machten hauptsächlich eine unterschiedliche Shigatoxin-Rezeptorverteilung beim Mensch und beim Rind dafür verantwortlich. Auch unterschiedliche Kolonisationsmuster, beim Rind wird nur der caudale Teil des Rektums besiedelt, unterschiedliche Genexpression und Signalkaskaden liefern eine Erklärung, warum humanpathogene STEC für das Rind ungefährlich sind. Jedoch scheinen andere Serotypen durchaus in der Lage bei Kälbern eine Durchfallproblematik auszulösen. WIELER et al. (1992) fanden bei Durchfallkälbern einen signifikant höheren Prozentsatz an *stx*-positiven *E. coli* und sehen darin einen Zusammenhang. Auch bei **Wildwiederkäuern** konnten STEC nachgewiesen werden. LEHMANN et al. (2006) untersuchten Kotproben freilebender Wildwiederkäuer und von Gatterwild. Circa die Hälfte (29 von 56) der Proben war *stx*-positiv. Des Weiteren konnten 11 verschiedene Serogruppen identifiziert werden.

2.5. STEC bei kleinen Wiederkäuern

Die Prävalenz von humanpathogenen STEC, allen voran 0157:H7, ist bei Schaf und Ziege etwas geringer als die von Rindern. Dennoch stellen kleine Wiederkäuer eine potentielle Infektionsquelle für den Menschen dar. Eine Übertragung z.B. über Milchprodukte ist durchaus möglich (MAINIL 1999, BLANCO et al. 2001, BROWN et al. 2001). Schaf und Ziege weisen vermehrt Non-0157 Serotypen auf. Dennoch sind einige Arten humanpathogen, wie etwa die Serotypen 026:H11, 049:H⁻ 0128:H2 und 0156:H⁻. Speziell an das Schaf oder die Ziege adaptierte Varianten gehören den Serotypen 052:H12, 0156:H25, 06:H10, 136:H20 an. Diese sind zum überwiegenden Teil *stx1* positiv, nur ein geringer Teil der an kleine Wiederkäuer adaptierten Serotypen weisen das Gen *stx2* auf. (RAMACHANDRAN et al. 2001, BRETT et al. 2003). STEC die das *stx2*-Gen beherbergen, wurden jedoch bei den meisten an HUS erkrankten Patienten nachgewiesen (CAPRIOLI et al. 1995).

Um das Potential von STEC bei kleinen Wiederkäuern als humanes Pathogen einschätzen zu können, wurden in vielen Ländern die Prävalenz und die Serotypenverteilung bei Schaf und Ziege getestet. BEUTIN et al. (1993) untersuchten in Deutschland das Gebiet Berlin und stellten fest, dass 80 von 120 (66,6 %) Schafen, und 37 von 66 (56,1 %) getesteten Ziegen, STEC mit dem Kot ausscheiden (Tabelle 7). Am häufigsten kam bei beiden Wiederkäuerarten der Serotyp 05:H⁻ vor. Mittels des Verozelltestes wurden alle bei Schaf und Ziege gefundenen STEC-Isolate auf das Vorhandensein von *stx*-Genen überprüft. Sowohl beim Schaf als auch bei der Ziege konnte am häufigsten die Kombination aus *stx1* und *stx2* (59 von 120 Schafen, 49,16 %,) festgestellt werden. Bei den Ziegen trat diese Kombination bei 33 von 66 Tieren (50 %) auf. Bei 30 (25 %) Schafen und 6 (9 %) Ziegen kam *stx2* vor. *stx1* wurde am seltensten nachgewiesen (16 % Schafe, 1,5 % Ziegen) Demnach stellen, nach BEUTIN et al. (1993), kleine Wiederkäuer in Deutschland durchaus ein wichtiges Reservoir für STEC dar.

ZSCHÖCK et al. (2000) untersuchten Wiederkäuer in Hessen auf ihr STEC Ausscheidungsverhalten. Sie entnahmen bei Rindern sowie bei Schafen und Ziegen rektale Tupferproben, strichen diese auf Gassner-Platten aus und führten alle laktose-positiven *E. coli* Kolonien einer multiplex-PCR zu. Das Team isolierte bei 9 von 28 (32,1 %) untersuchten Schafen und bei 70 von 93 (75,3 %) untersuchten Ziegen STEC. Davon waren 6 (21,4 %) der ovinen und 68 (73,1 %) der caprinen STEC Isolate für das *stx1* positiv. Das *stx2*-Gen konnte bei 3 von 28 (10,7 %) Schafen und bei 1 von 93 (1,1 %) Ziegen nachgewiesen werden. Die Kombination beider Gene, *stx1* und *stx2* kam dagegen selten vor, nämlich bei keinem der untersuchten Schafe und nur bei einer der Ziegen (Tabelle 7).

In der Schweiz untersuchten ZWEIFEL et al. (2004a) die Prävalenz von STEC bei 653 Schlachtschafen und wurden bei 195 (29,9 %) Tieren fündig Als Untersuchungsmaterial entnahm Zweifels Gruppe jeweils 10 g vom Caecum des geschlachteten Tieres. Es erfolgte eine Anreicherung in Brilliant Green Bile Broth und ein Ausstrich auf Schafblut Agar. Nach der Aufreinigung wurden die Proben einem PCR Screening unterzogen. Von den Isolaten wiesen 44,7 % das *stx1*-Gen auf, 14,5 % wurden positiv für das *stx2*-Gen getestet und 40,8 % trugen sowohl *stx1* als auch *stx2* (Tabelle 7). Keines der *stx*-positiv getesteten Isolate gehörte jedoch zu der humanpathogenen 0157-Gruppe.

In Spanien fand man mit Hilfe des PCR-Verfahrens und des Verozelltests aus rektalen Tupferproben bei 7 von 697 (1 %) gesunden Lämmern STEC des humanpathogenen Typs 0157:H7. 246 (35 %) weitere Tiere wiesen im Kot STEC auf, jedoch von Nicht-0157 Arten. Insgesamt konnten 253 ovine STEC Arten ausgemacht werden. Davon waren 110 (43 %) *stx1* positiv, 10 (4 %) *stx2* positiv und 133 (53 %) der Isolate enthielten sowohl *stx1* als auch *stx2* (Tabelle 7). REY et al. (2003) kamen zu dem Schluss, dass Schafe ein durchaus wichtiges Reservoir für humanpathogene STEC in Spanien darstellen. Jedoch wurde vermutet, dass es sich bei den meisten Nicht-0157 STEC um schwach pathogene Arten handelt.

BLANCO et al. (2003) untersuchten in Spanien 1.300 Schaflämmer, entnahmen rektale Tupferproben und untersuchten diese mittels PCR auf STEC. Die humanpathogene Variante 0157:H7 wurde bei 5 Tieren (0,4 %) nachgewiesen. 462 (36 %) Lämmer wiesen Nicht-0157 STEC auf. Insgesamt stieß man auf 384 STEC Arten. Davon trugen 213 (55 %) nur das *stx1*-Gen, 10 (3 %) das *stx2*-Gen und 161 (42 %) *stx1* und *stx2* (Tabelle 7). Weiterhin wurden 105 verschiedene Serotypen ausgemacht. 55 (52 %) dieser gefundenen ovinen Serotypen konnten auch beim Menschen isoliert werden, einschließlich der 24 Serotypen, die mit HUS assoziiert sind.

OPORTO et al. (2008) untersuchten im Norden Spaniens 122 Schafherden auf STEC. Hier wurden rektal entnommene Kotproben verwendet und mittels Immunomagnetischer Separation (IMS), einem Enzym-linked Fluoreszenz Immunoassay (VIDAS) und PCR auf STEC untersucht. Die Prävalenz der Herden für STEC 0157:H7 lag bei 8,7 % und jene von Nicht-0157 Varianten bei 50,8 %. Um die Ausscheidung von 0157 innerhalb einer Herde zu untersuchen, wurden 279 Einzeltiere aus 6 verschiedenen Herden untersucht. Mit der PCR wurden 49 *E. coli* 0157 und 209 Nicht-0157 Isolate entdeckt. Alle 0157 Varianten trugen das *stx2*-Gen. Bei den Nicht-0157 Typen war hauptsächlich die Kombination aus *stx1* und *stx2* vertreten. Es muss also auch hier von einem Reservoir für STEC in Schafherden ausgegangen werden.

Norwegische Schafe sind ebenfalls Träger von STEC, wie man durch PCR Nachweise feststellen konnte (URDAHL et al. 2001). Über 86 % der untersuchten

Isolate aus 18 Schafherden, in denen jeweils zwischen einer und 15 Proben isoliert wurden, trugen das *stx1*-Gen, 56 % das *stx2*-Gen (Tabelle 7). Die meisten isolierten Serogruppen (z.B. 05, 091, 0182), so stellte sich heraus, sind Schaf-assoziiert, jedoch wollte man das Schaf als Träger humanpathogener STEC nicht ausschließen (URDAHL et al. 2002).

In Neuseeland, neben Australien eines der Länder mit intensivster Schafzucht, fand man bei 87 von 132 (65,9 %) der untersuchten Tiere *stx* positive *E. coli* (Tabelle 7). Sie gelten als wichtiges Reservoir für STEC. Der direkte Kontakt zu Schafen als auch der Konsum von mit Schafkot verunreinigtem Wasser und Lebensmittel wird als wichtige Ansteckungsquelle für den Menschen angesehen (COOKSON et al. 2006).

Australien, eines der größten Schaf-produzierenden Länder, besitzt ebenfalls eine hohe Prävalenz von STEC bei Schafen. In einer groß angelegten Studie von DJORDJEVIC et al. (2001) in der 1623 Kotproben aus 65 Herden untersucht wurden, fanden sich in 85 % der Schlachtlämmer und in 95 % der Schlachthammel STEC Isolate (Tabelle 7). Die häufigsten gefundenen Serotypen waren 0128:H2, 0123:H-, 0157:H-, 05:H- und 091:H-. Diese Serotypen kommen auch bei ernsthaften Erkrankungen des Menschen, wie etwa HC oder HUS, vor.

Eine weitere Studie von FEGAN und DESMARCHELLIER (1999) ergab eine STEC-Prävalenz von 45 % von 144 auf australischen Farmen untersuchten Schafen, und eine Prävalenz von 36 % von 72 am Schlachthof untersuchten Lämmern. Von insgesamt 117 STEC Isolaten exprimierten 64 % sowohl das *stx1*- als auch das *stx2*-Gen, bei 22 % wurde das *stx1*-Gen nachgewiesen und bei 14 % kam das *stx2*-Gen vor (Tabelle 7).

Tabelle 7: Vorkommen von STEC bei Schaf und Ziege

Tierart	Land	Anzahl unters. Tiere	Probenmaterial	Nachweismethode	STEC-positiv (%)	stx1	stx2	stx1+2	Referenz
Schafe	BRD	100	Rektale Tupferproben	Verozell-Test	80 (66,6 %)	16,0 %	25,0 %	49,2 %	BEUTIN et al. (1993)
Schafe	BRD	28	Rektale Tupferproben	Multiplex-PCR	9 (32,1%)	21,4 %	10,7 %	-	ZSCHÖCK et al. (2000)
Schafe	Schweiz	653	Caecum-Proben	PCR	195 (29,9 %)	44,7 %	14,5 %	40,8 %	ZWEIFEL et al. (2004)
Lämmer	Spanien	1300	Rektale Tupferproben	PCR	467 (35,9 %)	55,0 %	3,0 %	42,0 %	BLANCO et al. (2003)
Lämmer	Spanien	697	Rektale Tupferproben	PCR, Verozell-Test	253 (36,3 %)	43,0 %	4,0 %	53,0 %	REY et al. (2003)
Schafherden	Norwegen	124	Kotproben	PCR	61 (49,0 %)	86,0 %	56,0 %	-	URDAHL et al. (2001 und 2002)
Schafe	Australien	144	Kotproben	PCR	127 (88,0 %)	22,0 %	14,0 %	45,0 %	FEGAN und DESMACHELIER (1999)

Tierart	Land	Anzahl unters. Tiere	Probenmaterial	Nachweismethode	STEC-positiv (%)	stx1	stx2	stx1+2	Referenz
Schafe	Australien	1632	Kotproben	PCR	85 %Lämmer bzw 95 %Hammel	-	-	-	DJORDJEVIC et al. (2001)
Schafe	Neuseeland	132	Rektale Tupferproben	Multiplex PCR	87 (65,9 %)	10,4 %	8,7 %	3,5 %	COOKSON et al. (2006)
Ziegen	BRD	66	Rektale Tupferproben	Verozell- Test	37 (56,1 %)	1,5 %	9,0 %	50,0 %	BEUTIN et al. (1993)
Ziegen	BRD	93	Rektale Tupferproben	Multiplex PCR	70 (75,3 %)	73,1 %	1,1 %	1,1 %	ZSCHÖCK et al. (2000)

2.6. Nachweismethoden für STEC

Der Nachweis von STEC kann kulturell, oder aber durch molekularbiologische und immunologische Verfahren erfolgen. Der kulturelle Nachweis ist jedoch nicht einfach, da die biochemische Ähnlichkeit von STEC mit der physiologischen Darmflora sehr hoch ist. Des Weiteren stellt die geringe Anzahl von STEC im Vergleich zur Normalflora, oftmals kommt ein STEC auf 200-300 Keime der Normalflora, ein Problem dar. Erschwerend kommt die große Anzahl an *E. coli*-Serotypen hinzu, die zur Stx-Bildung fähig sind (KARCH et al. 1996). Es empfiehlt sich daher, den kulturellen Nachweis von 0157:H7 Merkmalen mit molekularbiologischen oder immunologischen Methoden zur Detektion von Shigatoxinen zu kombinieren.

Mikrobiologische Nachweisverfahren

Eine Anzucht und Isolierung von STEC aus Kotproben, erfolgt in der Regel erst nach Voranreicherung in einem flüssigen Medium, etwa Trypton-Soja-Bouillion, der zur weiteren Selektion Supplemente wie Cefixim und Vancomycin zugesetzt werden. Nach Übernachtenreicherung bei 25° C werden die Keime auf Selektivmedien ausgestrichen und 24 Stunden bei 42° C bebrütet. Zu den Selektivmedien gehört der Sorbitol-MacConkey-Agar (SMAC), der als einzige Kohlenstoffquelle Sorbit enthält. Im Gegensatz zu den meisten *E. coli*-Arten kann der Serotyp 0157:H7 Sorbit nicht fermentieren und zeichnet sich durch farblose Kolonien aus, die durch den fehlenden Indikator-Umschlag zu Stande kommen. Einige Varianten des SMAC-Agars können die Selektivität und Differenzierungsrate noch steigern. Der Zusatz von Cefixim und Tellurit (CT-SMAC) fördert das Wachstum von *E. coli* 0157:H7, hemmt aber alle anderen *E. coli*-Arten (ZADIK et al. 1993). Eine weitere Variante des Agars mit dem Zusatz von Cefixim und Rhamnose (CR-SMAC), macht sich die Fähigkeit von 0157:H7 zunutze, Rhamnose zu fermentieren. Die meisten anderen Serotypen, die ebenfalls Sorbitol nicht fermentieren können, haben diese Eigenschaft nicht (CHAPMAN et al. 1996). Fluorokult ist ein weiterer Selektivagar, der sich die Tatsache zunutze macht, dass STEC 0157:H7, im Gegensatz zu den meisten anderen Serovaren, kein Methylumbiferryl-b-D-glucuronid (MUG) spalten kann. Die MUG-Spaltprodukte fluoreszieren unter UV-Licht. Also nur bei Abwesenheit von 0157:H7 kommt es zur Fluoreszenzzone um die Kolonien (BEUTIN et al. 1994).

Mit Hilfe der immunologischen Nachweismethoden werden O- und H-Antigene oder Stx durch spezifische und markierte Antikörper nachgewiesen. Dazu zählen Enzym-Immunoassays, Colony Blot und passive Agglutinationsassays. Ein besonderes Nachweissystem ist die immunomagnetischen Separation (IMS). Hierbei werden magnetische Partikel verwendet, die mit Anti-0157 Antikörpern umhüllt sind. Diese Antikörper-umhüllten Minimagnete werden in, mit Untersuchungsmaterial angereichertem Flüssigmedium, suspendiert. Ein angelegter Magnet separiert nun die an den Antikörper haftenden STEC-Stränge von der Bouillon. Dadurch werden 0157-Stränge stark angereichert. Die IMS ist einer der sensitivsten Methoden um STEC nachzuweisen (KARCH et al. 1996). Mit Enzym-linked-Immunosorbent Assays (ELISA) können mit markierten Antikörpern spezifische Antigene, wie das 0157 LPS und das H7-Antigen, detektiert werden. Meistens aber verwendet man Antikörper, die sich gegen das Toxin Stx und oder dessen Varianten Stx1, Stx1c, Stx1d, Stx2, Stx2e, Stx2d richten. ELISA Testsysteme sind kommerziell erhältlich, einfach zu handhaben und liefern ein schnelles Ergebnis. Ihre Sensitivität und v. a. die Spezifität sind hoch (DYLLA et al. 1995).

2.7. Taxonomie und Eigenschaften von *Y. enterocolitica*

Die Gattung *Yersinia* trägt den Namen ihres Entdeckers, des Mediziners und Bakteriologen Alexandre Jean Emil Yersin, der erstmals den Erreger der Pest 1894 in Hongkong isolierte (BERCOVIER und MOLLARET 1984). Es handelt sich um gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchen, die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. Sie zeigen ein kokkoides bis stäbchenförmiges, pleomorphes, kapsellooses Aussehen, sind alkalistabil und psychrotroph. Sie sind zur Nitritreduktion aus Nitrat befähigt, bilden Urease und sind Katalase positiv, als auch Oxidase negativ. Yersinien fermentieren Glukose unter Säurebildung, manche Spezies mit geringer Gasbildung. Des Weiteren zeichnet sie die Fähigkeit zur Fermentation von Melibiose, Rhamnose und Sucrose aus. Yersinien vermehren sich bei Temperaturen von 4-42°C, ihr Temperaturoptimum liegt bei 28-29°C. Knapp unterhalb ihres Temperaturoptimums, bei 22-25°C, sind Yersinien begeißelt, Ausnahme: *Y. pestis*, verlieren aber ihre Beweglichkeit bei wärmeren Temperaturen von 35-37°C (BERCOVIER und MOLLARET 1984, NEUBAUER et al. 2001).

Derzeit zählen zum Genus *Yersinia* 14 verschiedene Spezies: *Y. aldovae*, *Y. aleksicae*, *Y. bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. mollaretii*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. rhodei*, *Y. ruckeri* und *Y. similis* (NEUBAUER et al. 2001, BOCKEMÜHL und ROGGETIN 2004, MERHJEJ et al. 2008 und SPRAGUE et al. 2008). Für den Menschen pathogen sind allein die Arten *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*. *Y. ruckeri* verursacht bei Forellen die Enterische Rotmaulkrankheit und zeigt deutliche genetische Unterschiede zu anderen *Yersinia*-Arten (BAUMGARTEN et al. 1977, COVER und ABER 1989, ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1999, BOCKEMÜHL und ROGGETIN 2004).

2.7.1. Biotyp

Die Spezies *Y. enterocolitica* besteht, biochemisch gesehen, aus einer heterogenen Gruppe, was eine Unterscheidung in einzelne Typen notwendig machte. Es fand deshalb eine Einteilung in sechs Biotypen statt (1A, 1B, 2, 3, 4 und 5). Inzwischen wird der Biotyp 1A, der lange Zeit als apathogen galt, auch als Enteritis-Erreger, vor allem bei Erwachsenen, erkannt (BURNENS et al. 1996). Nach TENNANT et al. (2003) existieren innerhalb des Biotyps 1A zwei Subgruppen. Zum einen pathogene Stämme klinischen Ursprungs, zum anderen apathogene Stämme, welche in der Umwelt vorkommen.

2.7.2. Serotyp

Eine Typisierung aufgrund serologischer Eigenschaften findet bei *Y. enterocolitica* im Wesentlichen durch zwei Antigenstrukturen statt. Zum einen durch das Oberflächen (O)-Antigen, ein hitzestabiles Lipopolysaccharid, welches hauptsächlich zur Differenzierung herangezogen wird, und zum anderen das Geißel-(H)-Antigen und auch das Kapsel-(K)-Antigen. Durch Forschungen von WAUTERS (1981), BREUER und KNIWALLNER (1985) sowie ALEKSIC und BOCKEMÜHL (1990) waren mittlerweile 60 O-Antigengruppen bekannt. Davon entfallen aber nur 28 Serogruppen auf *Y. enterocolitica*. Um deren Typisierungsmuster zu vereinfachen, nahm man eine Einteilung vor, die, der klinischen Bedeutung des Menschen entsprechend, nur

Serotypen von *Y. enterocolitica* beinhaltet. Durch die Kombination der H-Antigene mit den O-Antigenfaktoren kann man heute 76 Serogruppen mit 293 Serotypen unterscheiden (ALEKSIK 1995).

2.8. Pathogenitätsfaktoren von *Y. enterocolitica*

Y. enterocolitica besitzt mehrere Pathogenitätsfaktoren. Die entsprechenden Genstrukturen sind zu einem großen Teil chromosomal kodiert, ein weiterer Teil ist auf dem Plasmid kodiert (ZINK et al. 1980, HEESEMANN 1990, BHADURI 2002). In nicht-pathogenen *Yersinia*-Spezies und Umweltisolaten wurde bisher kein Virulenzplasmid gefunden (HILL et al., 1983). Alle pathogenen *Yersinia*-Arten dagegen besitzen das Virulenzplasmid pYV (DEDIE et al. 1993). Dieses ca. 70 kb große Plasmid kodiert für die Produktion löslicher Polypeptide, die als „*Yersinia* outer proteins“ (Yop) bezeichnet werden. Diese stellen eine Gruppe von Eiweißen dar, die bei niedrigen Kalziumkonzentrationen und Temperaturen von 37°C, Bedingungen wie sie innerhalb einer Wirtszelle vorkommen, vom Plasmid exprimiert werden und damit für die Virulenz des Erregers verantwortlich sind. Sie vermitteln u.a. Phagozytoseresistenz, Zytotoxizität, induzieren die Apoptose und inhibieren bzw. modifizieren die Zytokinfreisetzung und verändern somit die Immunantwort (CORNELIS 1998).

Neben dem Plasmid sind auch chromosomal kodierte Faktoren für die volle Virulenz verantwortlich. Dazu zählt die für die Anheftung und Invasion verantwortliche Gensequenz *ail* (attachment invasion locus). Neben Anheftung und Invasion in die eukaryote Zelle vermittelt das durch ihn verschlüsselte Protein (Ail) auch die Resistenz der Bakterien gegenüber dem Komplementsystem. Das *ail*-Gen lässt sich nur in pathogenen *Yersinia*-Arten nachweisen. Bringt man das Gen in einen apathogenen Stamm ein, so kommt es nicht zu einer Invasion (CARNIEL 1995).

Ein weiterer chromosomal kodierter Faktor ist das *inv*-Gen, welches für das Invasin, ein 92 kDa schweres Protein auf der äußeren Membran, kodiert. Dieses *inv*-Gen kommt bei allen enteropathogenen *Yersinia*-Arten vor. Allerdings konnte es auch bei apathogenen *Yersinia*-Spezies nachgewiesen werden, dort scheint es sich um ein nicht funktionsfähiges Gen zu handeln (HEESEMANN 1990).

2.9. Pathogenese von *Y. enterocolitica*

Den ersten Schritt der Pathogenese stellt die Passage des Bakteriums durch den Magen dar. Grundlage hierfür ist der Urea-Gen-Komplex, der eine Verdauung des Bakteriums durch den sauren Magensaft verhindert. Im Darm angekommen, kolonisiert es die Oberfläche der Dünndarmmukosa und löst damit Durchfall aus (DELOR und CORNELIS 1992). Anschließend folgt die Invasion ins Gewebe. Dies geschieht mit Hilfe des chromosomal lokalisierten *inv*-Gens und des *ail*-Gens, aber auch das auf dem Plasmid lokalisierte *yadA*-Gen trägt zur Invasion ins Gewebe bei, indem es die Bindung an den intestinalen Bürstensaum unterstützt (GRANT et al. 1998, BOTTONE 1999).

Typischerweise werden die Membran-Zellen (M-Zellen) als Eingangspforte benutzt. Normalerweise würden nun die befallenen Zellen phagozytiert, jedoch ist es pathogenen *Yersinia*-Arten möglich, durch plasmidcodierte Oberflächenstrukturen der Phagozytose zu entkommen und auch dem Komplementsystem zu widerstehen. Nach erfolgreicher Penetration der M-Zellen befallen pathogene Yersinien das Follikel-assoziierte Gewebe (FAE), ein Bestandteil der Peyerschen Platten, die dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT) angehören. Dort induzieren sie die Zerstörung des FAE und schwächen damit das darmeigene Abwehrsystem (PAL et al. 1980, HEESEMANN und GRÜTER 1987, BOTTON 1999, HOF und DÖRRIS, 2002). Durch eine rasante Vermehrung der Bakterien kommt es zunächst zu Entzündungsreaktionen des Oberflächenepithels. Die Keime können in die mesenterialen Lymphknoten streuen und gelangen schließlich in den Blutkreislauf. Über diesen Weg können alle Organe erreicht und in Abhängigkeit von der Resistenzlage des Patienten und der Aggressivität des Yersinien-Stammes geschädigt werden (DEDIE et al. 1993)

2.10. Krankheitsbild beim Menschen

Eine Infektion mit *Y. enterocolitica* äußert sich beim Menschen in variierenden Bildern. Am häufigsten erscheint die Erkrankung als enterale Form. Arthritis und Erythema nodosum kommen ebenfalls vor. Der Immunstatus und das Alter des Patienten entscheiden maßgeblich, ob die Krankheit auf den Darm beschränkt bleibt oder sich in Form einer extraintestinalen Erkrankung ausbreitet (HOOGKAMP-KONSTANJE und DE KONING 1990). Während immunpathologische Folgeerkrankungen häufig beobachtet werden, kommen Septikämie und extraintestinale Erkrankungsformen selten vor (HEESEMAN 1990).

Bei Kindern und Jugendlichen manifestieren sich die Beschwerden überwiegend als fiebrige Enteritis mit mesenterialer Lymphadenitis, Bauchschmerzen im Bereich des rechten unteren Quadranten des Abdomens (Pseudoappendizitis), Pharyngitis, Nausea, Erbrechen und Durchfall (AL MOHLSSEN et al. 1997). Bei Erwachsenen kommt es bei ca. 5 % der Erkrankten zu einem Morbus Crohn-ähnlichem Geschehen mit chronischem Verlauf und damit verbundenen immer wiederkehrenden Bauchschmerzen und Durchfall. Eine Yersinien-induzierte Kolitis betrifft ebenfalls vornehmlich Erwachsene. Es handelt sich dabei um eine schwere Entzündung des Dickdarmes mit diffusen Ulzerationen bis hin zur Perforation der Darmwand und anschließender Peritonitis. Erwachsene sind außerdem von der septischen Verlaufsform betroffen. Sie leiden unter multiplen Organabszessen, Vaskulitis, Hepatitis und Splenomegalie, septische Arthritis, Pleuritis und Endokarditis. Die Letalität ist hoch (HOOGKAMP-KONSTANJE und DE KONING 1990, COVER und ABER 1989).

Die extraintestinale Form der Yersinose kann klinisch den Charakter eines eigenständigen Krankheitsbildes annehmen. Hier sei die reaktive Arthritis genannt, die mit Rötung, Schwellung, Bewegungseinschränkung und Schmerzen verbunden ist. Meist gehen der reaktiven Arthritis abdominale Beschwerden und fieberhafte Durchfälle voraus. Auch allergische Reaktionen mit Hautveränderungen kommen vor, die sich als Erythema nodosum oder gelegentlich als Urticaria manifestieren (NAKTIN und BEAVIS 1999, PUTZGER et al. 2001). Ebenfalls als postinfektiöse Komplikationen können entzündliche Augenerkrankungen und das Reiters Syndrom,

gekennzeichnet durch Polyarthrit, Urethritis und Konjunktivitis auftreten. In Einzelfällen konnten auch immunologische Prozesse wie Myokarditis, Glomerulonephritis und Uveitis festgestellt werden (LARSEN 1979).

2.11. Epidemiologie von *Y. enterocolitica*

Y. enterocolitica ist weltweit verbreitet und tritt vor allem in gemäßigten Klimazonen Europas, Nord und Südamerikas, Nord-, Zentral- und Ostasiens, sowie in Australien und Südafrika auf (MOLLARET 1976, MARUYAMA 1987). Der Nachweis in tropischen und subtropischen Regionen ist nur vereinzelt oder gar nicht möglich (DEDIE et al. 1993). Oftmals sind laut SCHIEMANN (1989) die ursächlichen Zusammenhänge zwischen einer Yersiniose beim Menschen und der Infektionsquelle nicht nachvollziehbar. FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2006) kommen ebenfalls zu dem Schluss, dass eine Erkrankung des Menschen mit Yersinien nur sporadisch vorkommt, ohne dass deren Ursache erkennbar wäre.

2.11.1. *Y. enterocolitica* beim Menschen

Y. enterocolitica gehört zu den Antropozoonosen und ist in vielen Ländern, so auch in Deutschland, der dritthäufigste Durchfallerreger nach *Salmonella* und *Campylobacter* (ARNOLD et al. 2004). Mit Einführung des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) im Jahr 2001 wurden *Y. enterocolitica* erstmals meldepflichtig. Seitdem werden die Häufigkeiten einer Yersinieninfektion zentral erfasst. Es ist zu beachten, dass nur klinisch-labordiagnostische und klinisch-epidemiologisch erfasste Yersiniose-Fälle in die Jahresstatistik miteinbezogen werden. Ist von einem gemeldeten Fall beispielsweise nur die labordiagnostische Erregerisolierung bekannt, nicht aber das klinische Krankheitsbild, so wird dieser Fall in der Jahresstatistik nicht berücksichtigt (RKI 2002). Des Weiteren geht das RKI von einem kontinuierlichen Rückgang der Meldeinzidenz in den letzten Jahren aus. Vor allem Kleinkinder im Alter von 1-4 Jahren erkranken an einer Yersiniose. Mit zunehmendem Alter geht die Inzidenz zurück und liegt im Erwachsenenalter auf niedrigem Niveau. Geschlechtsspezifische Unterschiede können im Allgemeinen nicht festgestellt werden (RKI 2006). Die Infektion des Menschen erfolgt vor allen

Dingen alimentär über kontaminierte Lebensmittel und kontaminiertes Wasser. Auch eine Infektion mittels Bluttransfusion oder eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch ist möglich (STROBEL et al. 2000).

2.11.2. Y. enterocolitica bei Tieren

Y. enterocolitica tritt bei sehr vielen Tierarten in Erscheinung. Fast alle Wild-, Nutz- und Heimtiere sind betroffen. Auch bei Vögeln, Fischen, Reptilien und Schalentieren kommt der Erreger vor. Die meisten der isolierten Stämme sind apathogener Art (MOLLARET et al. 1979, WEBER u. LEMPKE 1981, NATTERMANN et al. 1986a). Jedoch konnten immer wieder auch pathogene Varianten nachgewiesen werden.

Beim **Rind** scheint dabei der Serotyp 0:9, Biotyp 2 oder 3 vorherrschend zu sein (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1996). Im Erkrankungsfall kommt es zu intermittierenden Durchfällen, Hyperplasie der Peyerschen Platten und der entsprechenden Darmlymphknoten. Selten treten Mastitiden, mesenteriale Lymphadenitis oder Aborte auf (NATTERMANN et al. 1986b). Das **Schwein** gilt als das Hauptreservoir für pathogenen Yersinien. Vor allem der Bioserotyp 4/0:3 wird bei dieser Tierart häufig nachgewiesen (BOTTON 1997). Der Nachweis gelingt vor allem aus Kot- und Tonsillenproben asymptomatischer Schlachtschweine (BÜLTE et al. 1991, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000). Im Fall einer Infektion treten hauptsächlich Enteritiden auf, auch Arthritiden und Pneumonie führen zu einer Minderleistung. Bei der Aufzucht führen Fruchtbarkeitsstörungen und Aborte, als auch Jungtierverluste und Entwicklungsstörungen beim Ferkel zu schlechten Aufzuchtergebnissen (NATTERMANN et al. 1985). Auch bei den **Nagetieren** und **Hasenartigen** lässt sich *Yersinia* nachweisen. Hier handelt es sich um den so genannten „Hasentyp“ 0:2,3 5 (WUTHE und ALEKSIC 1997). Dieser verursacht eine hämorrhagische bis fibrinöse Enterocolitis und Pleuritis. Des Weiteren können eine granulomatöse Splenomegalie und weitere granulomatöse Veränderungen in Lunge, Leber und Darmmukosa festgestellt werden (NEUBAUER et al. 2001). Dieses Krankheitsbild kann mit der Rhodentiose verwechselt werden, die durch *Y. pseudotuberculosis* verursacht wird. Beim **Nutzgeflügel** fehlen genauere Untersuchungen. NATTERMANN et al. (1986b) beschrieben vereinzelte Erkrankungsfälle und Isolierungen von pathogenen *Yersinia* aus seziierten Hühnern.

BUCHER et al. (2002) hielten, nach Untersuchungen an Puten (Kot-, Gaumen- und Zungenproben), das Geflügel für ein unwichtiges Reservoir. **Hunde** und **Katzen** stellen ein wichtiges Reservoir dar, da sie als Trägertiere eine Infektionsquelle für den Menschen darstellen können. Hier fungiert das Haustier als Verbindungsglied, indem der Hund nach Aufnahme von rohem oder ungenügend erhitztem Schweinefleisch den Erreger über Wochen hinweg ausscheiden kann. Die Katze infiziert sich oftmals über infizierte freilebende Nager. In vielen Fällen konnte der für den Menschen pathogene Bioserotyp 4/0:3 nachgewiesen werden, was einen solchen Übertragungsweg sehr wahrscheinlich werden lässt (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001). Klinisch manifeste Erkrankungen treten hauptsächlich beim Welpen auf und äußern sich in blutig, schleimigem Durchfall, adominalen Zysten und mesenterialer Adenitis. Gelegentlich kommen Infektionen der Analdrüsen hinzu (FANTASIA et al. 1993, FENWICK et al. 1994).

2.12. **Y. enterocolitica bei kleinen Wiederkäuern**

Über das Vorkommen von *Y. enterocolitica* bei **kleinen Wiederkäuern** ist wenig bekannt. KROGSTAD et al. (1972) beschrieben erstmals das Auftreten von *Y. enterocolitica* in einer Ziegenherde aus Norwegen. Dort wurde vornehmlich der Biotyp 5 und die Serotypen 0:2a, 2b und 3 nachgewiesen.

Aus Australien und Neuseeland wird von einem weit verbreitetem Vorkommen von *Y. enterocolitica* in Schaf und Ziegenherden berichtet (PHILBEY et al. 1991, SLEE and SKILBECK 1992, LANADA et al. 2005). SLEE und SKILBECK (1992) untersuchten in Australien 449 Schafherden und sammelten von je 10 Schafen einer Herde Kotproben. Von diesen 10 Kotproben wurden 4 Proben zufällig ausgewählt und auf *Y. enterocolitica* untersucht. Eine Herde galt als dann mit *Y. enterocolitica* infiziert, wenn mindestens eine der zufällig gewählten Proben als *Y. enterocolitica* positiv bewertet werden konnte. Der Nachweis erfolgte kulturell mit CIN Platten. Auf diese Weise wurden 78 von 449 (17 %) untersuchten Schafherden als *Y. enterocolitica* positiv erkannt (Tabelle 8). Die virulenten *Y. enterocolitica* Isolate gehörten alle dem Serotyp 02,3 an.

BAILEY et al (2003) untersuchten ebenfalls in Australien Kotproben von je 25 Schafen aus 19 Herden, konnten aber bei keinem einzigen Tier den kulturellen Nachweis für *Y. enterocolitica* erbringen (Tabelle 8). LANADA et al. (2005) sammelten in Neuseeland Kotproben von 30 Ziegenherden mit insgesamt 6770 Tieren. Zu Screening Zwecken wurden zunächst 317 Ziegen beprobt und mit kulturellen Methoden auf *Y. enterocolitica* untersucht. 18 Herden (60 %) stellten sich als *Yersinia* infiziert heraus. Aus diesen 18, als *Yersinia* positiv geltenden Herden wurden 902 Ziegen erneut beprobt und untersucht. 135 Tiere (14,97 %) wiesen *Yersinia* auf (Tabelle 8). Dabei fiel auf, dass vor allem Lämmer unter einem Jahr mit *Yersinia* infiziert sind. Der Bioserotyp 5/0:2,3 von *Y. enterocolitica* konnte am häufigsten (61 %) nachgewiesen werden.

MCNALLY et al. (2004) konnten während ihrer Untersuchungen in England bei 104 der untersuchten 973 (10,7 %) Schafe *Y. enterocolitica* nachweisen. Als Untersuchungsmaterial dienten Kotproben geschlachteter Tiere aus 118 verschiedenen Schlachthöfen. Der Biotyp 1A (62 %) wurde dabei am häufigsten isoliert, der verbleibende Rest konnte als Biotyp 3 (0:5,27) identifiziert werden (Tabelle 8). MILNES et al. (2007) führten einige Jahre später in Großbritannien erneut Prävalenzstudien über *Y. enterocolitica* durch. Sie untersuchten Kotproben von 2820 Schlachtschafen aus 93 verschiedenen Schlachthäusern. Die Identifizierung der *Yersinia* erfolgte kulturell anhand der Kolonienmorphologie und dem Urease Test mit anschließender Bio- und Serotypisierung. Bei 715 (8,0 %) der untersuchten Schafe konnte *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden (Tabelle 8). Der Biotyp 1A war mit 61 % am stärksten vertreten, während die verbleibenden 39 % dem Biotyp 3 und dem Serotyp 05,27 angehörten.

In Griechenland untersuchten KECHAGIA et al. (2007) das Vorkommen von *Y. enterocolitica* bei Schafen. Dazu sammelten sie 63 rektale Tupferproben (Tabelle 8), die zunächst kulturell und anschließend mit der PCR ausgewertet wurden. Es konnte ein *Yersinia* Strang isoliert werden, dieser gehörte jedoch nicht der Spezies *Y. enterocolitica* an.

Aus Deutschland sind kaum Daten über die Prävalenz von Yersinien in Wiederkäuerherden bekannt (WHUTE und ALEKSIC 1997, HARTUNG 2000). NIKOLAOU et al. (2005) untersuchten die Seroprävalenz von Anti-*Yersinia* Antikörper bei 681 Ziegen aus 28 verschiedenen Herden in Niedersachsen mit Hilfe eines Western Blots. Von den 681 untersuchten Ziegen-Sera enthielten 449 (66 %) Anti-YOP/V-Ag Antikörper (Tabelle 8). Diese Studie zeigt einen Trend hin zu Yersiniose in Ziegenbetrieben. ARNOLD et al. (2006) untersuchten daraufhin Kotproben aus 24 Ziegenherden im gleichen niedersächsischen Gebiet. Als Untersuchungsmaterial dienten aus dem Rektum entnommene Kotproben von 575 Tieren. Zur Identifizierung von *Yersinia* wurden die Proben zunächst angereichert und auf CIN-Agar kultiviert und im Anschluß dem API 20E-Test unterzogen. Es folgte die Bio- und Serotypisierung und zum Nachweis der Virulenzgene zwei verschiedene PCR-Assays. Von 575 Kotproben konnten aus 17 (3 %) Proben *Y. enterocolitica* isoliert werden (Tabelle 8). Diese gehörten dem für Menschen apathogenen Biotyp 1A an. Jene Herden mit der höchsten Prävalenz an *Y. enterocolitica* hatten Probleme mit Lämmerdurchfall. Die meisten untersuchten Tiere waren jedoch klinisch inapparent.

Tabelle 8: Vorkommen von *Y. enterocolitica* bei Schaf und Ziege

Tierart	Land	Anzahl unters Tiere	Probenmaterial	Y.e. positiv	Bio- und Serotyp	Referenz
Schafherden	Australien	449	Kotproben	78 (17,0 %)	5/02,3	SLEE und SKILBECK (1992)
Schafe	Australien	475	Kotproben	-	-	BAILEY et al. (2003)
Schafe	Griechenland	63	Rektale Tupferproben	-	-	KECHAGIA et al. (2007)
Schafe	Großbritannien	973	Kotproben	104 (10,7 %)	1A, 3/0:5,27	MCNALLY et al. (2004)
Schafe	Großbritannien	2820	Kotproben	715 (8,0 %)	1A, 3/0:5,2	MILNES et al. (2007)
Ziegen	Deutschland	681	Serum	449 (66,0 %)	-	NIKOLAOU et al. (2005)
Ziegen	Deutschland	575	Kotproben	17 (3,0 %)	1A	ARNOLD et al. (2006)
Ziegen- herden	Neuseeland	30	Kotproben	18 (60,0 %)	5/02,3	LANADA et al. (2005)

2.13. Nachweis von *Y. enterocolitica*

Y. enterocolitica lässt sich konventionell durch mikrobiologische Anzucht oder durch molekularbiologische Methoden nachweisen. Der Nachweis mittels kultureller Verfahren ist jedoch meist zeitaufwendig und nicht immer sensitiv genug. Mit molekularbiologischen Methoden kann *Yersinia* im Allgemeinen sicher und schnell nachgewiesen werden.

Mikrobiologische Nachweisverfahren

Der kulturelle Nachweis von *Y. enterocolitica* richtet sich nach der DIN EN ISO 10273, dem internationalen Standardverfahren und der Methode L00.00-90 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Absatz 1 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches. Demnach erfolgt zunächst eine Anreicherung in selektiven flüssigen Medien, bevor die so gewonnenen Kulturen auf feste Selektivmedien verimpft und visuell auf das Vorhandensein charakteristischer Kolonien von *Y. enterocolitica* geprüft werden. Im Anschluss erfolgt die biochemische Bestätigung, die Biotypisierung, die Untersuchung auf Pathogenität und möglicherweise eine serologische Untersuchung. Die Untersuchungsprobe wird im Verhältnis 1:10 in Pepton-Sorbit-Gallensalz-Bouillion (PSB) 48 h bis 72 h unter Schütteln oder 5 Tage ohne Schütteln bei 22-25°C; und im Verhältnis 1:100 in Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat- Bouillion (ITC) über 48 h bei 25°C angereichert (Abbildung 20). Dem folgt der Ausstrich auf festen Selektivmedien. Aus dem PSB-Medium wird das Kulturmedium auf Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN)-Agar, mit und ohne vorherige Kaliumhydroxidbehandlung, ausgestrichen. Aus der ITC-Kultur erfolgt die Überimpfung auf Salmonella-Shigella-Agar (SSDC). Die Platten werden nun für 24 h bei 30°C bebrütet, um dann fünf charakteristische Kolonien auszuwählen und erneut auf Nähragarplatten bei 30°C und 24 h zu bebrüten. Diese Reinkulturen werden anschließend biochemisch untersucht und auf ihre Pathogenität geprüft (Abbildung 20).

Eine weitere Methode zur Anreicherung von *Yersinia* ist die Kälteanreicherung in phosphatgepufferter NaCl-Lösung. Nach VAN NOYEN et al. (1980) werden 25 g der Versuchsprobe in 225 ml PBS (0,15 mol; pH 7,6) homogenisiert und für 7-21 Tage

bei 4°C verwahrt. Diese Methode ist für viele Probenarten geeignet aber sehr zeitaufwendig. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Zweischnitt-Anreicherung nach SCHIEMANN (1982). Die Probe wird in Trypton-Soja-Bouillon (TSB) homogenisiert und einen Tag bei 22°C inkubiert. Im zweiten Schritt verimpft man Kolonien aus dem TSB-Medium in eine Bile-Oxalat-Sorbose-Bouillon (BOS) und inkubiert das Ganze fünf Tage lang bei 22°C.

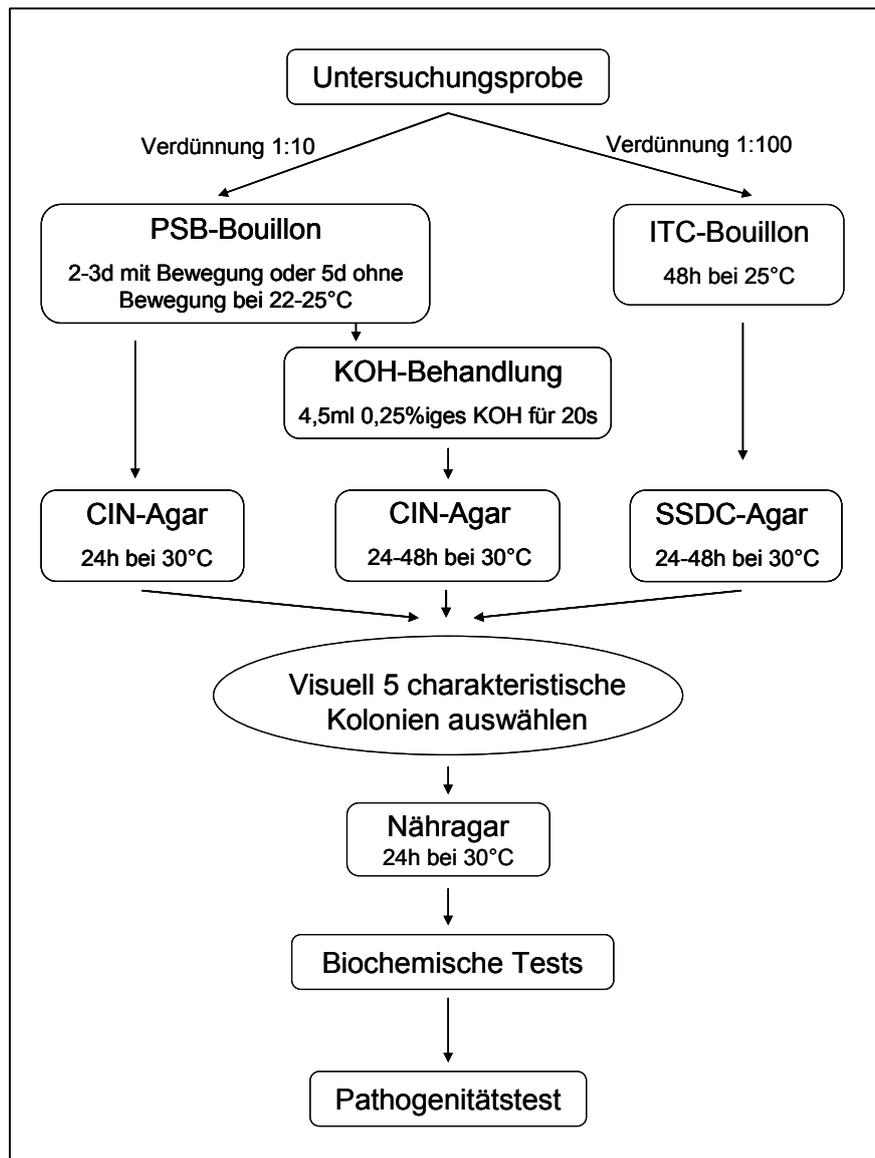


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Untersuchung pathogener Yersinien
(nach DIN EN ISO 10273)

PSB	Phosphat-Bile-Sorbitol Buffer
ITC	Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat
SSDC	Salmonella-Shigella-Desoxycholate-Calcium-Chlorate-Agar

Biochemische Identifizierung

Zunächst werden biochemische Verdachtstests durchgeführt um eine erste Orientierung zu erlangen. Die ISO 10273 schlägt dazu einen Urease-Nachweis vor, ebenso wie den Nachweis von Indol. Mit Hilfe des Kligler-Agars lässt sich die Glukosevergärung nachweisen und die Gasbildung aus Glukose prüfen. Am Schrägagar überprüft man die Lactosevergärung. Des Weiteren werden ein Oxidase-Test und die Prüfung auf H₂S-Bildung empfohlen.

Verdächtige Kolonien müssen weiter identifiziert werden. Dazu eignen sich kommerziell erhältliche Testsysteme wie der API 20E-Test. Dieses System bietet die Möglichkeit einer genauen Bestimmung der *Yersinia*-Spezies. Dazu werden verdächtige Kolonien erneut auf Nähragar subkultiviert und 24 h bei 30°C bebrütet. Mehrere Einzelkolonien werden nun in einem Suspensionsmedium homogenisiert. Mit dieser Bakteriensuspension wird schließlich das Testsystem befüllt und 20-24 h bei 28°C inkubiert. Eine genauere Differenzierung der *Y. enterocolitica*-Spezies gelingt durch die Bio- und Serotypisierung. Die Serotypisierung erfolgt durch Objektträger-Agglutination mit spezifischen Antisera (NEUBAUER et al. 2000b). Die Biotypisierung erfolgt anhand der Testung des biochemischen Verhaltens, etwa der Verstoffwechslung verschiedener Zucker, Decarboxylierung von Ornithin, Citratverwertung, Indolbildung und Voges-Proskauer Test. Nach WAUTERS et al. (1987) werden demnach 6 Biotypen unterschieden. Dazu zählen die Typen 1A, 1B, 2, 3, 4, 5 und 6.

Pathogenitätsnachweis

Die Pathogenität hängt sowohl von den auf dem Plasmid als auch von chromosomal kodierten Eigenschaften ab. Die ISO 10273 schlägt den Nachweis von Äeskuilin, Pyrazinamidase sowie der Calciumabhängigkeit vor. Die Calciumabhängigkeit und auch die Adsorption von Kongorot sind ein indirektier Nachweis für das Virulenzplasmid pYV. Beide Reaktionen weist man mit Hilfe des Kongorot-Magnesium-Oxalat-Agars (CRMOX) nach. Sind ebenfalls chromosomale Virulenzfaktoren vorhanden, dann verhindern diese den Abbau von Pyrazinamid, Salicin und Aesculin.

3. PCR- Nachweisverfahren für STEC und *Y. enterocolitica*

3.1. Polymerase-Ketten-Reaktion

Zu den modernsten und effektivsten Methoden, zum Nachweis von STEC und *Y. enterocolitica*, zählt die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Dabei handelt es sich um ein molekulargenetisches Verfahren, bei dem selektiv bestimmte DNA-Abschnitte vervielfältigt werden können. Das geschieht durch Imitation der DNA-Replikation in der Zelle (ROLFS et al. 1992). An einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize, der Template-DNA, entsteht mit Hilfe des thermostabilen Enzyms Polymerase, ein neuer DNA-Strang. Als Startpunkt an dem die Polymerase ansetzen kann, dienen zwei synthetische Oligonukleotide, die sogenannten Primer. Zwischen diesen beiden begrenzenden Primern wird der neue DNA-Strang aufgebaut. Durch die zyklische Wiederholung dieses Vorgangs kann die DNA-Sequenz vervielfältigt werden.

Ein PCR-Zyklus erfolgt in drei Schritten: Zunächst wird bei der Denaturierung der zu amplifizierende DNA-Strang durch Erhitzen auf 90-95°C in seine beiden Einzelstränge zerlegt. Im zweiten Schritt binden die beiden Primer an ihre komplementären Sequenzen am DNA-Einzelstrang (Annealing). Das erfolgt bei niedrigeren Temperaturen zwischen 45-60°C, in Abhängigkeit von den verwendeten Primern. Der dritte Schritt besteht aus der Anlagerung freier Nukleotide an den Einzelstrang, um wieder einen Doppelstrang aufzubauen. Diese Reaktion katalysiert das Enzym DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 72°C (Elongation, Extension) (OLSEN et al. 1995). Der PCR-Lauf besteht aus einer Anzahl von 30 bis 50 Zyklen, die in einem Thermocycler mit einem temperierbaren Reaktionsraum durchgeführt werden. Die Zyklenzahl, die Temperatur und auch die Zeit pro Reaktionsschritt können individuell programmiert werden.

Um eine PCR durchführen zu können, braucht man die zu kopierende DNA-Matrize, eine DNA-Polymerase, Desoxynucleotide, zwei verschiedene Oligonucleotid-Primer und ein geeignetes Puffersystem, welches die Verhältnisse in der Zelle nachahmt (SCHWÄGELE 1999). Die Polymerase, die Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs) und die Pufferlösung sind in einer fertigen Lösung als „Master mix“ verfügbar. Die

optimale dNTP-Konzentration ist abhängig von der Länge der Amplifikationsprodukte, der $MgCl_2$ -Konzentration und der Primer-Konzentration. Fügt man dem Master-mix die beiden Primer und die Template-DNA hinzu, so kann ein PCR-Lauf gestartet werden.

Die Real-Time PCR funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie eine herkömmliche PCR, bietet jedoch die Möglichkeit zum direkten Nachweis der Amplifikationsprodukte und lässt eine quantitative Auswertung zu (BANGSOW et al. 2002). Hierbei werden die Amplifikate schon während des Vorganges entweder mit fluoreszierenden Farbstoffen, die sich unspezifisch an jede doppelsträngige DNA anlagern, oder aber mit sequenzspezifischen Fluorophor-markierten Sonden detektiert. Diese Sonden sind Oligonukleotide, die spezifisch an eine Region innerhalb des Zielgens binden. Bei Anwesenheit der Zielsequenz wird ein Fluoreszenz-Signal empfangen, dessen Intensität proportional zur Menge des amplifizierten Produktes ist. Diese Fluoreszenz-Einheiten werden auf einem typischen Diagramm aufgetragen und damit sichtbar gemacht. Auf der Abszisse eines solchen Diagramms wird die Zyklenanzahl angegeben, die während des PCR-Laufs durchschritten wird. Auf der Ordinate werden die Fluoreszenzeinheiten dargestellt (FENOLLAR und RAOULT 2004, MACKAY 2004). Die im PCR-Lauf mitgeführte Positivprobe, dient als Referenzwert. Anhand dieser Kurve lassen sich Vergleiche zwischen der gesuchten Zielsequenz und dem amplifizierten Produkt ziehen (Abbildung 21). Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse lassen sich ebenfalls Rückschlüsse auf das PCR-Produkt ziehen. Jedes Produkt hat aufgrund seiner Länge und seines GC-Gehalts einen charakteristischen Schmelzpunkt, bei dem es denaturiert (MCPHERSON und MOLLER 2000, WITTEWER et al 2001). Die Denaturierung des PCR-Produktes bei der Schmelztemperatur führt zum Abfall des Fluoreszenzsignals, da nun wieder einzelsträngige DNA-Abschnitte vorliegen, an die der Fluoreszenzfarbstoff nicht binden kann (Abbildung 22). Durch die Messung des Schmelzpunktes, und durch Vergleiche mit dem Schmelzpunkt der im PCR-Lauf mitgeführten Positivprobe, kann man auf das amplifizierte Produkt rückschließen (BUSTIN 2000).

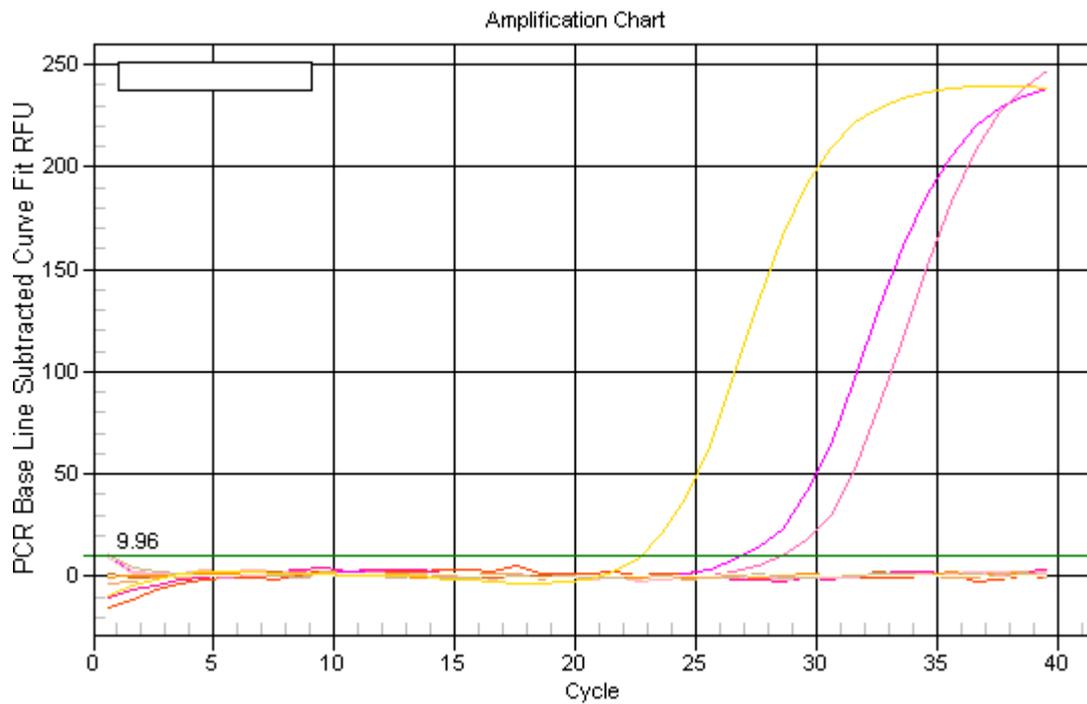


Abbildung 21: Darstellung der Fluoreszenzzunahme einer Real-Time PCR

Auf der Abszisse wird die Zyklenanzahl angegeben, auf der Ordinate die Fluoreszenzeinheiten

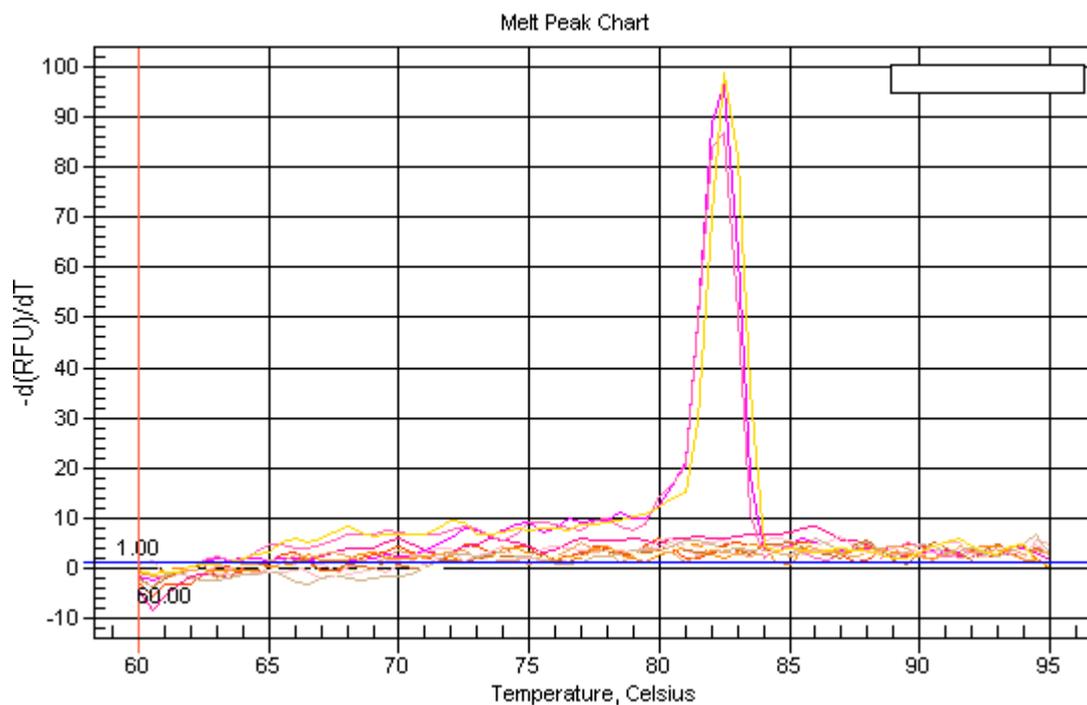


Abbildung 22: Darstellung der Schmelzkurve einer Real-Time PCR

Auf der Abszisse wird die Temperatur angezeigt, auf der Ordinate die Fluoreszenzeinheiten

3.2. Inhibitorische Faktoren und PCR von Kotproben

Die PCR ist eine schnelle und zuverlässige Methode um STEC und *Y. enterocolitica* nachzuweisen. Jedoch können, je nach Probenart, Störfaktoren in dem zu untersuchenden Material enthalten sein, die in der Lage sind, die PCR zu inhibieren. Dies ist besonders bei komplexen, biologischen Proben, wie etwa Kotproben der Fall (LANZ et al. 2000). Generell üben PCR-Inhibitoren einen Effekt direkt über eine Interaktion mit der DNA aus oder sie reagieren mit der hitzestabilen Polymerase, und blockieren über diesen Weg einen korrekten Ablauf der PCR. Üblicherweise wird die *Taq* DNA Polymerase verwendet. Die mittlerweile kommerziell erhältliche Polymerasen Tth und rTth von *Thermus thermophilus* stellten sich bei Kotproben als hervorragend geeignet heraus (ABU AL-SOUD et al. 1998, SHAMES et al. 1995).

Es besteht die Möglichkeit, dass es schon bei der Zellyse zu Interaktionen kommt. Der Verlust der Zellwand reicht oftmals nicht aus, um die Amplifikation der DNA garantieren zu können. Daher kann eine enzymatische Zerstörung anderer Zellbestandteile nötig werden (WILSON et al. 1993). Auch eine Extraktion der DNA durch Erhitzen der Probe auf Siedetemperatur kann zu einem Sensitivitätsverlust der PCR führen, wenn bei Siedetemperatur die Separation von strukturellen- und DNA-bindenden Proteinen nicht gelingt (GANNON et al. 1992). Die genannten Störfaktoren können zu falsch-negativen Ergebnissen als auch zu einem Komplettausfall des PCR-Laufs führen. In den meisten Fällen ist die Sensitivität deutlich reduziert (WILSON 1997).

Der Abbau von Nukleinsäure oder die Sequestration der Ziel- oder Primer DNA können ebenfalls einen Grund für inadäquate PCR-Reaktionen darstellen. Ursachen hierfür sind chemische und enzymatische oder physikalische Prozesse (WILSON 1997). Ein weiteres Hemmnis für eine erfolgreiche PCR sind suboptimale Reaktionsbedingungen, wie etwa inadäquate Primer, falsche Temperatur- und Zeitkonditionen, unterschiedliche DNA-Polymerasen, oder eine nicht korrekte Ionenkonzentration in der Pufferkomponente. Diese Faktoren müssen zunächst durch mehrere Versuchsdurchläufe optimiert werden (BESSETTI 2007).

Weiterhin kann es durch Kontamination der PCR-Probe zu einem Misslingen des PCR-Laufs kommen. Chemische Bestandteile der verwendeten Reaktionstuben und Bestandteile von Cellulosefiltern konnten als PCR-störende Faktoren entlarvt werden (BEJ et al. 1991). Eine Kontamination durch Handschuhpuder, Staub, Pollen, Bakterien oder Enzymen kann ebenfalls den Lauf einer PCR erheblich beeinträchtigen (DE LOMAS et al. 1992). Solche Kontaminationen können aber durch eine gute labortechnische Praxis und höchste Aufmerksamkeit auf aseptische Techniken vermieden werden.

Kot wird als eines der komplexesten Medien angesehen um daraus DNA zu extrahieren und zu amplifizieren. Es ist bekannt, dass einige Kotbestandteile, wie Gallen- und Galle-salze und komplexe Polysaccharide, in der Lage sind eine PCR zu inhibieren (LANZ et al. 1997). MONTEIRO et al. (1997) entwickelten ein Verfahren um in Kot vorhandene PCR-Inhibitoren zu charakterisieren. Sie erhitzen die Probe (100°C, 30 min) um hitzelabile Proteine zu eliminieren, setzen Chloroform zu, um Glykolipide auszuschalten, behandeln die Probe mit DNAsen um jegliche in Kot befindliche DNA, die die Taq-Polymerase inhibieren könnte, zu hydrolysieren. Um komplexe Polysaccharide nachzuweisen wurden eine enzymatische Hydrolyse und eine Chromatographie durchgeführt. Im Anschluß wurden die Proben mit einer standardisierten Ziel-DNA versetzt und diese in der PCR amplifiziert. Hauptsächlich Polysaccharide waren in der Lage den PCR-Lauf zu inhibieren. SIEBERT und LARRICK (1993) entlarvten ebenfalls saure und neutrale Polysaccharide als potente Inhibitoren.

Um aus einer Kotprobe die DNA-Matrize für die PCR zu gewinnen, muss die zu untersuchende Probe so vorbereitet werden, dass die Entfernung störender, die PCR inhibierender Faktoren aus dem Kot, die Konzentrierung der Zellen, deren DNA gewonnen werden soll und die Lyse der Zellen garantiert ist. Mit einer Anreicherung der Kotprobe in Nährlösungen erreicht man zum einen die Verdünnung von Störfaktoren, etwa inhibitorische Bestandteile des Kotes, wie Polysaccharide, Bilirubin und Gallen-salze (DEMKE und ADAMS 1992; FANG et al. 1992), und zum anderen die Konzentration der Zielorganismen, die sich in der Nährlösung vermehren können. Die Anreicherung ist eines der wichtigsten Schritte im Vorlauf einer PCR. Der Nachweis von STEC und *Y. enterocolitica* direkt aus Kot, ohne vorherige

Anreicherung, würde zu einem massiven Sensitivitätsverlust des PCR-Verfahrens führen (FRATAMICO et al. 2000). Eine weitere Konzentrierung der Zielzellen gelingt mit Zentrifugation bei hohen Geschwindigkeiten. Jedoch werden dabei auch die inhibitorischen Partikel des Kotes konzentriert. Deshalb muss das Pellet gewaschen werden (LANZ et al. 1998). Nach der Konzentrierung der Zielzellen müssen diese lysiert werden, um die DNA-Matrize in freier und gelöster Form zu erhalten. Die Lysierung erfolgt durch Hitze oder Mikrowellen, Enzyme oder Detergenzien.

Generell gibt es eine Vielfalt an Möglichkeiten der Probenvorbereitung um die Amplifikationskapazität der PCR zu steigern. RADSTRÖM et al (2004) nahmen daher eine Einteilung der Probenvorbereitungsmöglichkeiten in verschiedene Kategorien vor. Sie führten physiologische, immunologische, biochemische und physikalische Methoden auf. Die physiologische Methode basiert auf dem Wachstum des gesuchten Keimes oder der Biosynthese von Zellkomponenten durch kulturelle Anreicherung in Nährlösungen oder auf Agarplatten. Dadurch wird eine Konzentrierung des Zielorganismus erreicht, jedoch können inhibitorische Komponenten aus Kot nicht vollkommen entfernt werden (RADSTÖM et al 2004). Bei der immunologischen Methode werden mit Antikörper beschichtete, magnetische Partikel, so genannte Beads verwendet, die eine Konzentrierung des Zielorganismus bewirken sollen. Im Anschluß muss die Probe lysiert oder gewaschen werden, da es durch die Spezifität der Antikörper zu Kreuzreaktionen und damit zu falsch positiven Ergebnissen kommen könnte (ANTOGNOLI et al. 2001). Die am häufigsten vorkommende biochemische Methode ist die DNA-Extraktion mit kommerziell erhältlichen Kits wie etwa BAX (Qualicon, Wilmington, DE) (BAILEY et al. 1998), PrepMan (Applied Biosystems, Foster city, CA) (DAHLENBORG et al. 2001), Purugene (Gentra Systems, Minneapolis, MN)(FAHLE und FISCHER 2000), XTRAX (Gull Laboratories, Salt Lake City, UT) (LANZ et al. 1998) und QIAmp (Quiagen, Valencia, CA) (FREISE et al. 2001). Der Vorteil der DNA-Extraktion ist eine Probe hoher Qualität, bei der die meisten Inhibitoren entfernt werden können. Der Nachteil ist, dass die Ziel-Keime vorher in Lösungen oder auf Agar Platten angereichert werden müssen (RADSTÖM et al 2004). Für Kot erzielten NECHVATAL et al. (2008) mit dem kommerziell erhältlichen Kit Quiagen Stool die beste DNA-Isolierung. Die physikalische Methode hängt von den physikalischen Gegebenheiten der Ziel-Zellen ab, etwa deren Dichte oder Größe. Zu den physikalischen Methoden zählen

Zentrifugation (GERRITSEN et al.1991), Filtration (STARBUCK 1992) und Verdünnung (ABU-AL-SOUD et al. 1998).

3.3. PCR-Nachweisverfahren für STEC

Die PCR ist eine sehr sensitive DNA-Amplifikationsmethode, welche die für die Shigatoxin-Produktion verantwortlichen Gene, in geringsten Konzentrationen nachweisen kann. Die meisten PCR Techniken weisen jene Gene nach, die für das Stx oder dessen Varianten kodieren (NATARO und KAPER 1998). Aber auch andere Genen wie das auf dem Chromosom lokalisierte *eae*, das auf dem Plasmid gelegene *hly*, das *esp* oder *fliC*-Gen, welches für das H7-Antigen kodiert, können in einer PCR nachgewiesen werden (SCHMIDT et al. 1995, FRATAMICO et al. 1995). Die auf Prophagen im Chromosom gelegenen *stx*-Gene sind die wichtigsten Virulenzfaktoren und das definierende Charakteristikum von STEC. Demnach wird der Nachweis von Shigatoxin-Genen als ausreichendes Kriterium zur Identifikation von STEC gewertet (LEJEUNE et al. 2006). Mittlerweile gibt es eine Vielzahl an PCR-Methoden zum Nachweis von *stx*-Genen (BASTIAN et al. 1998). Die Auswahl von spezifischen Primern mit komplementären Basensequenzen zu den *stx*-Genen sorgt für eine hohe Spezifität des PCR-Verfahrens. Des Weiteren können durch die Vervielfältigung dieser DNA-Fragmente Nachweisgrenzen zwischen 10 und 100 STEC-Zellen pro Untersuchungsansatz erreicht werden, wodurch die Sensitivität der PCR als hoch einzustufen ist (SCHÜTZ et al. 1993). Jedoch kann es je nach Probenart zu Sensitivitätsverlusten der PCR kommen, wenn etwa Faktoren in der Probe enthalten sind, die inhibitorisch auf die PCR wirken, wie dies bei Kot- oder Blutproben der Fall sein kann (BEUTIN et al. 1997).

Mittels einer multiplex-PCR können gleichzeitig mehrere Pathogenitätsfaktoren getestet werden, wie das *eae*-Gen (*E.coli* attaching and effacing), das *hly*- (Hämolysin) und das *esp*- (*E. coli* Serinprotease) Gen. Diese Pathogenitätsfaktoren können die Virulenz des STEC steigern (FRUTH et al 2000, PRAGER et al 2005).Das *eae*-Gen liegt auf einer Pathogenitätsinsel im Chromosom und kodiert für das Protein Intimin, welches die Anheftung und Invasion in die Darmwand bewerkstelligt und die Zerstörung der Mikrovilli einleitet (CLARKE et al. 2003). Das *hly*-Gen liegt auf dem Virulenzplasmid von p0157-STEAC Arten und kodiert für ein

Hämolysin, ein porenbildendes Zytotoxin (KARCH et al. 1998, BEUTIN 2000). Eine Vielfalt an Genkombinationen zur Identifizierung von STEC mittels PCR ist demnach denkbar. Dennoch bleibt der Nachweis der *stx*-Gene das wichtigste Kriterium um STEC zu identifizieren.

3.4. PCR Nachweisverfahren für *Y. enterocolitica*

Die PCR zum Nachweis von *Y. enterocolitica* stellt eine Methode mit sehr hoher Signifikanz dar. Sie ist eine der schnellsten Methoden trotz vorher nötiger Voranreicherung in selektiven Anreicherungsmedien. *Y. enterocolitica* verfügt über einige Genorte, die eine Identifizierung möglich machen. Diese sind entweder chromosomal oder auf dem Plasmid kodiert. Auf beiden Bereichen liegen auch die Pathogenitätsfaktoren verschlüsselt und sind somit für den Nachweis der Pathogenität geeignet. Allerdings kann, vor allem bei der Voranreicherung, das Plasmid verloren gehen (BHADURI et al. 1991). Es empfiehlt sich daher chromosomale und plasmidäre Primerpaare zu kombinieren.

Auf dem Chromosom gelegene Genorte, die für eine Isolierung von *Y. enterocolitica* in Betracht kommen, sind das *ail*- (attachment invasion locus), *inv*- (Invasin) und *yst* - (*Y. enterocolitica* heat stable enterotoxine) Gen. Das *ail*-Gen kodiert für Anheftung und Invasion und kommt nur in pathogenen Stämmen vor (KWAGA et al. 1992). Das *inv*-Gen kommt bei allen *Yersinia* Arten vor und dient somit dem Nachweis der Spezies selbst. Mit Hilfe des *yst*-Gens, welches ebenfalls für die Detektion pathogener *Yersinia* geeignet ist, lassen sich Sequenzunterschiede zwischen amerikanischen und europäischen Stämmen aufzeigen (IBRAHIM et al. 1992). Jedoch kann es beim *yst*-Gen zu Kreuzreaktionen mit anderen apathogenen *Yersinia* Arten kommen (KWAGA et al. 1992). Z.B. wurde ein homologes *yst*-Gen bei dem apathogenen Stamm *Y. kristensenii* nachgewiesen (IBRAHIM et al. 1997).

Auf dem Plasmid gelegene Genorte, die für eine Isolierung von *Y. enterocolitica* in Betracht kommen, sind das *virF*- (virulenz factor), das *yadA*- (*Yersinia* adhesin A) und das *lcrV*- (V-antigen) Gen. Das *virF*-Gen, als auch das *yadA*-Gen können zur Erkennung pathogener *Yersinia* herangezogen werden (NEUBAUER et al. 2000a). Jedoch ist *virF* nicht spezifisch für *Y. enterocolitica*. Es kommt auch auf dem Plasmid

von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* vor, während das *yadA*-Gen eine eindeutige Erkennung von *Y. enterocolitica* zulässt, da es nur dort vorkommt (JOURDAN et al 2000). Das *IrcV* vermag ebenfalls pathogene Isolate nachzuweisen. Es detektiert *Y. enterocolitica*, *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*. Es besteht jedoch die Gefahr, dass das Plasmid unter bestimmten Bedingungen verloren geht, und eine PCR, die nur plasmidkodierte Pathogenitätsfaktoren nachweist, falsch-negative Ergebnisse liefert. Es empfiehlt sich daher ein PCR-Programm auszuwählen, welches sowohl chromosomal- als auch plasmidkodierte Gene nachweist (NAKAJIMA et al. 1992). Einige mögliche Genortkombinationen zum Nachweis von *Y. enterocolitica* sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Übersicht über sinnvolle Genkombinationen zur Identifizierung von pathogenen *Y. enterocolitica*

Genkombination	Referenz
<i>ail + yadA</i>	BLAIS u. PHILLIPS 1995
<i>ail + virF</i>	NILSSON et al. 1998, BHADURI u. COTTRELL, BHADURI 2002
<i>ail + yst + inv</i>	KWAGA et al. 1992, HARNETT et al. 1996
<i>ail + yst + virF</i>	LANZ et al. 1998

Eigene Untersuchungen

4. Material

4.1. Probenmaterial

4.1.1. Kotproben

Für diese Studie wurden in der Zeit von April 2006 bis Dezember 2006 insgesamt 200 Kotproben von kleinen Wiederkäuern aus Bayern gesammelt. Dabei handelte es sich um Poolproben von Schafen und Ziegen, die in noch möglichst frischem Zustand aus der Einstreu oder auf der Weide gesammelt wurden.

Diese Sammelkotproben stammten aus 28 Betrieben unterschiedlichster Größe und Betriebsform. 16 dieser Betriebe hielten nur Schafe, weitere 7 Betriebe nur Ziegen und 5 der ausgewählten Betriebe waren Mischbetriebe, die sowohl Schafe als auch Ziegen hielten (Tabelle 10).

Tabelle 10: Verteilung der Sammelkotproben auf die Betriebe

Betriebe	Anzahl Betriebe	Anzahl Sammelkotproben
reine Schafhaltung	16	138
reine Ziegenhaltung	7	42
Mischbetriebe (Schaf und Ziege)	5	20
beprobte Betriebe insgesamt	28	200

12 dieser 28 landwirtschaftlichen Unternehmen hatten eine Betriebsgröße von 10 bis 50 Tieren. 9 Betriebe hielten zwischen 50 und 200 Tiere. Darunter waren auch 4 Kleinstbetriebe mit bis zu 10 kleinen Wiederkäuern. Aus 2 Großbetrieben mit über 500 Tieren wurden ebenfalls Kotproben entnommen und schließlich wurde noch ein mittelgroßer Betrieb mit 250 Ziegen beprobt (Tabelle 11).

Als häufigste Rasse war das Merinolandschaf vertreten. 8 von 21 (38 %) beprobten Betrieben die Schafe hielten, darunter waren neben den reinen Schafbetrieben auch die 5 Mischbetriebe, hatten Merinolandschafe. Am zweithäufigsten kam in 5 von 21

(24 %) Schäfereien das deutsche und braune Bergschaf vor. Diese Rasse ist v.a. in den Alpen und im Voralpengebiet beheimatet. In 2 (10 %) der untersuchten Betriebe wurden Steinschafe gehalten. Weiterhin waren die Rassen Suffolk, Juraschaf, blauköpfiges Fleischschaf, Texel und Merinofleischschaf vertreten (Tabelle 11).

Bei den Ziegen-haltenden Betrieben war die Bunte Deutsche Edelziege weit verbreitet. Diese Rasse kam bei 7 von 11 (64 %) Ziegen- und Mischbetrieben vor. 2 (18 %) der Probenbetriebe beherbergten Zwergziegen in Hobbyhaltung. Ein Hobbyzüchter hielt Burenziegen. Tabelle 11 zeigt die Verteilung der Rassen auf die unterschiedlichen Betriebsgrößen.

Tabelle 11: Verteilung der Schaf- und Ziegenrassen je Betriebsgröße

	Betriebsgröße (Einzeltiere)					
	bis 10	10-49	50-199	200-499	über 500	
Schafressen	Anzahl Betriebe					Σ
Merinolandschaf	1	4	2	-	1	8
Deutsches u. Braunes Bergschaf	2 ^a	1	2 ^d	-	-	5
Steinschaf	-	3 ^{b,c}	-	-	-	3
Suffolk	-	-	1 ^e	-	-	1
Juraschaf	-	-	1 ^e	-	-	1
Blauköpfiges Fleischschaf	-	-	1	-	-	1
Merinofleischschaf	-	-	-	-	1	1
Texel	-	-	1	-	-	1
Ziegenrassen						
Bunte Deutsche Edelziege	2 ^a	3 ^c	3 ^d	1	-	9
Burenziegen	-	1 ^b	-	-	-	1
Zwergziegen	-	2	-	-	-	2
beprobte Betriebe insgesamt	4	12	9	1	2	28

a: einer der aufgeführten Betriebe hält Bergschafe und Bunte Deutsche Edelziegen

b: einer der aufgeführten Betriebe hält Steinschafe und Burenziegen

c: einer der aufgeführten Betriebe hält Steinschafe und Bunte Deutsche Edelziegen

d: einer der aufgeführten Betriebe hält Bergschafe und Bunte Deutsche Edelziegen

e: dieser Betrieb hält sowohl Suffolk als auch Juraschafe

Als Haltungssystem war bei den hier beprobten Betrieben die Koppelschafhaltung sehr häufig vertreten. 11 der 28 Betriebe hielten ihre kleinen Wiederkäuer auf diese Weise. Die standortgebundene Hütehaltung kam bei 9 untersuchten Betrieben ebenfalls relativ häufig vor. Die in Deutschland seltene Wanderschäferei wurde von einem der beprobten Schafhaltereien betrieben. Die größeren Ziegenbetriebe, hier handelt es sich um 3 Milchziegenunternehmen, brachten ihre Tiere in Laufställen unter. Oftmals wurde ihnen Auslauf auf einem Laufhof oder einer nahe gelegenen Wiese geboten. Die Nachzucht verbrachte die erste Lebenszeit ebenfalls im Laufstall und wurde erst später zu Aufzucht- und Mastzwecken auf Koppeln gehalten. Die 4 beprobten Kleinstbetriebe behüteten ihre Schafe und Ziegen oftmals noch ganzjährig im Stall, gewährten ihnen aber regelmäßig Auslauf auf nahe gelegenen Wiesen. Tabelle 12 zeigt die verschiedenen Haltungssysteme sowie die Anzahl der Zucht- und Jungtiere, die dem jeweiligen Haltungssystem zugeordnet werden:

Tabelle 12: Anzahl der Sammelkot-beprobten Zucht- und Jungtiere in verschiedenen Haltungssystemen

Haltungssystem	Anzahl der Betriebe	Anzahl der Tiere insgesamt	Lämmer	Muttertiere	Zuchtböcke
Koppel-Haltung	11	470	245	215	10
Standortgebundene Hütehaltung	9	720	380	340	11
Wanderschäferei	1	520	220	300	4
Laufstall	3	460	200	245	7
Ganzjährig Stall mit Auslauf	4	45	15	25	3

Anzahl der Tiere gerundet

4.1.2. Tonsillenproben

In der Zeit von Anfang März bis Ende Juli 2007 wurden insgesamt 64 Tonsillenproben von Schlachtieren entnommen. Dabei handelte es sich um Einzeltierproben. Die Schlachttiere stammten zum Teil aus Betrieben, die bereits im ersten Versuchsabschnitt beprobt wurden und zum anderen Teil aus noch nicht untersuchten Schaf- und Ziegenhaltungen. Insgesamt waren 7 Betriebe vertreten. Davon hielten 5 Betriebe nur Schafe, ein weiterer hielt nur Ziegen und ein Betrieb beherbergte sowohl Schafe als auch Ziegen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Verteilung der Tonsillenproben auf die Betriebe

Betriebe	Anzahl Betriebe	Anzahl Tonsillenproben
reine Schafhaltung	5	40
reine Ziegenhaltung	1	12
Mischbetriebe (Schaf und Ziege)	1	12 (9 Schafe, 3 Ziegen)
beprobte Betriebe insgesamt	7	64

Bei den 7 Betrieben, in denen Tonsillenproben entnommen wurden, waren alle Betriebsgrößen, vom Kleinstbetrieb bis zum Großbetrieb mit über 500 Tieren, vertreten. Die am häufigsten vertretene Rasse war das Merinolandschaf in 3 der untersuchten Betriebe. Des Weiteren kamen die Rassen Deutsches und Braunes Bergschaf, Suffolk, Juraschaf und Rhönschaf vor. Zwei der beprobten Betriebe hielten Ziegen, die der Rasse der Bunten Deutschen Edelziegen angehören. Tabelle 14 zeigt die Verteilung der Rassen bei den unterschiedlichen Betriebsgrößen.

Tabelle 14: Verteilung der Schaf- und Ziegenrassen je Betriebsgröße

	Betriebsgröße (Einzeltiere)					Σ
	bis 10	10-49	50-199	200-499	> 500	
Schafrassen	Anzahl Betriebe					
Merinolandschaf	-	1	1 ^a	-	1	3
Coburger Fuchsschaf	-	-	-	-	1	1
Suffolk	-	-	1 ^b	-	-	1
Juraschaf	-	-	1 ^b	-	-	1
Rhönschaf	-	-	-	-	1	1
Ziegenrassen						
Bunte Deutsche Edelziege	-	-	1	-	-	1
Burenziege	-	-	1 ^a	-	-	1
beprobte Betriebe insgesamt	-	1	3	-	3	7

a: dieser Betrieb hält Merinolandschafe und Burenziegen

b: dieser Betrieb hält sowohl Suffolk als auch Juraschafe

Als Haltungssystem kam bei den Tonsillen-beprobten Betrieben die Koppelhaltung häufig vor (3 von 7 Betrieben). Ebensoviele Betriebe hielten ihre Schafe in standortgebundener Hüttehaltung. Der einzige hier untersuchte reine Ziegenbetrieb hielt seine Tiere im Laufstall (Tabelle 15).

Tabelle 15: Anzahl der Tonsillen-beprobten Zucht- und Jungtiere in verschiedenen Haltungssystemen

Haltungssystem	Anzahl der Betriebe	Anzahl der Tiere insgesamt	Lämmer	Muttertiere	Zuchtböcke
Koppel-Haltung	3	190	80	105	4
Standortgebundene Hüttehaltung	3	1650	855	790	9
Laufstall (nur Ziegen)	1	150	60	85	3

Anzahl der Tiere gerundet

4.2. Probennahme

Die Kotproben wurden als Poolproben aus der Einstreu oder der Weide aufgesammelt. Der möglichst frische Kot wurde in haushaltsübliche Plastikbeutel zu je 50 bis 100 Gramm (g) abgefüllt und zum weiteren Transport in einer Kühltasche verpackt. Die Proben wurden noch am selben Tag der Weiterverarbeitung im Labor des Instituts für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München zugeführt.

Die Tonsillenproben wurden unmittelbar nach der Schlachtung aus dem Kopf des jeweiligen Tieres entnommen. Für jedes einzelne Tier wurde ein frisches Paar Einmalhandschuhe verwendet, und nach Entnahme beider Tonsillen eines Tieres das Messer unter fließendem, +82°C heißem Wasser gereinigt. Jedes Tonsillenpaar wurde einzeln in Plastiktüten abgepackt und in Kühltaschen bei einer Temperatur von +7°C noch am selben Tag der Schlachtung ins Labor gebracht.

5. Methoden

Der Nachweis von STEC und *Y. enterocolitica* aus den Kot- und Tonsillenproben, mit Hilfe von Real-Time PCR und kulturellen Verfahren, wurde nach dem Schema in Abbildung 23 durchgeführt.

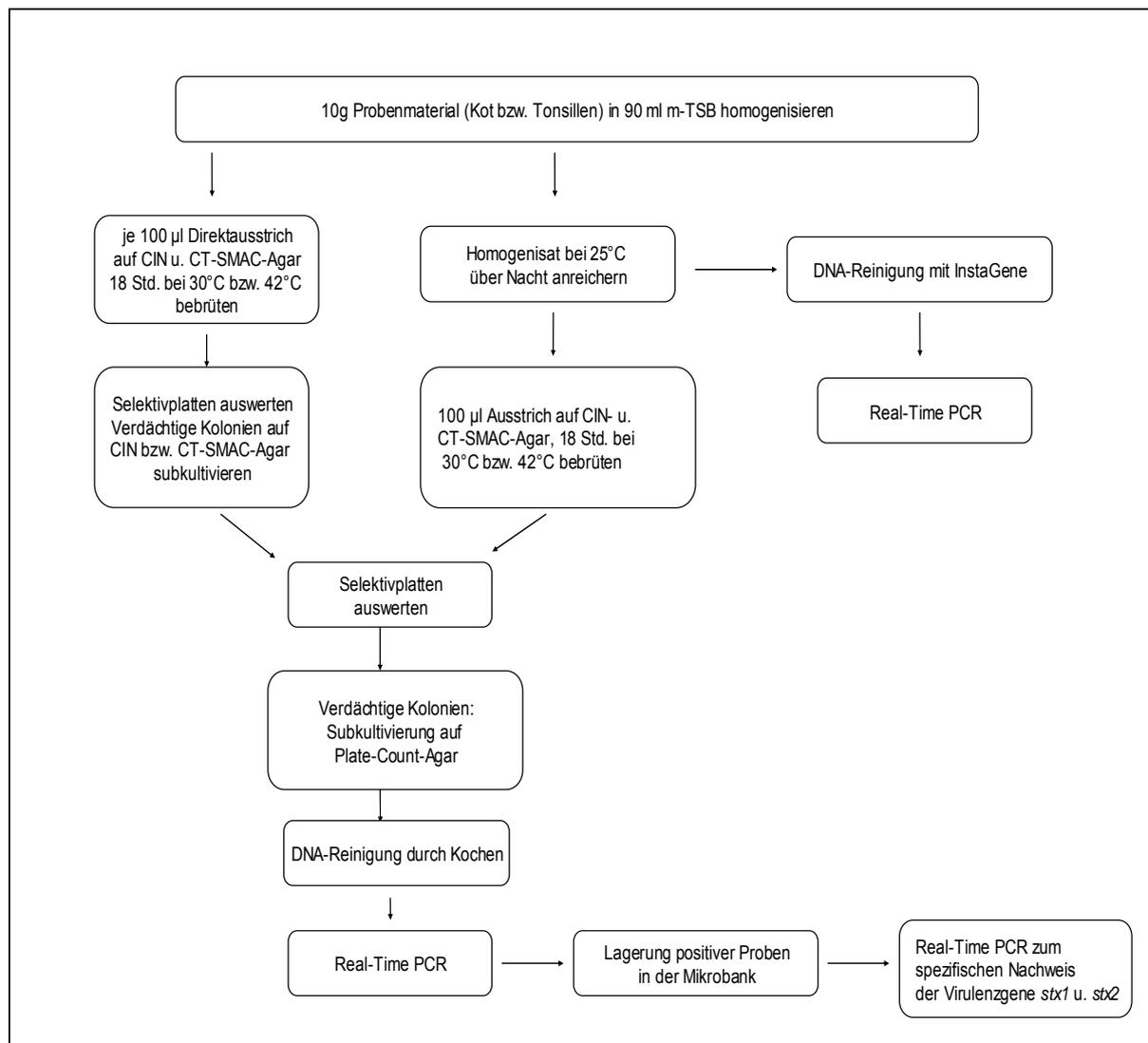


Abbildung 23: Ablaufschema des Real-Time PCR- und kulturellen Probenansatzes

5.1. Real-Time PCR Ansatz zum direkten Nachweis von STEC und *Y. enterocolitica* aus Kot und Tonsillen

Anreicherung

10 g der jeweiligen Kot- bzw. Tonsillenprobe wurden mit sterilem Besteck in einen Stomacher Beutel eingewogen und durch Zugabe von 90 ml modifizierter Trypton-Soja-Bouillon (m-TSB) suspendiert. Die Modifikation bestand in der Zugabe von 1,5 g Gallensalzen (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) in 1000 ml m-TSB. Anschließend folgte die Homogenisierung der Probenlösung im Stomacher für 30 Sekunden (s). Das Homogenisat jeder Probe wurde dann, zum Zweck der Anreicherung, bei einer Temperatur von 25°C über Nacht für 18 bis 20 Stunden (h) bebrütet.

DNA-Reinigung

Für die Aufreinigung der DNA wurden 100 µl der über Nacht bebrüteten Anreicherung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 1 min bei 13.000 rpm und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden, das zurückgebliebene Pellet wurde in 50 µl InstaGene™ resuspendiert. Das Prinzip der InstaGene™ Matrix beruht auf einem Anionenaustauscherharz, der Chelex®-Matrix, mit anschließender Zelllyse durch Hitze (99°C). Diese Erhitzung erfolgte im Thermomixer in zwei Schritten. Zunächst wurde die Probe bei 56°C und einer Schüttelrate von 300 rpm für 15 min inkubiert. Dann folgte eine Erhitzung auf 99°C für 8 min. Nach jedem Schritt wurde die Probe für 10 s im Vortexer gemixt, bevor sie zum Schluss für 3 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß verbracht und diente als Template in der Real-time PCR. Mit der Real-Time PCR sollte der direkte Nachweis von STEC- und *Y. enterocolitica*-DNA aus Kot- bzw. Tonsillenproben erfolgen.

Real-Time PCR zum Nachweis von STEC

2 µl der gereinigten Proben-DNA sollten bei der PCR eingesetzt werden. Als Zielgen dienten die Virulenzgene *stx1* und *stx2*, die durch den Primer MK1 und MK2 nach der Methode L 07.18-1 (Nachweis, Isolierung und Charakterisierung von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik) des § 64 LFGB amplifiziert werden konnten. Der MK-Primer 1+2, ist in der Lage sowohl das *stx1*- als auch das *stx2*-Gen nachzuweisen. Dadurch

ist der MK-Primer besser für Screening-Kontrollen geeignet als für den sehr spezifischen Nachweis der einzelnen Virulenzgene *stx1* und *stx2*. Die Sequenzen des Primers MK1 und MK2 lauten wie nachfolgend beschrieben:

MK1 Sequenz: 5`-TTT ACG ATA GAC TTC TCG AC-3`

MK2: 5`-CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC-3`

Als Positivkontrolle wurden STEC-Stämme aus der Mikrobank des Instituts für Hygiene und Technologie der Lebensmittel des Veterinärwissenschaftlichen Departments der tierärztlichen Fakultät München verwendet, die die Virulenzgene *stx1* und *stx2* aufwiesen. Die Negativkontrolle setzte sich aus den Bestandteilen des Master-Mixes zusammen, jedoch ohne Template-DNA. Als Reaktionslösung wurde der ready-to-use iQ™ SYBR Green Supermix (BioRad) verwendet. Beim SYBR Green Farbstoff handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der gebunden an doppelsträngige DNA, nach Anregung fluoresziert. Der Farbstoff ist jedoch nicht sequenzspezifisch und bindet deshalb auch an Primer-Dimere oder an unspezifische Amplifikate. Aus diesem Grund sollte eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden

Um steriles Arbeiten zu garantieren, und den PCR-Ansatz vor möglichen Kontaminationen zu schützen, wurde dieser Reaktionsmix unter einer Sterilbank zusammengestellt. Er setzte sich zusammen aus 23 µl Mastermix und 2 µl Template-DNA. Die Bestandteile des Mastermixes wurden gemischt und jeweils 23 µl in die dafür vorgesehenen Mini-Eppendorfgefäße überführt. In dem entsprechenden Probenraum erfolgte unter dem Flow die Zugabe von jeweils 2 µl der Proben-DNA. Es ergab sich pro Reaktionsansatz ein Gesamtvolumen von 25 µl (Tabelle 16).

Tabelle 16: Mastermix für die Real-Time PCR zum Nachweis von STEC

Substanz	Konzentration	Menge
H ₂ O		8,0 µl
iQ™ SYBR Green Supermix	1x	12,5 µl
Magnesium	3,0 mM	
dNTPs	200,0 µM	
Taq-Polymerase	1,25 U	
Fluorescein SYBR Green	10,0 nM	
Primer MK 1+2	0,2 µM	2,5 µl
Template		2,0 µl
Gesamtvolumen		25,0µl

Gleich im Anschluss an die Zusammenstellung des Reaktionsmixes, wurde der Thermocycler bestückt und die PCR gestartet. Zum Nachweis von STEC durch die Primer MK 1+2 wurde das folgende Programm gewählt (Tabelle 17).

Tabelle 17: PCR-Programm zum Nachweis von STEC

Zyklus 1:	Denaturierung	
Schritt 1:	95°C	3 min
Zyklus 2:	Amplifikation	
(40 Wiederholungen)		
Schritt 1:	95°C	10 s (Denaturierung)
Schritt 2:	50°C	20 s (Annealing)
Schritt 3:	72°C	10 s (Extension)
Zyklus 3:	Denaturierung	
Schritt 1:	95°C	1 min
Zyklus 4:	Annealing	
Schritt 1:	50°C	1 min
Zyklus 5:	Schmelzkurve	
(90 Wiederholungen)		
Schritt 1:	50°C	10 s
Schritt 2 bis 91:	+ 0,5°C bis 95°C	10 s

Die Auswertung erfolgte anhand des C_t -Wertes (engl. treshold cycle) und der Schmelzkurven. Der C_t -Wert gibt die Anzahl der Vermehrungszyklen an, die nötig sind, eine Stärke an Fluoreszenz zu erhalten, die stärker ist, als der Hintergrund der Matrix. Die Schmelzkurve für das *stx1*-Gen lag bei $79^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$, die Schmelzkurve für das *stx2*-Gen lag bei $82,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$. All jene Proben, die zur passenden Schmelztemperatur einen C_t -Wert von unter 40 aufwiesen, wurden als positiv bewertet.

Real-Time PCR zum Nachweis von *Y. enterocolitica*

Zunächst wurde die gereinigte Proben-DNA auf Zimmertemperatur gebracht, um in der SYBR Green Real-Time PCR eingesetzt zu werden. Als Zielgen diente ein 170 Basenpaar großes Fragment des *ail*-Gens (NAKAJIMA et al. 1992). Dieses sollte durch die Primer Ail1 und Ail2 vervielfältigt werden. Diese haben folgende Nukleotidsequenz:

AIL1: 5`-ACT CGA TGA TAA CTG GGG AG-3`

AIL2: 5`-CCC CCA GTA ATC CAT AAA GG-3`

Um später die amplifizierten Produkte zuordnen zu können, war eine Positivprobe und auch eine Negativprobe mitzuführen. Als Positivprobe diente ein aus Schweinetonsillen isolierter *Y. enterocolitica*-Stamm des Bioserotyps 4/0:3, der in der Mikrobank des Veterinärwissenschaftlichen Departments gelagert wurde. Die Negativprobe bestand aus den Reagenzien des Mastermixes, jedoch ohne Template-DNA, stattdessen mit der entsprechenden Menge H₂O. Der Reaktionsmix wurde unter einer Sterilbank zusammengestellt. Zunächst wurden die Bestandteile des Mastermixes gemischt. Jeweils 23 µl davon wurden anschließend in die entsprechenden Mini-Eppendorfgefäße pipettiert. Nun erst erfolgte im Probenraum, unter einem dafür vorgesehenen Flow, die Zugabe von 2 µl der zu untersuchenden DNA. Pro Reaktionsansatz ergab sich ein Volumen von 25 µl. Dieser Reaktionsansatz entspricht dem Mastermix zum Nachweis von STEC (Tabelle 16). Anstelle des MK-Primers wurde hier der Primer AIL eingesetzt.

Um verfrühte Reaktionen der Bestandteile des Ansatzes untereinander zu verhindern, wurde sofort im Anschluss der Thermocycler bestückt und die Real-Time PCR gestartet. Diese unterscheidet sich von oben beschriebenem STEC-Programm in Zyklus 2, 4 und 5. Nachfolgend soll auch dieses Programm vorgestellt werden (Tabelle 18).

Tabelle 18: PCR-Programm zum Nachweis von *Y. enterocolitica*

Zyklus 1:	Denaturierung		
Schritt 1:	95°C	3 min	
Zyklus 2:	Amplifikation		
	(40 Wiederholungen)		
Schritt 1:	95°C	10 s	Denaturierung
Schritt 2:	55°C	20 s	Annealing
Schritt 3:	72°C	10 s	Extension
Zyklus 3:	Denaturierung		
Schritt 1:	95°C	1 min	
Zyklus 4:	Annealing		
Schritt 1:	55°C	1 min	
Zyklus 5:	Schmelzkurve		
	(80 Wiederholungen)		
Schritt 1:	55°C	10 s	
Schritt 2 bis 81:	+ 0,5°C bis 95°C	10 s	

Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgte wiederum anhand des C_T -Wertes und der Schmelzkurve mit Hilfe des entsprechenden Computerprogrammes (BioRad, Hercules, CA). Die Schmelzkurve des ausgesuchten Fragmentes des *ail*-Gens lag bei 81,5°C bis 82°C. Lag der C_T -Wert einer Probe unter 40, so wurde die entsprechende Probe als positiv bewertet.

5.2. Kultureller Nachweis von STEC und *Y. enterocolitica*

Direktausstrich auf Selektivagar

Die Kot- bzw. Tonsillenproben wurden, wie bereits in Kapitel 5.1 beschrieben, in m-TSB suspendiert und homogenisiert. 100 µl des Homogenisats der jeweiligen Probe wurden im Direktausstrich mit dem 3-Ösen-Verfahren auf Selektivplatten verbracht. Zum Nachweis von STEC wurde CT-SMAC-Selektivagar verwendet, der über Nacht (ON) für 18 bis 20 h bei 42°C bebrütet werden musste. Der Sorbit-MacConkey-Agar enthält als Nährstoffe Sorbitol und Peptone und als Hemmstoffe Gallensalze und Kristallviolett, die die gram-positive Flora hemmen sollen. Sorbitol negative *E. coli* bilden auf diesem Selektivagar farblose Kolonien. Zusätzlich wurde dem Agar ein Supplement beigemischt, bestehend aus Cefixim und Tellurit, welches wachstumshemmend auf *Plesiomonas*, *Morganella*, *Hafnia* und *Providencia* wirkt. Zum Nachweis von *Y. enterocolitica* verwendete man Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Selektivagar (CIN-Agar), der ebenfalls ON für 18 bis 20 h bei 30°C bebrütet wurde. Der CIN-Agar enthält als Zucker/Indikator-System Mannit und Neutralrot. Mannit wird von *Y. enterocolitica* fermentiert, so kommt es zum Farbumschlag. Des Weiteren hemmt das zugefügte *Yersinia*-Selektiv-Supplement *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, und *P. mirabilis*. Das verbliebene Homogenisat jeder Probe wurde zum Zweck der Anreicherung bei einer Temperatur von 25°C ON für 18 bis 20 h bebrütet.

Ausstrich auf Selektivagar nach Anreicherung

Von der über Nacht bebrüteten Anreicherungs-Bouillon wurden je 100 µl abpipettiert und auf CT-SMAC- als auch auf CIN-Agar mit dem 3-Ösen-Verfahren ausgestrichen. Die Selektivmedien wurden bei 42°C (CT-SMAC) bzw. bei 30°C (CIN) für 18 bis 20 h inkubiert.

Ablesen der Selektivplatten

Die Auswertung der Platten, die am Vortag angesetzt worden waren, erfolgte durch Beurteilung der Größe und Farbe der einzelnen Kolonien. STEC bilden auf CT-SMAC-Agar farblose Kolonien. *Y. enterocolitica* bildet kleine, ca. 1 mm große, lila Kolonien mit einem dunklen Zentrum, so genannte „Kuhaugen“. Verdächtige Kolonien wurden auf CT-SMAC- bzw CIN-Agar subkultiviert und für 18 bis 20 h bei 42°C (SMAC) bzw. bei 30°C (CIN) bebrütet.

Nachweis von STEC und *Y. enterocolitica* aus Kultur mittels Real-Time PCR

STEC-verdächtige Kolonien auf CT-SMAC-Agar und *Yersinia*-verdächtige Kolonien auf CIN-Agar wurden zunächst auf Plate-Count-Agar (PCA, Merck, Darmstadt, Deutschland) subkultiviert und ON bebrütet. Anschließend wurden einige auf PCA gewachsenen Kolonien in dicht bewachsenen Bereichen mit einer Pipettenspitze angetippt und die so entnommenen Kolonien in 100 µl Nuclease-freiem Wasser (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), welches bereits in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verbracht worden war, suspendiert. Die Zellyse, und damit die Freisetzung der DNA, wurde durch die Erhitzung auf 99°C für 10 min auf dem Thermomixer erreicht. Nach einer kurzen Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min, wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß pipettiert. So konnte die jeweilige Probe direkt dem Real-Time PCR-Screening zugeführt, oder zunächst bei 20°C Minus gelagert werden. Die Vorbereitungen für das Real-Time PCR-Screening und dessen Programmablauf für STEC und *Y. enterocolitica* erfolgten analog den Angaben in Kapitel 5.1.

5.3. Real-Time PCR zur Identifizierung der STEC-Virulenzgene *stx1* und *stx2*

Um gezielt die Virulenzgene *stx1* und *stx2* nachweisen zu können, sollten von allen STEC-positiv befundeten Proben erneut eine spezifische Real-Time PCR durchgeführt werden. Dazu wurden die in der Mikrobank gelagerten positiven STEC-Isolate aus der Mikrobank entnommen und unter sterilen Kautelen auf einen unspezifischen PCA ausgestrichen. Die Anzüchtung erfolgte bei 42°C für 18 bis 20 h. Die auf PCA gewachsenen Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze abgenommen, und in, mit Nuklease-freiem Wasser gefüllte, 1,5 ml Eppendorfgefäße verbracht. Durch leichtes Rühren konnten die Kolonien in Lösung gebracht werden. Die Lysierung der Zellen erfolgte mit dem Thermomixer bei 99°C für 10 min. Anschließend fand eine kurze Zentrifugation bei 13.000 rpm und Raumtemperatur statt. Der entstandene Überstand mit der darin enthaltenen DNA wurde in neue Eppendorfgefäße verbracht und fand in der Real-Time PCR Verwendung.

Zum Nachweis des *stx1*-Gens diente der Primer KS 7/8, das *stx2*-Gen wurde mit dem Primer LP 43/44 nach der Methode L 07.18-1 (Nachweis, Isolierung und Charakterisierung von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch

mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik) des § 64 LFGB nachgewiesen. Die Nukleotidfrequenz dieser Primer soll nachfolgend aufgeführt werden:

KS7: 5'-CCC GGA TCC ATG AAA AAA ACA TTA TTA ATA GC-3'

KS8: 5'-CCC GAA TTC AGC TAT TCT GAG TCA ACG-3'

LP43: 5'-ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G-3'

LP44: 5'-GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C-3'

Diese Primer weisen das *stx1*-Gen bzw. das *stx2*-Gen spezifisch nach, anders als der MK-Primer 1+2, der beide Virulenzgene nachweist und dadurch besser für Screeningprotokolle geeignet ist. Sowohl zum Nachweis des *stx1*-Gens als auch des *stx2*-Gens wurde ein eigener Reaktionsmix zusammengestellt. Diese wurden unter einer Sterilbank gemischt und bestanden aus den in Tabelle 19 aufgelisteten Komponenten.

Tabelle 19: Mastermix für die Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis der Virulenzgene *stx1* und *stx2*

Substanz	Konzentration	Menge
H ₂ O		8,0 µl
iQ™ SYBR Green Supermix	1x	12,5 µl
Magnesium	3,0 mM	
dNTPs	200,0 µM	
Taq-Polymerase	1,25 U	
Fluorescein SYBR Green	10,0 nM	
Primer KS 7/8 bzw. LP 43/44	0,2 µM	2,5 µl
Template		2,0 µl
Gesamtvolumen		25,0 µl

Waren jeweils 23 µl des Reaktionsgemisches in Mini-Eppendorfgefäße abgefüllt, so konnten in dem entsprechenden Probenraum jeweils 2 µl der Proben-DNA als Template zum Reaktionsgemisch hinzupipettiert werden. Es wurden zwei Positivkontrollen zum Nachweis der Virulenzgene *stx1* und *stx2* mitgeführt. Die Referenzstämme dafür stammen aus der Mikrobank des Veterinärwissenschaftlichen Departments für Hygiene und Technologie der Lebensmittel der tierärztlichen Fakultät München. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz des Reaktionsmixes, jedoch ohne die Template-DNA, stattdessen mit der entsprechenden Menge H₂O. Schließlich

wurde der Thermocycler bestückt und das PCR-Programm gestartet, welches aus folgenden Programmschritten bestand (Tabelle 20).

Tabelle 20: PCR-Programm zum spezifischen Nachweis von *stx1* und *stx2*

Zyklus 1:	Denaturierung		
Schritt 1:	95°C	3 min	
Zyklus 2:	Amplifikation		
	(40 Wiederholungen)		
Schritt 1:	95°C	15 s	Denaturierung
Schritt 2:	54°C	30 s	Annealing
Schritt 3:	72°C	30 s	Extension
Zyklus 3:	Denaturierung		
Schritt 1:	95°C	1 min	
Zyklus 4:	Annealing		
Schritt 1:	54°C	1 min	
Zyklus 5:	Schmelzkurve		
	(81 Wiederholungen)		
Schritt 1:	54°C	10 s	
Schritt 2 bis 82:	+ 0,5°C bis 95°C	10 s	

Die Auswertung des PCR-Laufs erfolgte anhand der Schmelzkurven und des C_T -Wertes. Die Schmelzkurve für das *stx1*-Gen lag bei $79^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$, die des *stx2*-Gens bei $82,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$. Lag der C_T -Wert unter 40, dann galt die entsprechende Probe als positiv.

6. Ergebnisse

6.1. Nachweis von STEC

6.1.1. Kotproben

Nachweis von STEC mittels Real-Time PCR

Von 200 für die PCR aufgereinigten Kotproben konnte bei der Untersuchung mittels Real-Time PCR, basierend auf dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green, bei einer Kotprobe der positive Nachweis für STEC erbracht werden. Das entspricht einem Anteil von 0,5 % (Tabelle 21). Die hier detektierte STEC-positive Probe stammte aus einer mittelgroßen Schafherde mit ca. 55 Tieren der Rasse Merinolandschaf. Die Herde bestand aus Muttertieren und ihren Lämmern, sowie zwei Zuchtböcken.

Tabelle 21: Nachweis von STEC aus Sammel-Kotproben mittels Real-Time PCR

Kotproben	Anzahl Kotproben	STEC-positive Proben	Anteil der positiven Proben [%]
Schaf	137	1	0,7
Ziege	43	0	0
Mischbetriebe	20	0	0
insgesamt	200	1	0,5

Nachweis von STEC mittels kultureller Verfahren

Von 200 untersuchten Sammel-Kotproben konnte mittels kultureller Verfahren bei 16 Kotproben ein positiver Nachweis für STEC geführt werden. Das entspricht einem Prozentsatz von 8,0 %. Von 137 vom Schaf abstammenden Kotproben wurden 14 Proben als STEC positiv detektiert (10,2 %). 43 von Ziegen stammende Kotproben stellten sich als STEC negativ heraus. 2 von 20 Kotproben aus Mischbetrieben, bei denen eine eindeutige Zuordnung der Probe zu Schaf bzw. Ziege nicht möglich ist, waren ebenfalls STEC positiv (Tabelle 22). Alle 16 STEC-positiven Kotproben wurden nach ON-Anreicherung des Probenhomogenisats detektiert. Nur bei einer

Kotprobe konnte auch im Direktausstrich der Nachweis für STEC geführt werden.

Tabelle 22: Nachweis von STEC aus Sammel-Kotproben mittels kulturellem Verfahren

Kotproben	Anzahl Kotproben	STEC-positive Proben	Anteil der positiven Proben [%]
Schaf	137	14	10,2
Ziege	43	0	0,0
Mischbetriebe	20	2	10,0
insgesamt	200	16	8,0

6.1.2. Tonsillenproben

Nachweis von STEC mittels Real-Time PCR

Unter den 64 untersuchten Tonsillenproben befanden sich 4 Proben, die sich beim Nachweisverfahren mit der Real-Time PCR als positiv für STEC herausstellten. Das entspricht einem Anteil von 6,3 %. Drei der STEC-positiven Proben stammten vom Schaf eine STEC-positive Tonsillenprobe stammte von einer Ziege (Tabelle 23).

Tabelle 23: Nachweis von STEC aus Tonsillenproben mittels Real-Time PCR

Tonsillenproben	Anzahl Tonsillenproben	STEC-positive Proben	Anteil der positiven Proben [%]
Schaf	49	3	6,1
Ziege	15	1	6,7
insgesamt	64	4	6,3

Nachweis von STEC mittels kulturellem Verfahren

Bei keiner mittels kulturellen Verfahrens untersuchten Tonsillenprobe konnte STEC nachgewiesen werden, weder im Direktausstrich noch in der ON-Anreicherung.

6.1.3. Ergebnis des spezifischen Nachweises von *stx1* und *stx2*

Von insgesamt 200 Sammel-Kotproben erwiesen sich 16 Proben als STEC positiv. Von diesen 16 STEC-positiv getesteten Kotproben wiesen 8 Proben Keime auf, die das *stx1*-Gen exprimierten. 2 der Positivproben enthielten das *stx2*-Gen. Bei den restlichen 6 der 16 STEC-positiven Proben wurden beide Virulenzgene nachgewiesen, sowohl das *stx1*- als auch das *stx2*-Gen.

14 von 16 STEC-positiven Sammel-Kotproben entfielen auf Schafe. Von diesen 14 STEC-positiven Schafproben waren 8 Schaf-Sammelkotproben für das *stx1*-Gen positiv, während bei den verbleibenden 6 STEC-positiven Schaf-Kotproben sowohl *stx1* als auch *stx2* nachgewiesen werden konnte (Tabelle 24). In Mischbetrieben, wo eine Zuordnung zu Schaf und Ziege nicht möglich ist, wurden 2 STEC-positive Proben detektiert. Diese wiesen das *stx2*-Gen auf (Tabelle 24). Bei den Ziegen konnte kein STEC nachgewiesen werden.

Tabelle 24: Häufigkeitsverteilung der Virulenzgene *stx1* und *stx2* aus STEC-positiv getesteten Kotproben

Kotproben	STEC-positiv getestete Kotproben	<i>stx1</i>- positive Proben	<i>stx2</i>- positive Proben	<i>stx1+2</i>- positive Proben
Schaf	14	8	0	6
Ziege	0	-	-	-
Mischbetriebe	2	-	2	-
insgesamt	16	8	2	6

6.2. Nachweis von *Y. enterocolitica*

6.2.1. Kotproben

Nachweis von *Y. enterocolitica* mittels Real-Time PCR

Der Nachweis für *Y. enterocolitica* aus den Sammelkotproben mittels Real-Time PCR gelang nicht. In keiner der 200 untersuchten Kotproben konnte *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden.

Nachweis von *Y. enterocolitica* mittels kulturellem Verfahren

Mit Hilfe des kulturellen Verfahrens konnte ebenfalls bei keiner der 200 untersuchten Sammel-Kotproben *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden.

6.2.2. Tonsillenproben

Nachweis von *Y. enterocolitica* mittels Real-Time PCR

Von den 64 Tonsillenproben konnte mittels Real-Time PCR bei 2 der untersuchten Proben ein positiver Nachweis für *Y. enterocolitica* erbracht werden. Das entspricht einem Anteil von 3,1 %. Beide positiv auf *Y. enterocolitica* getesteten Tonsillenproben stammten von Schafen (Tabelle 25).

Tabelle 25: Nachweis von *Y. enterocolitica* aus Tonsillenproben mittels Real-Time PCR

Tonsillenproben	Anzahl Tonsillenproben	YE-Positive Proben	Anteil der positiven Proben [%]
Schaf	49	2	4,1
Ziege	15	0	0
insgesamt	64	2	3,1

Nachweis von *Y. enterocolitica* mittels kulturellem Verfahren

Anhand des kulturellen Verfahrens konnte bei keiner der 64 untersuchten Tonsillenproben ein positiver Nachweis für *Y. enterocolitica* erbracht werden.

6.3. Ergebnisse bezogen auf die Betriebsstruktur und das Haltungssystem

STEC kommen in Bayern bei Schaf und Ziege vor. *Y. enterocolitica* wurde im Rahmen dieser Arbeit nur beim Schaf nachgewiesen. Insgesamt wurden für diese Dissertation 18 Schafherden, 7 Ziegen- und 6 Mischbetriebe auf diese beiden Bakterien hin untersucht. Unabhängig von der Kot- oder Tonsillenbeprobung und dem Nachweisverfahren wurde bei 6 von 18 Schafherden (33 %), bei 1 von 7 Ziegenbetrieben (14 %) und bei 3 von 6 Mischbetrieben (50 %) STEC nachgewiesen (Tabelle 26). In den Schafherden fand man 10-mal das *stx1*-Gen, 1-mal das *stx2*-Gen und 6-mal das *stx1*- und das *stx2*-Gen in Kombination. In der einzigen STEC-positiven Ziegenherde konnte ein *stx1*-Gen detektiert werden. Das *stx2*-Gen wurde 2-mal in Mischbetrieben nachgewiesen. Auch die Kombination *stx1* und *stx2* kam in einem Mischbetrieb vor. *Y. enterocolitica* mit dem Virulenzgen *ail* wurde in einem von 18 Schafbetrieben und in einem der 6 untersuchten Mischbetriebe detektiert (Tabelle 26).

Tabelle 26: Verteilung der positiv getesteten Betriebe und die Nachweishäufigkeit der Virulenzgene *stx1*, *stx2* und *ail*

Betriebe	Anzahl Betriebe	STEC-positive Betriebe	YE-positive Betriebe	Nachweishäufigkeit der Virulenzgene			
				<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1+2</i>	<i>ail</i>
Schafbetriebe	18	6	1	10	1	6	1
Ziegenbetriebe	7	1	-	1	-	-	-
Mischbetriebe	6	3	1	-	2	1	1
Summe	31	10	2	11	3	7	2

Bezüglich der Betriebsstruktur ergeben sich folgende Ergebnisse: 2 der 6 STEC-positiven Schafbetriebe bestanden aus einer Herde von über 500 Tieren, die den Rassen Merinolandschaf und Rhönschaf angehörten. Ein weiterer STEC-positiv getesteter Schafhalter hielt über 250 Coburger Fuchsschafe. Ein Betrieb der Größe 50 bis 199 Tiere züchtete die Rassen Suffolk und Juraschaf und ein weiterer Betrieb dieser Größenordnung hielt Texelschafe. Ein Schafhalter der Größe 10 bis 49 Tiere hatte Merinolandschafe (Tabelle 27). Von 7 beprobten Ziegenherden wurde bei einer Ziegenherde STEC nachgewiesen. Diese bestand aus etwa 150 Tieren der Rasse Bunte Deutsche Edelziege. Des Weiteren wurden 3 von 6 Mischbetrieben positiv auf STEC getestet. Dabei handelte es sich um zwei kleine Betriebe der Größenordnung von 10 bis zu 50 Tieren der Rassen Steinschaf, Deutsches Bergschaf und Bunte Deutsche Edelziege. Der dritte Betrieb gehörte mit 100 Merinolandschafen und 50 Deutsche Edelziegen zur Gruppe der etwas größeren Betriebe (Tabelle 27).

Tabelle 27: Anzahl der auf STEC untersuchten Herden bezogen auf die Betriebsgröße und -struktur

	Betriebsgröße (Einzeltiere)					Σ
	bis 10	10-49	50-199	200-499	über 500	
Beprobte Schafherden insg.	2	6	6	-	4	18
STEC-positive Schafherden	-	1	2	1	2	6
davon betroffene Schafrassen	Anzahl Betriebe					
Coburger Fuchsschaf	-	-	-	1	-	1
Juraschaf	-	-	1 ^c	-	-	1
Merinolandschaf	-	1	-	-	1	2
Rhönschaf	-	-	-	-	1	1
Suffolk	-	-	1 ^c	-	-	1
Texel	-	-	1	-	-	1
Beprobte Ziegenherden insg.	1	3	2	1	-	7
STEC-positive Ziegenherden	-	-	1	-	-	1
davon betroffene Ziegenrassen	Anzahl Betriebe					
Bunte Deutsche Edelziege	-	-	1	-	-	1
Beprobete Mischbetriebe insg.	1	3	2	-	-	6
STEC-positive Mischbetriebe	1	1	1	-	-	3
davon betroffene Rassen	Anzahl Betriebe					
Deutsches Bergschaf	1 ^a	-	-	-	-	1
Merinolandschaf	-	-	1 ^d	-	-	1
Steinschaf	-	1 ^b	-	-	-	1
Bunte Deutsche Edelziege	1 ^a	1 ^b	-	-	-	1
Burenziege	-	-	1 ^d	-	-	1

a: dieser Mischbetrieb hält Deutsche Bergschafe und Bunte Deutsche Edelziegen

b: dieser Mischbetrieb hält Steinschafe und Bunte Deutsche Edelziegen

c: dieser Betrieb hält die Schafrassen Juraschaf und Suffolk

d: dieser Mischbetrieb hält Merinolandschafe und Burenziegen

Der Nachweis von *Y. enterocolitica* gelang aus zwei Tonsillenproben. Diese stammten aus einem Schaf- und einem Mischbetrieb. In beiden Fällen handelte es sich jedoch um Tonsillen vom Schaf. Die benannte Schafherde bestand aus etwa 250 Tieren der Rasse Merinolandschaf, der Mischbetrieb hielt ca. 100

Merinolandschafe und 60 Burenziegen.

Betrachtet man die Ergebnisse im Bezug auf das Haltungssystem der Tiere (Tabelle 28), so ergibt sich folgendes Bild: Die meisten Proben in denen STEC nachgewiesen wurde, stammen aus Betrieben, die Koppel- bzw. standortgebundene Hüttehaltung betreiben. So wurde eine Anzahl von 10 STEC-positiven Proben aus 5 von insgesamt 12 Betrieben mit Koppelhaltung isoliert. 9 STEC-positive Proben stammten aus 3 von insgesamt 11 Betrieben, die ihre Tiere in standortgebundener Hüttehaltung hielten. Eine STEC-positive Probe wurde aus einem von insgesamt 3 Laufställen isoliert. 1 STEC-positive Probe stammte aus einem von 4 Betrieben, die das System Stall + Auslauf betrieben (Tabelle 28).

Tabelle 28: STEC- und *Y. enterocolitica*-positive Kot- und Tonsillenproben nach Haltungssystemen differenziert.

Haltungssystem	Anzahl Betriebe	STEC-positive Betriebe	STEC-positive Proben
Koppel	12	5	10
Standortgebundene Hüttehaltung	11	3	9
Wanderschafhaltung	1	-	-
Laufstall	3	1	1
Stall + Auslauf	4	1	1

Der Nacheis von *Y. enterocolitica* gelang aus zwei Tonsillenproben. Eine dieser Proben stammte aus einer Koppelschafhaltung, die andere *Y. enterocolitica*-positive Probe stammte von einem Schaf, welches in standortgebundener Hüttehaltung gehalten wurde.

Diskussion

In den letzten Jahren rückten STEC und *Y. enterocolitica* immer weiter in das Feld der wichtigsten bakteriellen Enterritiserreger beim Menschen. Beide Erreger sind in der Lage, neben den gastrointestinalen Erkrankungen auch postinfektiöse Syndrome auszulösen, die zu schweren gesundheitlichen Beeinträchtigungen der betroffenen Personen führen können. Ziel dieser Arbeit war, festzustellen, ob und inwiefern Schafe und Ziegen in Bayern ein Reservoir für STEC und *Y. enterocolitica* darstellen. Des Weiteren sollte ein Vergleich unter den verschiedenen Haltungssystemen, bezüglich der darin auftretenden Prävalenzen von STEC und *Y. enterocolitica*, gezogen werden. Weiterhin wurden zwei verschiedene Isolierungsverfahren im Nachweis von STEC und *Y. enterocolitica* angewandt, um deren Sensitivität zu vergleichen.

7. Vorkommen von STEC in Schaf- und Ziegenbetrieben

7.1. STEC-Nachweis von Kotproben

Die Nachweisrate für STEC von Sammel-Kotproben bayerischer Schafe lag mit dem kulturellen Nachweisverfahren bei 10,2 % (14 von 137). Das sind deutlich niedrigere Werte als in der Literatur angegeben. BEUTIN et al. (1993) detektierten im Grossraum Berlin bei 66,6 % (80 von 120) der untersuchten Schafe STEC. Das Isolierungsverfahren unterscheidet sich jedoch maßgeblich von dem in der eigenen Studie angewandten System. Bereits das Ausgangsmaterial ist verschieden. BEUTIN et al. (1993) verwendeten rektale Tupferproben von Einzeltieren, während für die eigene Studie Sammel-Kotproben zur Untersuchung herangezogen wurden. Die Tupferproben wurden zu Anreicherungs,- und Differenzierungszwecken auf Luria-Bertani-Agar, Endo-Agar und Schafblut-Agar ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. *E. coli*-verdächtige Kolonien wurden serotypisiert und mittels Verozell-Test auf die Virulenzdeterminanten Stx1 und Stx2 untersucht. Im Anschluss folgte eine Colony Blot DNA-Hybridisierung (BEUTIN et al. 1993).

Für die eigenen Untersuchungen wurden Sammel-Kotproben in m-TSB homogenisiert und das Homogenisat im Direktausstrich auf CT-SMAC-Agar verbracht. Das verbleibende Homogenisat wurde über Nacht angereichert und ebenfalls auf CT-SMAC-Agar ausgestrichen. Die Inkubation der Selektivplatten erfolgte bei 42°C. Verdächtige Kolonien subkultivierte man auf PCA, um von dort STEC-verdächtige Einzelkolonien in H₂O zu resuspendieren. Die Bestätigungsuntersuchung zum Nachweis der Virulenzgene *stx1* und *stx2* erfolgte nach dem Kochen und Zentrifugieren der Probe mittels Real-Time PCR. Für die eigene Studie wurden demnach andere Anreicherungsmedien als auch ein anderes Nachweissystem für die Isolierung von STEC gewählt, als dies in der Studie von BEUTIN et al (1993) der Fall war.

ZSCHÖCK et al. (2000) wiesen bei Untersuchungen in Mittelhessen bei 32,1 % (9 von 28) der Schafe STEC nach. Hier wurden rektale Tupferproben als Ausgangsmaterial verwendet, diese auf Gassner-Agar ausgestrichen und laktose-positive Kolonien auf Schafblut-Agar subkultiviert. Verdächtige Kolonien wurden in H₂O suspendiert, für 10 min gekocht, zentrifugiert und dann mittels multiplex-PCR auf die Virulenzgene *stx1*, *stx2*, *eaeA* und *hlyA* untersucht. Die Studie von ZSCHÖCK et al. (2000) unterscheidet sich von den eigenen Untersuchungen in der Auswahl des Ausgangsmaterials und der Anreicherungsmedien, jedoch stimmt das Nachweisverfahren überein. Diese Unterschiede im Versuchsaufbau gilt es zu berücksichtigen. Ein direkter Vergleich der benannten Studien mit den eigenen Untersuchungen ist demnach nicht ohne weiteres möglich. Möglicherweise sind die Methoden nach BEUTIN et al. (1993) und ZSCHÖCK et al. (2000) sensitiver im Nachweis von STEC, als das in der hier durchgeführten Studie angewandte Isolierungsverfahren. Eine wichtige Rolle könnte dabei die Auswahl des Ausgangsmaterials spielen. Eventuell sind STEC in frisch zu entnehmenden Einzeltierproben leichter anzuzüchten, als in Sammelkotproben, die für die eigenen Untersuchungen als Pool-Proben aus der Einstreu bzw. von der Weide aufgesammelt wurden und somit als weniger frisch betrachtet werden müssen. Solche Proben könnten durchaus STEC enthalten, diese sind aber möglicherweise aufgrund des älteren Zustandes der Probe kulturell nicht mehr nachweisbar. Es wäre aber auch denkbar, dass die Prävalenz von STEC bei Schafen in Deutschland von Nord nach Süd hin abnimmt, und damit bei Schafen in Bayern niedriger ist, als etwa

bei Schafen im Großraum Berlin bzw. im mittelhessischen Raum.

GEOFFRE´et al. (2002) verwendeten zum Nachweis von STEC aus Kotproben argentinischer Rinder eine Isolierungsmethode, die mit der in der hier durchgeführten Studie angewandten Methode weitgehend identisch ist und stellten für dieses Protokoll eine hohe Effizienz fest. Das spricht für die These, dass die STEC-Prävalenz bei kleinen Wiederkäuern in Süddeutschland niedriger liegt als etwa in nördlicheren Gebieten wie im Grossraum Berlin. Weiterhin wurde in benannter Studie nachgewiesen, dass bei der Bestätigungsuntersuchung mittels Real-Time PCR höhere Nachweisraten aus Kotproben erzielt werden können, wenn bei der Anzucht der STEC-Kolonien der CT-SMAC-Agar nur für 6 statt für 18 h inkubiert wird. In der eigenen Studie wurde der CT-SMAC-Agar für 18 bis 20 h inkubiert. Außerdem stellten GEOFFRE´ et al. (2002) fest, dass der einfache MacConkey-Agar (MAC) nach 18 stündiger Inkubation bessere Nachweisraten liefert als der spezielle CT-SMAC-Agar. Nach GEOFFRE´ et al. (2002) wurden 7 von 8 Kotproben nach der Anreicherung mit MAC-Agar mittels PCR positiv auf STEC getestet, während nach Anreicherung mit CT-SMAC nur in 4 der 8 Kotproben STEC nachgewiesen werden konnte, ein Effekt, der auf das CT-Supplement zurückgeführt werden kann. Dieses inhibiert außer dem pathogenen O157-Typ alle anderen *E. coli* im Wachstum, auch jene *E. coli*, die das *stx*-Gen exprimieren und damit ebenfalls als pathogen eingestuft werden müssen (ZADIC et al. 1993). Diese Erkenntnisse zeigen, dass in der eigenen Studie möglicherweise höhere Nachweisraten hätten erreicht werden können, wenn statt dem sehr spezifischen CT-SMAC-Agar der MAC-Agar Verwendung gefunden hätte oder das CT-SMAC-Medium einer kürzeren Inkubationszeit von 6 statt von 18 h unterzogen worden wäre.

Wieder Erwarten fiel die Nachweisrate für STEC von Kotproben mittels Real-Time PCR sehr gering aus. Bei einer von 137 Kotproben vom Schaf (0,7 %) konnte mit diesem Verfahren STEC nachgewiesen werden, während mit der kulturellen Methode bei 14 von 137 Proben (10,2 %) die Isolierung von STEC möglich war. Aus Studien mit *Y. enterocolitica* weiss man, dass mit PCR-Methoden wesentlich höhere Detektionsraten möglich sind als mit der kulturellen Nachweismethode (SCHIEMANN 1980, FUKUSHIMA et al. 1997, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999, JOHANNESSEN et al. 2000). KUGLER et al. (1998) verglichen verschiedene

Nachweismethoden zur Diagnostik von EHEC aus Stuhlproben und zeigten auf, dass die PCR die sensitivste Methode im Nachweis von STEC darstellt. Noch bessere Ergebnisse konnten erzielt werden, wenn eine vorherige Anreicherung der Probe in Nährlösung stattfand. So war eine STEC-Nachweisrate von 96,3 % (262 von 272) festgestellt worden. Es ist demnach anzunehmen, dass im Rahmen der vorliegenden Dissertation eine Detektion von STEC aus Kotproben mit der Real-Time PCR weitgehend fehlgeschlagen ist. Als mögliche Ursache kommt eine Inhibition des PCR-Vorgangs in Frage. Kot wird als eines der komplexesten Medien angesehen, um daraus DNA zu extrahieren und zu amplifizieren, da dieses Medium Komponenten wie Häm, Bilirubin, Gallensalze und Carboanhydrate enthält, die in der Lage sind, einen PCR-Lauf zu inhibieren (LANZ et al. 1997). Komplexe Polysaccharide aus Pflanzenmaterial (MONTEIRO et al. 1997) oder pflanzliche Säuren (THORNTON und PASSEN 2004, WATSON und BLACKWELL 2000) haben ebenfalls starke inhibitorische Fähigkeiten. Auch weitere im Kot enthaltene Bakterien besitzen das Potential die DNA Extraktion zu stören oder den PCR-Lauf zu blockieren. TEBBE und VAHJEN (1993) konnten zeigen, dass eine hohe Anzahl an Nicht-target-DNA eine PCR inhibieren kann und somit zu falsch negativen Ergebnissen führt. Grundsätzlich kann der korrekte Ablauf einer PCR in mehreren Punkten gestört werden. Es besteht die Möglichkeit einer Interaktion bereits bei der Zellyse, so dass eine Extraktion der DNA erschwert oder gar nicht möglich ist. PCR-Inhibitoren üben einen Effekt entweder durch direkte Interaktion mit der DNA, oder durch eine Interferenz mit der DNA-Polymerase aus. Bindet ein Inhibitor an die doppelsträngige oder als Einzelstrang vorliegende DNA, dann wird die Amplifikation der DNA verhindert. Eine Verfielfältigung des gesuchten DNA-Abschnittes wird ebenfalls verhindert, wenn das inhibitorische Agens mit der DNA-Polymerase interagiert und die Enzym Aktivität stoppt. Dazu kann es auch kommen, wenn Cofaktoren der Polymerase, wie Mg^{2+} inhibiert werden, etwa durch Komplexbildung oder Sequestration der Mg^{2+} -Ionen. Auch andere Ionen, so z. B. Ca^{2+} können einen PCR-Lauf behindern.

Es gibt eine Reihe an Möglichkeiten inhibitorische Komponenten auszuschalten. Eine vorangehende Anreicherung der Kotprobe führt einerseits zur Verdünnung inhibitorischer Faktoren, zum anderen werden die gesuchten Keime im Wachstum angeregt und erreichen so eine höhere Konzentration in der aufzureinigenden Probe.

Solch eine Anreicherung wurde in der vorliegenden Dissertation durchgeführt. Als Nährlösung verwendete man m-TSB. Eine weitere Möglichkeit inhibitorische Agenzien auszuschalten, stellt die Aufreinigung mit kommerziell erhältlichen Kits dar. Dies wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Es wurde die BioRad InstaGene™ Matrix verwendet. Weitere Methoden zur Extraktion der DNA sind kulturelle Anreicherung (COUSINS et al. 1995), Filtration (DIMICHELE L.J. und LEWIS M.J. 1995), Erhitzung auf 100°C, um hitzelabile Proteinase auszuschalten (OLCÉN et al. 1995), die Verwendung von Phenol, Ionen-Austausch-Chromatographie oder Kombinationen daraus (VARY et al. 1990, VAN DER GIESSEN et al. 1992). Da einige Probenbestandteile in der Lage sind, mit der DNA-Polymerase zu intervenieren, ließe sich an diesem Punkt ansetzen, um die Sensitivität der PCR zu steigern. ABUL AL-SOUD und RÂDSTRÖM (1998a) zeigten in ihrer Studie, dass mit dem Einsatz einer passenden Polymerase, der PCR-inhibierende Effekt verschiedener Komponenten in biologischen Proben beseitigt werden kann. Als „fäkal-resistente“ Polymerase entdeckten sie die Polymerase *Pwo* von *Pyrococcus woesei* und *rTth* von *Thermus thermophilus*. Mit Hilfe dieser Polymerasen konnten sie die Sensitivität der PCR aus Kotproben ganz erheblich steigern. In den eigenen Untersuchungen kam die Taq DNA Polymerase zum Einsatz. Dieses Verfahren wäre eine Möglichkeit die Nachweishäufigkeit von STEC der hier untersuchten Proben noch einmal zu überprüfen. Eine weitere Möglichkeit bestünde in dem Einsatz von Phytase (THORNTON und PASSEN, 2004). Inositol Hexaphosphat (Phytic acid) ist die Hauptform des gespeicherten Phosphors in Pflanzen. Dieses Phytat wird in Wiederkäuermägen nicht gänzlich verdaut und daher wieder ausgeschieden und lässt sich demnach im Kot der Tiere nachweisen. Phytic acid beeinflusst die Mg^{2+} -Konzentration in dem Pufferansatz der PCR, indem es mit diesen Ionen Chelate bildet. Das senkt die Magnesiumkonzentration im Reaktionsansatz ganz erheblich, und hat dadurch negative Auswirkungen auf die Sensitivität der PCR, die ganz empfindlich auf Änderungen der Magnesiumkonzentration reagiert. Des Weiteren können die Salze der Phytic acid die Sensibilität des Magnesium Puffers stören. Calcium, Kalium, Magnesium und Natrium sollten in ihren Konzentrationsverhältnissen stimmen, um eine Inhibition der PCR zu verhindern (THORNTON und PASSEN, 2004).

In den eigenen Untersuchungen ist die genaue Ursache für die geringe Detektionsrate von STEC, mit Hilfe der Real-Time PCR, unklar. Welcher Faktor für die Inhibition der Real-Time-PCR verantwortlich ist, bleibt offen. Es wird daher Aufgabe weiterer Untersuchungen sein, diesen Mangel zu beseitigen, und ein effektives System zu entwickeln, welches eine hohe Sensitivität der Real-Time PCR aus ovinen Kotproben garantiert. Erst dann wird es möglich sein, die tatsächliche Prävalenz von STEC aus Kotproben bei kleinen Wiederkäuern in Bayern aufzudecken.

Aus dem europäischen Ausland und auch aus Übersee wird von hohen Nachweisraten für STEC bei Schafen berichtet (Tabelle 7). Die dort detektierten STEC-Prävalenzen übertreffen die in der eigenen Untersuchung festgestellte Nachweisrate zum Teil erheblich. Bei einem Vergleich der verschiedenen Studien muss die unterschiedliche Versuchsanordnung berücksichtigt werden. Für diese Disseration wurden Sammel-Kotproben verwendet und mittels kulturellen Nachweisverfahren und Real-Time PCR auf STEC untersucht. Andere Arbeiten verwendeten rektale Tupferproben oder Caecum-Proben als Ausgangsmaterial. Des Weiteren variierten die Anreicherungs- als auch die Nachweismethoden ganz erheblich (siehe Kapitel 2.5). Diese Unterschiede gilt es beim Vergleich und der Beurteilung der verschiedenen Studien zu berücksichtigen.

Die Nachweisrate für STEC von Kotproben der Ziege lag bei 0 %. Weder mit dem kulturellen Nachweisverfahren noch mit der Real-Time PCR konnten aus den 43 Ziegenproben STEC isoliert werden. BEUTIN et al. (1993) wiesen in Deutschland bei 56 % (37 von 66) der Ziegenproben STEC nach. Auch ZSCHÖCK et al. (2000) hatten mit 75 % (70 von 93) eine hohe Nachweisrate von STEC bei Ziegen. Aus Untersuchungen der EFSA (2005) geht hervor, dass 11 % (4 von 34) der untersuchten Ziegen in Deutschland STEC beherbergen. Ein Grund für die geringe Nachweishäufigkeit von STEC aus Kot der innerhalb dieser Studie untersuchten Ziegen, ist möglicherweise die sehr geringe Prävalenz von STEC unter bayerischen Ziegen. Wahrscheinlicher ist, dass mit den hier angewandten Isolierungsverfahren, die tatsächliche STEC-Prävalenz aus Kot von Ziegen nicht korrekt ermittelt werden konnte. Wie bereits zuvor erwähnt, gilt die Real-Time PCR als eine sehr sensitive Methode im Nachweis von STEC. Es können Nachweisgrenzen zwischen 10 und

100 STEC-Zellen pro Untersuchungsansatz erreicht werden (SCHÜTZ et al. 1993). Dennoch scheint es auch in Ziegenkot Faktoren zu geben, die in der Lage sind, eine Real-Time PCR zu inhibieren, was zu falsch negativen Ergebnissen führen kann.

In den innerhalb dieser Studie untersuchten Mischbetrieben wurden mittels kultureller Nachweismethoden in 2 von 20 Kotproben (10 %) STEC detektiert. Mit der Real-Time PCR gelang in keiner der 20 Mischbetriebsproben der Nachweis für STEC. Da es sich hier um Betriebe handelt, die sowohl Schafe als auch Ziegen hielten, bleibt offen welche der beiden Tierarten STEC mit dem Kot ausschieden. Da auch die Probenanzahl aus Mischbetrieben gering ist, kann kein direkter Vergleich mit reinen Schaf- und Ziegenbetrieben gezogen werden. Des Weiteren gibt es keine Vergleichsstudien darüber, ob Betriebe die sowohl Schafe als auch Ziegen halten, eine höhere STEC-Prävalenz aufweisen, als solche, die nur eine der beiden Tierarten halten. Aufgrund der hohen Nachweishäufigkeit von STEC in Mischbetrieben von 10 % innerhalb der eigenen Studie wäre eine solche Hypothese aber durchaus denkbar.

7.2. STEC-Nachweis von Tonsillen

Die Nachweisrate für STEC von Einzeltier-Tonsillen des Schafes lag bei 6,1 % (3 von 49). Diese Ergebnisse wurden mit der Real-Time PCR erzielt. Mit der kulturellen Nachweismethode konnte kein STEC von Tonsillen isoliert werden. Ähnliche Studien, bei denen STEC aus Tonsillenmaterial vom Schaf isoliert wurde, sind nicht bekannt und ein Vergleich daher nicht möglich. Allerdings wiesen BONARDI et al. (2007) bei italienischen Schlachtrindern STEC 0157 in den Tonsillen nach. Die Nachweishäufigkeit lag bei 1,1 % (1 von 93). Auch FRANK et al. (1994) untersuchten die Tonsillen von Rindern auf pathogene *E. coli*, und stellten fest, dass neben STEC auch andere für den Menschen pathogene *E. coli* in den Tonsillen nachweisbar sind. Dies bedeutet, dass die Tonsillen ein Reservoir, nicht nur für STEC, sondern auch für andere pathogene Keime, im gesunden Wiederkäuer darstellen. Das könnte mit dem Aufbau der Tonsillen von Wiederkäuern zusammenhängen. Grundsätzlich sind Tonsillen in das weiche Gewebe des Pharynx eingebettet. Auf jeder Seite des Pharynx führt eine Öffnung in den Tonsillensinus, der sich in zwei kleine Kanäle spaltet, die dann in ein Geflecht kleiner blind-endender Tubuli übergehen

(PELAGALLI et al. 1983). Dies sind optimale Verhältnisse für die Kolonisation von oro-nasal aufgenommenen Keimen. Dennoch scheint die Kolonisationsrate von STEC in den Tonsillen nicht sehr hoch zu sein. Zum einen konnten in der eigenen Untersuchung mit dem kulturellen Nachweisverfahren keine STEC detektiert werden, zum anderen ist die Nachweisrate von STEC in den hier untersuchten Schaf tonsillen mittels dem sensitiveren Real-Time PCR-Verfahren mit 6,1 % nicht übermäßig hoch. Aus den Kotproben wurde schließlich schon mit dem kulturellen Verfahren eine Nachweisrate von 10,2 % ermittelt. Diese Vermutung wird von einer Untersuchung von BUNCIC und AVERY (1997) gestützt, die im Tonsillenmaterial von Rindern keine STEC nachweisen konnten. Zwar wurden hier Rinder untersucht, doch handelt es sich ebenfalls um Wiederkäuer, zwischen denen sicherlich Parallelen gezogen werden können. Auch BONARDI et al. (2007) hatten mit 1,1 % eine geringe Nachweisrate von STEC in Tonsillen von Rindern.

Tonsillenproben gelten, anders als komplexe Medien wie Kot, als gut geeignetes Material für eine Real-Time PCR. Sie enthalten keine nennenswerten PCR-inhibierenden Faktoren, die nicht durch die üblichen Aufreinigungsmethoden beseitigt werden könnten. Es ist demnach davon auszugehen, dass mit dem hier angewandten Real-Time PCR-Verfahren das tatsächliche Vorkommen von STEC in Tonsillen beim Schaf ermittelt werden konnte. Der negative Nachweis mit dem kulturellen Verfahren ist möglicherweise auf die Fähigkeit von STEC und anderen Keimen zurückzuführen, in der entsprechenden Probe zwar in einem lebensfähigen aber nicht mehr anzüchtbaren Zustand zu verharren. Dieses Problem wird mit der Real-Time PCR umgangen, da mit diesem Verfahren auch nicht mehr kultivierbare Keime nachgewiesen werden können.

7.3. Spezifischer Nachweis der Virulenzgene *stx1* und *stx2*

In den eigenen Untersuchungen wurden bei 87,5 % (14 von 16) der STEC-positiven Schaf- und Ziegenproben *stx1* detektiert, während das *stx2*-Gen in 50 % (8 von 16) der Fälle nachgewiesen wurde. Das *stx1*-Gen alleine kam in 8 der 14 (57,1 %) *stx1*-positiven Proben vor. Das *stx2*-Gen alleine war in 2 der 8 (25 %) *stx2*-positiven Proben nachweisbar. Die Nachweishäufigkeit für *stx1* und *stx2* in Kombination lag bei 37,5 % (6 von 16). Diese Ergebnisse decken sich in etwa mit anderen Studien. Am häufigsten wird beim Schaf das *stx1*-Gen nachgewiesen, während die Nachweisrate von *stx1* und *stx2* in Kombination am zweithäufigsten vorkommt. Das *stx2*-Gen kommt beim Schaf seltener vor. (FEGAN und DESMARCHELIER 1999, DJORDJEVIC et al. 2001, URDAHL et al. 2001 und 2002, BLANCO et al. 2003, REY et al. 2003, ZWEIFEL et al. 2004a und COOKSON et al. 2006) (Tabelle 7). Dies ist eine wichtige Erkenntnis im Hinblick auf die Pathogenität von STEC für den Menschen. STEC, die das *stx2*-Gen exprimieren, werden mit schweren Krankheitsbildern des Menschen in Verbindung gebracht und daher als besonders pathogen eingestuft (OSTROFF et al. 1998 und BOERLIN et al. 1999). Schafe, die *stx2* exprimierende STEC ausscheiden, sind daher als potentielle Gefahrenquelle für den Menschen anzusehen. Interessanterweise weicht die Verteilung der Virulenzgene *stx1* und *stx2* bei von BEUTIN et al. (1993) und ZSCHÖCK et al. (2000) in Deutschland durchgeführten Untersuchungen von den Ergebnissen ausländischer Autoren ab (URDAHL et al. 2001 und 2002, BLANCO et al. 2003, REY et al. 2003). BEUTIN et al. (1993) wiesen mit 55,3 % am häufigsten das *stx1*- und *stx2*-Gen in Kombination nach. Am zweithäufigsten kam mit 27,1 % das *stx2*-Gen vor, während das *stx1*-Gen mit 17,6 % das Schlusslicht in der Nachweishäufigkeit bildete. ZSCHÖCK et al. (2000) dagegen konnten am häufigsten das *stx1*-Gen nachweisen (66,7 %), gefolgt von dem *stx2*-Gen (33,3 %), wohingegen die Kombination von *stx1* und *stx2* bei STEC-positiven Schafen überhaupt nicht vorkam. Wie die Verteilung der *stx*-Gene bei Schafen zu erklären ist, bleibt zunächst offen. Möglicherweise spielt die Lokalisation dieser Virulenzgene auf Prophagen im Chromosom eine Rolle. Den tatsächlichen Grund für das Verteilungsmuster der *stx*-Virulenzgene festzustellen, bleibt demnach weiteren Studien vorbehalten.

8. Vorkommen von *Y. enterocolitica* in Schaf- und Ziegenbetrieben

8.1. *Y. enterocolitica*-Nachweis von Kotproben

In den eigenen Untersuchungen gelang der Nachweis von *Y. enterocolitica* aus Kotproben von Schafen weder mit dem kulturellen Verfahren noch mit der Real-Time PCR. KECHAGIA et al. (2007) kamen bei Untersuchungen in Griechenland zu den gleichen Ergebnissen. Sie konnten bei keinem der 63 untersuchten Schafe *Y. enterocolitica* nachweisen. Als Ausgangsmaterial wurden rektale Tupferproben verwendet. Eine Studie aus Australien beweist ebenfalls die sehr niedrige Prävalenz von *Y. enterocolitica* beim Schaf. BAILEY et al. (2003) konnten bei der Untersuchung von Kot bei keinem der 475 Schafe aus 19 Herden *Y. enterocolitica* nachweisen. In anderen Studien gelang dieser Nachweis jedoch, auch wenn die Nachweisrate mit 8 bis 17 % häufig niedrig ausfiel (SLEE und SKILBECK 1992, MCNALLY et al. 2004 und MILNES et al. 2007). Demnach scheint die Prävalenz von *Y. enterocolitica* beim Schaf allgemein niedrig zu liegen. Obwohl *Y. enterocolitica* als lebensmittelassoziierter Keim bekannt ist, geht eine Infektion des Menschen, wie schon zuvor vermutet, eher vom Konsum kontaminierten Schweinefleisches aus, statt von Schafprodukten. Es ist bekannt, dass Schweine das Hauptreservoir für *Y. enterocolitica* darstellen (FUNK et al. 1998, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999). Es hat den Anschein, dass auch Schafe in Deutschland, zumindest in Süddeutschland, kein nennenswertes Reservoir für *Y. enterocolitica* bilden. Allerdings fehlen Vergleichsstudien aus anderen deutschen Bundesländern, um diese These zu festigen.

Auch bei Ziegen in Deutschland liegt die Prävalenz von *Y. enterocolitica* sehr niedrig. ARNOLD et al. (2006) konnten aus 17 von 575 Ziegenkotproben (3 %) *Y. enterocolitica* isolieren. Diese Untersuchungen wurden in Niedersachsen durchgeführt. Bei den eigenen Untersuchungen im Süddeutschen Raum konnten dagegen bei keiner der 43 Kotproben von Ziegen *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden. Offensichtlich stellen deutsche Ziegen, wie auch deutsche Schafe, kein nennenswertes Reservoir für *Y. enterocolitica* dar.

Dennoch besteht die Möglichkeit, dass die Prävalenz von *Y. enterocolitica* bei Schaf und Ziege in Südbayern unterschätzt wird. Sind etwa nur sehr wenige Keime in den zu untersuchenden Proben vorhanden, oder aber handelt es sich um noch lebensfähige aber nicht mehr anzüchtbare Keime, dann sind diese mittels kultureller Verfahren schwer nachweisbar. Und wie bereits zuvor beschrieben, scheint Wiederkäuerkot, und insbesondere Kot von kleinen Wiederkäuern, inhibitorische Partikel zu enthalten, die in der Lage sind, die Real-Time PCR zu beeinträchtigen. Es wäre also denkbar, dass vorhandene *Y. enterocolitica* mit den verwendeten Verfahren nicht nachgewiesen wurden und damit die Prävalenz von *Y. enterocolitica* bei Schafen und Ziegen in Bayern als zu niedrig eingestuft wird.

8.2. *Y. enterocolitica*-Nachweis von Tonsillenproben

Mit Hilfe der Real-Time PCR konnte bei 2 von 64 Tonsillenproben (3,1%) *Y. enterocolitica* festgestellt werden. Mit dem kulturellen Verfahren gelang der Nachweis nicht. Die beiden positiv-getesteten Proben stammten von Schafen. Aus Ziegentonsillen konnten keine *Y. enterocolitica* isoliert werden. Es bleibt jedoch zu bedenken, dass die Anzahl an untersuchten Schaftonsillen höher war, als die Anzahl der Ziegentonsillen. Von den insgesamt 64 Proben stammten 49 Proben vom Schaf und 15 Proben von der Ziege. Dieses ungleiche Verhältnis erschwert einen direkten Vergleich der Nachweishäufigkeit von *Y. enterocolitica* aus Tonsillenproben zwischen Schaf und Ziege.

Insgesamt liegt die Nachweishäufigkeit von *Y. enterocolitica* aus Tonsillenproben von Schaf und Ziege mit 3,1 % niedrig. Dennoch ist damit bewiesen, dass dieses Bakterium in Bayern beim Schaf vorkommt. Denn aus Kotproben konnte *Y. enterocolitica* schließlich nicht isoliert werden. Bei den Ziegen dagegen konnte weder in Tonsillen noch in Kot *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden. NIKOLAOU et al. (2005) testeten die Seroprävalenz von Anti-*Yersinia* Antikörper bei Ziegen in Niedersachsen und fanden bei 66 % (449 von 681) der untersuchten Ziegen Antikörper gegen diesen Keim. Allerdings wurde hier nicht speziell auf *Y. enterocolitica* eingegangen. Es ist demnach wahrscheinlich, dass auch Ziegen *Y. enterocolitica* beherbergen. Dies ist ebenfalls für den süddeutschen Raum anzunehmen.

Tonsillenmaterial ist ein verlässliches Medium, um mittels Real-Time PCR die gesuchten Bakterien nachzuweisen. Aus anderen Studien, in denen überwiegend Schweine auf *Y. enterocolitica* getestet wurden, ist hinlänglich bekannt, dass mittels Real-Time PCR der Yersinien-Nachweis aus Tonsillen erfolgreich durchgeführt werden kann (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000, KORTE et al. 2004, BHADURI et al. 2005). Dies ist auch für die eigene Untersuchung anzunehmen. Hinsichtlich des Nachweises von *Y. enterocolitica* aus Kotproben, kann gefolgert werden, dass Tonsillen als Nachweismaterial für Yersinien besser geeignet sind als Kot. Dies gilt zumindest solange, bis eine Aufbereitungsmöglichkeit für Kot gefunden wurde, die eine Real-Time PCR ohne Sensitivitätseinbußen zulässt. Es muss jedoch bedacht werden, dass die hier untersuchten Schafe und Ziegen im Kot- und Tonsillenprobendurchgang zum Teil aus unterschiedlichen Herden stammten. Nur ein Teil der Tiere aus dem Tonsillenprobendurchgang stimmte mit jenen Tieren überein, die bereits im Kotprobendurchgang beprobt wurden. Demnach kann auch eine unterschiedliche Herdenprävalenz für die Diskrepanz der Ergebnisse von Kot und Tonsillenproben verantwortlich sein.

9. Betrachtung der Ergebnisse in Bezug auf die Betriebsstruktur und das Haltungssystem

9.1. STEC

Für diese Studie wurden insgesamt 18 Schafbetriebe beprobt. In 6 dieser Betriebe konnte STEC nachgewiesen werden. Das entspricht einem Anteil von 33,3 %. Im Vergleich mit anderen Studien (ZSCHÖCK et al. 2000, REY et al. 2003, ZWEIFEL et al. 2003) ist der hier detektierte Anteil STEC-positiver Herden gering. ZSCHÖCK et al. (2000) konnten in 100 % der untersuchten Betriebe in Deutschland STEC nachweisen. Allerdings wurden insgesamt nur 3 Schafbetriebe untersucht. ZWEIFEL et al. (2003) fanden in der Schweiz bei 30 von 31 (96,8 %) Betrieben STEC. Auch REY et al. (2003) deckten in Spanien hohe Herdenprävalenzen auf. In 33 von 35 (94,3 %) Herden konnte STEC nachgewiesen werden. Die, innerhalb dieser Studie detektierte, geringe Herdenprävalenz von STEC bei Schafen in Bayern stimmt mit der ebenfalls geringen STEC-Prävalenz bei den Einzeltieren überein.

Bei 2 der 6 STEC-positiven Betriebe handelte es sich um Großbetriebe mit über 500 Schafen, 2 weitere Betriebe hielten zwischen 50 und 199 Tiere, einer der 6 Betriebe hielt 250 Schafe und ein weiterer gehörte zu den kleineren Betrieben mit einer Anzahl von 10 bis 49 Schafen. Aus dieser homogenen Verteilung STEC-positiver Betriebe lässt sich schwerlich erkennen, ob etwa in Großbetrieben mit einer sehr hohen Anzahl von Tieren STEC häufiger nachgewiesen werden kann als etwa in kleinen Betrieben. Für einen solchen Vergleich ist eine wesentlich höhere Anzahl STEC-positiver Betriebe vonnöten. Es könnte nur spekuliert werden, ob in Großbetrieben, in denen eine hohe Tierdichte herrscht und sehr viele Schafe miteinander in Kontakt stehen und auch ein stetiger Zu- und Abgang von Tieren stattfindet, häufiger von STEC betroffen sind, oder ob dies von hygienischen Verhältnissen abhängig gemacht werden kann. ARNOLD et al. (2006) stellten bei ihren Untersuchungen, allerdings für *Y. enterocolitica* in Ziegenherden, den Hygienestatus der untersuchten Betriebe fest, konnten aber keine statistisch relevanten Verbindungen zwischen dem Hygienestatus eines Betriebes und der Nachweishäufigkeit pathogener *Yersinia* feststellen. Dergleichen könnte auch für

STEC gelten. Es wäre auch denkbar, dass gerade kleine Betriebe häufiger von STEC betroffen sind. Schafe aus kleinen Betrieben stehen oftmals mit anderen Tierarten wie etwa Rindern in Kontakt. Gerade in Hobbyzuchten oder kleinen landwirtschaftlichen Unternehmen werden neben dem Schaf oft auch Rinder, Schweine, Pferde oder Esel gehalten, von denen eine Infektion mit STEC ausgehen könnte. Festzuhalten bleibt, dass solche Vermutungen anhand der hier vorliegenden Ergebnisse nicht belegt werden können und daher offen bleibt, ob nun große Herden oder aber kleine Betriebe in Bayern häufiger mit STEC belastet sind.

Nicht nur bezüglich der Größe der Schafherde sondern auch hinsichtlich der Rasse konnten keine spezifisch auffallenden Häufungen positiver STEC-Nachweise bei einer bestimmten Schafrasse festgestellt werden. Zwar gelang der STEC-Nachweis am häufigsten bei den Merinolandschafen, jedoch ist diese Rasse in Deutschland weit verbreitet und wurde für diese Studie dementsprechend oft beprobt. 2 der 6 STEC-positiven Schafbetriebe und einer der 3 STEC-positiven Mischbetriebe hielten Merinolandschafe. Die Rassen Coburger Fuchsschaf, Juraschaf, Rhönschaf, Suffolk, Texel und Deutsches Bergschaf wurden ebenfalls positiv auf STEC getestet, kamen aber jeweils nur einmal in STEC-positiven Betrieben vor.

Betrachtet man die Nachweishäufigkeit von STEC in Bezug auf das Haltungssystem, so ergibt sich die höchste Detektionsrate bei der Koppel- und standortgebundenen Hüttehaltung. In 5 von insgesamt 12 Koppelhaltungen und in 3 von insgesamt 11 standortgebundenen Hüttehaltungsbetrieben konnte STEC nachgewiesen werden. Auch in einer von 3 Laufstallhaltungen und bei einem von 4 Betrieben mit der Kombination aus Stall und Auslauf wurde STEC nachgewiesen. Bei dem einzigen hier untersuchten Betrieb der seine Schafe in Wanderschafhaltung hielt wurden keine STEC isoliert. Die Koppelhaltung und die standortgebundene Hüttehaltung waren innerhalb dieser Studie die am häufigsten vertretenen Haltungsformen. Dies spiegelt sich auch in der Häufigkeit dieser Haltungsformen innerhalb Deutschlands wieder. 42 % aller deutschen Schafe werden in Koppeln gehalten, während 39 % der deutschen Schafe in standortgebundener Hüttehaltung gehalten werden (BUCHENAUER, 1997b). Dies stellt auch den Grund für die höchste Nachweisrate von STEC innerhalb dieser beiden Haltungsformen dar.

Bei den Ziegen war einer von 7 Betrieben STEC positiv. Dabei handelte es sich um einen Betrieb der Größenordnung 50 bis 199 Tiere, der die Rasse Bunte Deutsche Edelziege hielt. Diese Ziegenrasse kommt in Süddeuschland am häufigsten vor (DITTRICH und SEUSER 1996) und wurde auch für diese Studie am häufigsten beprobt.

9.2. Y. enterocolitica

Y. enterocolitica wurde in einem von 18 Schaf- und in einem von 6 Mischbetrieben nachgewiesen. Das entspricht einem Anteil von 5,5 % bzw. 16,6 %. Diese Herdenprävalenzen liegen leicht unter denen, die in anderen Studien detektiert wurden (SLEE und SKILBECK 1992, BAILEY et al. 2003, MCNALLY et al. 2004, LANADA et al. 2005, NIKOLAOU et al. 2005, ARNOLD et al. 2006, KECHAGIA et al. 2007 und MILNES et al. 2007). Die benannte Schafherde bestand aus etwa 250 Tieren, der Mischbetrieb aus 100 Schafen und 60 Ziegen. In beiden Betrieben war die Rasse Merinolandschaf vertreten. Im Mischbetrieb kamen noch Burenziegen hinzu. Allerdings stammte die *Y. enterocolitica*-positive Tonsillenprobe aus dem Mischbetrieb von einem Schaf der Rasse Merinolandschaf. Wie bereits zuvor erwähnt, ist das Merinolandschaf die in Deutschland am häufigsten vorkommende Schafrasse und war auch in der eigenen Studie am häufigsten vertreten. Es ist daher nachvollziehbar, dass *Y. enterocolitica* bei dieser Rasse nachgewiesen wurde. Bei den Haltungssystemen konnten die *Y. enterocolitica*-positiven Proben zum einen aus einer Koppelschafhaltung und zum anderen aus einer standortgebundenen Hüttehaltung isoliert werden. Beide Haltungssysteme kommen deutschlandweit und ebenfalls in Bayern häufig vor. Daher stammen die meisten innerhalb dieser Studie beprobten Schafe aus diesen beiden Haltungssystemen. Somit ist die Wahrscheinlichkeit, *Y. enterocolitica* bei Tieren aus Koppelhaltung bzw. Standortgebundener Hüttehaltung nachzuweisen, sehr hoch.

10. Schlussfolgerung

Die Nachweisrate für STEC und *Y. enterocolitica* aus ovinen und caprinen Kot- und Tonsillenproben ist in dieser Studie gering. Das mag an der niedrigen Prävalenz dieser Bakterien bei Schaf und Ziege in Bayern liegen. Da jedoch in den Studien aus Australien, Norwegen, Spanien und der Schweiz von FEGAN und DESMARCHELIER 1999, DJORDJEVIC et al. 2001, URDAHL et al. 2001 und 2002, BLANCO et al. 2003, REY et al. 2003, ZWEIFEL et al. 2004a und COOKSON et al. 2006 zum Teil wesentlich höhere Nachweisraten detektiert wurden, ist anzunehmen, dass die tatsächliche Prävalenz von STEC und *Y. enterocolitica* auch bei bayerischen Schafen und Ziegen höher liegt, als in der hier vorliegenden Studie festgestellt werden konnte. Vermutlich waren die hier angewandten Isolierungsverfahren nicht sensitiv genug im Nachweis von STEC und *Y. enterocolitica* und führten so zu einer Unterschätzung der Prävalenz. Es bleibt daher weiteren Studien vorbehalten, ein Nachweissystem zu entwickeln, welches in der Lage sein wird, STEC und *Y. enterocolitica* mit hoher Sensitivität direkt aus ovinen und caprinen Kotproben zu detektieren. Denkbar wäre ein PCR-Protokoll, das ermöglicht, eventuell vorhandene inhibitorische Komponenten im Kot der Wiederkäuer zu überwinden. Möglicherweise war dies der Grund, warum in der hier vorliegenden Untersuchung die Nachweisraten so gering ausfielen.

Eine Gefährdung des Menschen durch STEC und *Y. enterocolitica* bei kleinen Wiederkäuern ist aus der vorliegenden Arbeit nicht direkt erkennbar. Jedoch wurden durch den Nachweis dieser beiden Bakterien sowohl in Kotproben als auch in Tonsillenproben bestätigt, dass kleine Wiederkäuer die genannten humanpathogenen Keime ausscheiden bzw. im Körper beherbergen, ohne selbst daran zu erkranken. Sie stellen somit eine Kontaminationsquelle für den Menschen dar. Die meisten Infektionen des Menschen mit STEC und *Y. enterocolitica* sind Lebensmittel assoziiert, aber auch der direkte Kontakt zum Tier kann eine Infektion des Menschen bedingen (NATARO und KAPER 1998). Es bleibt also festzuhalten, dass Schaf und Ziege ein Reservoir für die beiden in der vorliegenden Studie untersuchten Bakterien darstellen können und somit als direkte, als auch als indirekte Infektionsquelle für den Menschen in Frage kommen.

Zusammenfassung

STEC und *Y. enterocolitica* sind bedeutende Zoonoseerreger die beim Menschen schwere Krankheitsbilder hervorrufen können. Im Hinblick auf eine eventuelle Gefährdung des Menschen durch STEC und *Y. enterocolitica*, ausgehend von Schaf und Ziege, wurden diese beiden Tierarten im Bundesland Bayern auf das Vorhandensein dieser beiden Pathogene untersucht.

In der Zeit von April bis Dezember 2006 wurden insgesamt 200 Kotproben als Poolproben von kleinen Wiederkäuern aus Bayern gesammelt. Von März bis Juni 2007 wurden Tonsillenproben von Schlachtieren als Einzeltierproben entnommen. Beide Probenarten wurden zum einen mit einem kulturellen Verfahren und zum anderen mittels Real-Time PCR auf das Vorhandensein von STEC und *ail*-positiven *Y. enterocolitica* geprüft. Das kulturelle Verfahren bestand aus einem Direktausstrich und einem Übernachtsausstrich der in m-TSB homogenisierten Proben. Die Anzuchtung der Keime erfolgte für STEC auf dem selektiven CT-SMAC-Agar und für *Y. enterocolitica* auf dem selektiven CIN-Agar. Sorbitol-negative Bakterien, die sich auf CT-SMAC-Agar als helle, weißlich-durchsichtige Kolonien darstellten, wurden zunächst auf einen nichtselektiven Agar subkultiviert und nach DNA-Aufreinigung der Probe mittels Real-Time PCR auf das Vorkommen der Virulenzgene *stx1* und *stx2* untersucht. Typische *Y. enterocolitica*-Kolonien, die auf CIN-Agar das Erscheinungsbild einer kleinen, lilafarbenen Kolonie mit schmalen hellen Hof, das sogenannte „Kuh-Auge“ zeigten, wurden ebenfalls auf einen nichtselektiven Agar subkultiviert und schließlich nach DNA-Aufreinigung der Probe dem Bestätigungsnachweis mittels Real-Time PCR unterzogen. Beim direkten Nachweis von STEC und *Y. enterocolitica* mittels PCR wurde von dem über Nacht angereicherten Homogenisat eine Aufreinigung der DNA mittels InstaGene gemacht. Anschließend wurden die aufgereinigten Proben mittels Real-Time PCR auf das Vorhandensein der beiden Keime anhand der Virulenzgene *stx1* und *stx2* für STEC bzw. *ail* für *Y. enterocolitica* untersucht.

Die Nachweisrate von STEC aus Schafkot lag bei 10,2 % im kulturellen Nachweisverfahren. Von 137 Kotproben des Schafes waren demnach 14 Proben STEC positiv. Mit dem Real-Time PCR-Verfahren konnte nur bei einer der 137 Schafkotproben STEC nachgewiesen werden. Aus Tonsillenmaterial des Schafes wurde STEC aus 3 von insgesamt 49 Proben isoliert (6,1 %). Dieser Nachweis gelang mittels Real-Time PCR. Mit dem kulturellen Verfahren dagegen konnte bei keiner der 49 Schafonsillen STEC nachgewiesen werden. Bei den Ziegen gelang der Nachweis von STEC aus Kotproben mit beiden Isolierungsverfahren nicht. Jedoch wurde in einer von 15 Tonsillenproben der Ziege (6,7 %) STEC mittels Real-Time PCR nachgewiesen. Mit dem kulturellen Verfahren konnte STEC aus Tonsillenproben der Ziege nicht isoliert werden. Die Nachweisrate von *Y. enterocolitica* beim Schaf lag bei 4,1 % im Real-Time PCR-Verfahren. Zwei von 49 Schafonsillen stellten sich als *Y. enterocolitica*-positiv heraus. Aus Kotproben des Schafes konnten jedoch keine *Yersinia* isoliert werden. Mit dem kulturellen Verfahren konnte beim Schaf weder aus Tonsillen noch aus Kotproben *Y. enterocolitica* isoliert werden. Bei den Ziegen konnte mit beiden Verfahren weder aus Kot- noch aus Tonsillen *Y. enterocolitica* isoliert werden. Am häufigsten kam STEC bei Schafbetrieben vor, die Koppelhaltung betrieben. Das *stx1*-Gen wurde in 14 von 16 Proben nachgewiesen. Es kam 8-mal alleine vor und 6-mal in Kombination mit dem *stx2*-Gen. Das *stx2*-Gen wurde insgesamt 8-mal nachgewiesen, kam aber nur 2-mal alleine vor.

Die niedrige Nachweisrate von STEC und *Y. enterocolitica* deutet auf eine niedrige Prävalenz dieser beiden Pathogene bei Schaf und Ziege in Bayern hin. Da jedoch aus anderen Studien wesentlich höhere Prävalenzen von STEC und *Y. enterocolitica* bei diesen Tierarten bekannt sind, liegt die Vermutung nahe, dass das hier ausgewählte Isolierungsverfahren nicht sensitiv genug im Nachweis dieser beiden Keime ist. Im Besonderen, das als sehr sensitiv geltende Real-Time PCR Verfahren scheint beim Nachweis dieser Keime aus Kotproben kleiner Wiederkäuer Lücken aufzuweisen. Es ist daher möglich, dass das Vorkommen insbesondere von STEC und auch von *Y. enterocolitica* bei bayerischen Schafen und Ziegen unterschätzt wird.

Da sowohl STEC als auch *Y. enterocolitica* bei Schafen und Ziegen in Bayern

nachgewiesen wurden, muss davon ausgegangen werden, dass diese Tierarten ein Reservoir für STEC und *Y. enterocolitica* sind und somit eine Gefahrenquelle für den Menschen darstellen können. Dennoch ist die innerhalb der vorliegenden Studie detektierte Nachweisrate von STEC und *Y. enterocolitica* in Bayern bei beiden Tierarten gering.

Summary

A contribution to the prevalence of *stx*-positive *Escherichia coli* and *ail*-positive *Yersinia enterocolitica* in small ruminants from different housing systems in Bavaria

STEC and *Y. enterocolitica* are significant zoonotic pathogens which can cause severe disease among humans. With regards to the potential danger of STEC and *Y. enterocolitica* for humans from sheep and goats, these two species were examined in Bavaria for the presence of these two bacteria.

Between April and December 2006, 200 faecal samples were collected as pool samples from small ruminants in Bavaria. From March to June 2007, samples from tonsils of slaughtered animals were taken as individual samples. Both sample types were examined for the presence of STEC and *Y. enterocolitica* using culture and Real-time PCR methods.

The culture method included direct plating on selective agar plate and plating on selective agar plate after over-night enrichment in m-TSB with bile salt. For the isolation of STEC, CT-SMAC agar was used and to isolate *Y. enterocolitica*, CIN agar was used. Sorbitol-negative colonies were subcultivated on non-selective TSA and, after DNA purification, they were examined for the presence of the virulence genes *stx1* and *stx2* by real-time PCR. *Y. enterocolitica* that showed the typical appearance on the agar as small, purple colonies with a narrow light rim, the so-called “cow’s eye”, were also subcultivated on non-selective TSA and the *ail* gene was confirmed by real-time PCR after DNA had been purified. Additionally STEC and *Y. enterocolitica* were detected directly from over-night enrichment. The DNA was extracted using InstaGene. The purified samples were screened for the presence of both organisms on the basis of the virulence genes *stx1* and *stx2* for STEC and *ail* for *Y. enterocolitica* by real-time PCR.

The detection rate of STEC in faecal samples of sheep was 10,2 % (14/137) using culturing. Using PCR, only one of 137 faecal samples was positive. From the sheep-tonsils, STEC was detected in 3 out of 49 samples (6,1 %) by PCR. All sheep tonsil samples were negative with culturing. All goat faecal samples were STEC negative with both PCR and culture methods. However, one tonsil-sample was STEC positive with PCR but negative with culturing.

The detection-rate of *ail*-positive *Y. enterocolitica* in tonsils of sheep was 4,1 % (2/49) using PCR. With culturing no *ail*-positive *Y. enterocolitica* were detected in sheep tonsils. However, *ail*-positive *Y. enterocolitica* could not be isolated from sheep faeces with both methods. *Y. enterocolitica* could not be isolated from goats. STEC was most often isolated from sheep pastured with fenced paddocks. Gene *stx1* was detected in 14 out of 16, 8 times alone and 6 times in combination with *stx2*. Gene *stx2* was detected in 8 times but only twice alone.

The study shows that sheep is one reservoir of both STEC and *ail*-positive *Y. enterocolitica* in Bavaria. Gene *stx1* was dominating among the STEC-positive samples. STEC was detected in both tonsils and faeces of sheep. Pathogenic *Y. enterocolitica* was detected only in sheep tonsils. The low isolation rate of STEC and *ail*-positive *Y. enterocolitica* suggest a low prevalence of both organisms among sheep and goats in Bavaria. One reason for the low detection rate of both pathogens in faecal samples using PCR can be due to the sample preparation used in this study. Another reason could be the inhibitory factors present in faeces of ruminants.

Anhang

1. Anhang zu Material und Methoden

1.1. Medien zur Aufbewahrung, Anreicherung und Identifizierung von *Y. enterocolitica* und STEC

1.1.1. Flüssige Medien

m-TSB-Nährbouillon

(modified Tryptone Soja Broth)

(MERCK, 105459)	30 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml
Gallensalze (Oxoid)	1,5g

- Mischen und ggf. zum Lösen erhitzen
- Abfüllen je 90 ml in Erlenmeyerkolben
- Sterilisieren 15 min bei +121°C

1.1.2. Feste Medien

CIN-Agar

(Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar)

Basismedium:

Yersinia Selektivagar nach SCHIEMANN (Basis)

MERCK, 116434	29 g
Destilliertes Wasser	ad 500 ml

- zum Lösen erhitzen
- Sterilisieren 15 min bei +121°C

zugeführtes Supplement:

Yersinia Selektiv Supplement (MERCK, 116466)	
Ethanol absolut (vergällt) (MERCK, 100974)	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

Fluorakult-Agar

(E.coli 0157:H7-Agar)

E.coli-Selektivagar (MERCK; 440836)	55g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

- zum Lösen erhitzen
- Sterilisieren 15 min bei +121°C
- Abfüllen je ca.15 ml in sterile Petrischalen

SMAC-Agar

(Sorbitol-McConkey-Agar)

E.coli-Selektivagar (MERCK, 544407)	25,8 g
Destilliertes Wasser	ad 500 ml

- zum Lösen erhitzen
- Sterilisieren 15 min bei +121°C
- Abfüllen je ca. 15 ml in sterilen Petrischalen

zugeführtes Supplement:

Cefixim-Tellurit Supplement (MERCK, 610797)	
Destilliertes Wasser	1 ml

- Zugabe des Supplements bei Abkühlung des Basismediums auf 50°C
- Abfüllen je ca 15 ml in sterile Petrischalen

TSA-Agar

(Tryptone soy agar/CASO-Agar)

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CASO-Agar)

(MERCK, 105458)

40 g

Destilliertes Wasser

ad 1000 ml

- zum Lösen erhitzen
- Sterilisieren 15 min bei +121°C
- Abfüllen je ca. 15 ml in sterile Petrischalen

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

1.1.3. Aufbewehrungsmedium

Mikrobank

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

1.2. 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)	

1.3. Geräte und Hilfsmittel

Waagen

- Analysenwaage CP3202S-OCE
- Analysenwaage AC210S

SARTORIUS
SARTORIUS

Magnetrüher mit Heizplatte

- Magnetührwerk MR 2002
- Typ RCT Janke und Kunkel

HEIDOLPH
IKA LABORTECHNIK

Pipetten

- Research 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl

EPPENDORF

Pipettensitzen

- ep T.I.P.S. Standardtips 100 µl, 1000 µl, 5000 µl EPPENDORF
- ep T.I.P.S. filter PCR clean 10 µl, 100 µl, 1000 µl EPPENDORF

Glaspipetten

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

Reagenzgläser

SCHOTT

Wattestopfen

- STERI-Wattestopfen Nr. 14 SCHUBERT

Messzylinder 20 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml

BRAND

Aufbewahrungsgefäße

- Erlenmeyerkolben 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml MERCK

Petrischalen

WALDECK

Reaktionsgefäße

- eppendorf safe-lock-tubes 0,5, 1,5 ml , 2 ml EPPENDORF

Sicherheitsbrenner

- GASI SCHÜTT
- Gasprofi 1^{SCS} WLD-TEC

Ösen

- Platinum/Iridium-Ösen 90/10 BENDER & HOBEIN

Handschuhe

- Gentle Skin classic MEDITRADE

Stomacher-Beutel

- Bag light INTERSCIENCE

Stomacher 400 Circulus

SEWARD

Kühlgeräte

- Kühl-Gefrier-Kombination Typ "Premium" BOSCH

LIEBHERR

Brutschränke

- Typ B 6060, Typ B 6200 HERAEUS INSTRUMENTS

Autoklav

- Hochdruckdampf-Sterilisator Typ 112 KSG STERILISATOREN GmbH

Sterilbank

- HeraSafe KENDRO

Mikrobank

- Mikrobank TM Product Code PL 160

PRO-LAB DIAGNOSTICS

Zentrifugen

- 5415D

EPPENDORF

Heizblöcke

- Thermomixer comfort

EPPENDORF

- Thermostat plus

EPPENDORF

1.4. PCR

1.4.1. Reagenzien zur Probenvorbereitung

Biorad InstaGene™ Matrix, Cat.-Nr. 732-6030

BIORAD

1.4.2. Geräte und Hilfsmittel

Thermocycler

- iCycler IQ®

BIORAD

PCR-Tubes

- 0,2 ml Thin Wall Tubes

BIORAD

- 200 µl Thin Wall Cap Strips

BIORAD

- PCR Plate, 96 well

BIORAD

- Optical tape

BIORAD

1.4.3. Reagenzien für die PCR

Eppendorf® MasterMix (2,5x)

EPPENDORF

iIQ™ SYBR® Green Supermix

BIORAD

iQ™ Supermix

BIORAD

Wasser, Molecular Biology Grade

EPPENDORF

Primer ail1 + 2,

MWG-BIOTECH AG

Primer MK1 + 2

MWG-BIOTECH AG

Primer KS7 + 8

MWG-BIOTECH AG

Primer LP43 + 44

MWG-BIOTECH AG

2. Anhang Ergebnisse

Tabelle 29: Übersicht über die untersuchten Proben

Betrieb	Identification	Enrichment	Urea	culture	Real Time		STEC	Ct	CIN	CT-SMAC	Ct	Stx1	Stx2	mb		
					YE	Ct										
1	W1	D														
		ON			-	-	-	-	-							
	W2	D														
		ON	"-"		-	-	-	-	-							
	W3	D														
		ON			-	-	-	-	-							
	W4	D														
		ON			-	-	+	24	-	-		+				
	W5	D														
		ON			-	-	-	-	-							
	W6	D														
		ON			-	-	-	-	-							
W7	D															
	ON			-	-	-	-	-								
W8	D															
	ON		"+"(8.1/8.2)	-	-	-	-	-								
W9	D		"+"(9.1/9.2/9.3)													
	ON			-	-	-	-	-								
W10	D															
	ON		"+"	-	-	-	-	-								
W11	D															
	ON		"+"(11.1/11.2)	-	-	-	-	-								
W12	D															
	ON		"+"	-	-	-	-	-								
2	W13	D														
		ON		-	-	-	-	-								
		D														
3	W14	ON		-	-	-	-	-								
		D														
		ON		-	-	-	-	-								
3	W15	D														
		ON		-	-	-	-	-								
		D														
4	W16	D		-	-	-	-	-								
		ON		-	-	-	-	-								
		D														
4	W17	D														
		ON		-	-	-	-	-								
		D														
4	W18	ON		-	-	-	-	-								
		D														
		ON		-	-	-	-	-								
4	W19	D														
		On		-	-	-	-	-								
		D														
3	W20	D														
		ON		-	-	-	-	-								
5	W21	D														
		ON		-	-	-	-	-								
	W22	D														
		ON		-	-	-	-	-								
	W23	D														
		ON		-	-	-	-	-								
	W24	D														
		ON		-	-	-	-	-								
	W25	D														
		ON		-	-	-	-	-								
6	W26	D														
		ON		-	-	-	-	-								
		D														
6	W27	ON		-	-	-	-	-								
		D														
6	W28	D														
		ON		-	-	-	-	-								

Anhang

Betrieb	Identification	Enrichment	Urea	culture	Real Time		STEC	Ct	CIN	CT-SMAC	Ct	Stx1	Stx2	mb
					YE	Ct								
7	W29	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W30	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W31	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W32	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W33	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W34	D												
		ON		-	-		-		-	-				
8	W35	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W36	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W37	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W38	D												
		ON		-	-		-		-	+	14		28	1
9	W39	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W40	D												
		ON		-	-		-		-	-				
10	W41	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W42	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W43	D												
		ON		-	-		-		-	+	13		30	1
11	W44	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W45	D												
		ON		-	-		-		-	-				
12	W46	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W47	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W48	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W49	D												
		ON		-	-		-		-	-				
13	W50	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W51	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W52	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W53	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W54	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W55	D												
		ON		-	-		-		-	-				
14	W56	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W57	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W58	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W59	D												
		ON		-	-		-		-	-				
	W60	D												
		ON		-	-		-		-	-				
15	W61	D												
		ON		-	-		-		-	-				

Anhang

Betrieb	Identification	Enrichment	Urea	culture	Real Time		STEC	Ct	CIN	CT-SMAC	Ct	Stx1	Stx2	mb
					YE	Ct								
16	W62	D												
		ON		-	-	-	-	-	-					
	W63	D												
		ON		-	-	-	-	-	-					
	W64	D												
		ON		-	-	-	-	-	-					
W65	D													
	ON		-	-	-	-	-	-						
	D													
W66	D													
	ON		-	-	-	-	-	-						
17	W67	D												
		ON		-	-	-	-	-	-					
	W68	D												
		On		-	-	-	-	-	-					
	W69	D												
		ON		-	-	-	-	-	-					
	W70	D												
		ON		-	-	-	-	-	-					
	W71	D												
		ON		-	-	-	-	-	-					
	W72	D												
		ON		-	-	-	-	-	-					
	W73	D												
		ON		-	-	-	-	-	-	+	37			
W74	D													
	ON		-	-	-	-	-	-	-					
W75	D													
	ON		-	-	-	-	-	-	-					
W76	D													
	ON		-	-	-	-	-	-	+	35				
18	W77	D												
		ON		-	-	-	-	-	-					
	W78	D												
		ON		-	-	-	-	-	-	-				
	W79	D												
		ON		-	-	-	-	-	-	-				
W80	D													
	ON		-	-	-	-	-	-	-					
W81	D													
	ON		-	-	-	-	-	-	-					
19	W82	D												
		ON		-	-	-	-	-	-					
	W82	D												
		ON		-	-	-	-	-	-	-				
	W83	D												
		ON		-	-	-	-	-	-	-				
	W84	D												
		ON		-	-	-	-	-	-	-				
	W85	D												
		ON		-	-	-	-	-	-	-				
	W86	D												
		ON		-	-	-	-	-	-	-				
	W87	D												
		ON		-	-	-	-	-	-	-				
	W88	D												
		ON		-	-	-	-	-	-	-				
	W89	D												
		ON		-	-	-	-	-	-	-				
W90	D													
	ON		-	-	-	-	-	-	-					
W91	D													
	ON		-	-	-	-	-	-	-					
W92	D													
	ON		-	-	-	-	-	-	-					
W93	D													
	ON		-	-	-	-	-	-	-					

Anhang

Betrieb	Identification	Enrichment	Urea	culture	Real Time		STEC	Ct	CIN	CT-SMAC	Ct	Stx1	Stx2	mb		
					YE	Ct										
20	W94	D														
		ON														
	W95	D														
		ON														
	W96	D														
		ON														
	W97	D														
		ON														
	W98	D														
		ON														
21	W99	D														
		ON														
	W100	D														
		ON														
	W101	D														
		ON														
	W102	D														
		ON														
	W103	D														
		ON														
22	W104	D														
		ON														
	W105	D														
		ON														
	W106	D														
		ON														
	W107	D														
		ON														
	W108	D														
		ON														
W109	D															
	ON															
W110	D															
	ON															
W111	D															
	ON									+	20	24	30	1		
W112	D															
	ON															
W113	D															
	ON															
W114	D															
	ON															
W115	D															
	ON															
23	W116	D														
		ON														
	W117	D														
		ON														
	W118	D														
		ON														
	W119	D														
		ON														
	W120	D														
		ON														
W121	D															
	ON															
W122	D															
	ON															
W123	D															
	ON															
W124	D															
	ON															
W125	D															
	ON															
W126	D															
	ON															

Anhang

Betrieb	Identification	Enrichment	Urea	culture	Real Time		STEC	Ct	CIN	CT-SMAC	Ct	Stx1	Stx2	mb
					YE	Ct								
	W127	D												
		ON			-		-		-	-				
24	W128	D												
		ON			-		-		-	-				
	W129	D												
		ON			-		-		-	-				
25	W130	D												
		ON			-		-		-	-				
	W131	D												
		ON			-		-		-	-				
	W132	D												
		ON			-		-		-	-				
	W133	D												
		ON			-		-		-	-				
	W134	D												
		ON			-		-		-	-				
	W135	D												
		ON			-		-		-	-				
	W136	D												
		ON			-		-		-	-				
	W137	D												
		ON			-		-		-	-				
	W138	D												
		ON			-		-		-	-				
	W139	D												
		ON			-		-		-	-				
	W140	D												
		ON			-		-		-	-				
	W141	D												
		ON			-		-		-	-				
	W142	D												
		ON			-		-		-	-				
	W143	D												
		ON			-		-		-	-				
	W144	D												
		ON			-		-		-	-				
	W145	D												
		ON			-		-		-	-				
26	W146	D												
		ON			-		-		-	-				
	W147	D												
		ON			-		-		-	-				
	W148	D												
		ON			-		-		-	-				
	W149	D		SMAC +										
		ON		SMAC +	-		-		-	-	26	34		1
	W150	D												
		ON		SMAC +	-		-		-	-	26	36		1
	W151	D												
		ON		SMAC +	-		-		-	-	26	37		1
	W152	D		SMAC +										
		ON			-		-		-	-				
	W153	D												
		ON			-		-		-	-				
	W154	D		SMAC +										
		ON		SMAC +	-		-		-	-	26	35		1
	W155	D												
		ON			-		-		-	-				
	W156	D												
		ON		SMAC +	-		-		-	-	25	35		1
	W157	D												
		ON		SMAC +	-		-		-	-	17	36		1
27	W158	D												
		ON			-		-		-	-				
	W159	D												
		ON			-		-		-	-				

Anhang

Betrieb	Identification	Enrichment	Urea	culture	Real Time		STEC	Ct	CIN	CT-SMAC	Ct	Stx1	Stx2	mb
					YE	Ct								
	W160	D												
		ON			-	-								
	W161	D												
		ON			-	-								
	W162	D												
		ON			-	-								
	W163	D												
		ON			-	-								
	W164	D		SMAC+										
		ON			-	-								
	W165	D												
		ON			-	-								
	W166	D												
		ON			-	-								
	W167	D												
		ON			-	-								
	W168	D		SMAC+										
		ON			-	-								
	W169	D		SMAC+										
		ON			-	-								
	W170	D												
		ON			-	-								
	W171	D												
		ON			-	-								
	W172	D												
		ON			-	-								
	W173	D		SMAC+										
		ON			-	-								
	W174	D		SMAC+										
		ON			-	-								
28	W174	D												
		ON			-	-								
	W175	D												
		ON			-	-								
	W176	D												1
		ON		SMAC +	-	-					22	36	29	
	W177	D												
		ON			-	-								
	W178	D												
		ON			-	-								
	W179	D												
		ON			-	-								
	W180	D												
		ON			-	-								
	W181	D												
		ON			-	-								
	W182	D		SMAC +							24	36	29	1
		ON		SMAC +	-	-					22	36	31	1
	W183	D												
		ON			-	-								
	W184	D												
		ON		SMAC +	-	-					26	34	27	1
	W185	D												
		ON			-	-								
	W186	D												
		ON			-	-								
	W187	D												
		ON			-	-								
	W188	D												
		ON			-	-								
	W189	D												
		ON			-	-								
	W190	D												
		ON			-	-								
	W191	D												
		ON		SMAC +	-	-					31	35		1

Anhang

Betrieb	Identification	Enrichment	Urea	culture	Real Time		STEC	Ct	CIN	CT-SMAC	Ct	Stx1	Stx2	mb
					YE	Ct								
	W192	D												
		ON												
	W193	D			-	-								
		ON												
	W194	D		SMAC +	-	-					20	37	31	1
		ON												
		D		SMAC +	-	-					32	36		1
		ON												
	W195	D												
		ON			-	-								
	W196	D												
		ON			-	-								
	W197	D												
		ON			-	-								
	W198	D												
		ON		SMAC +	-	-					22	37	32	1
	W199	D												
		ON			-	-								
	W200	D												
		ON			-	-								
														17
1	WT01	D												
		ON												
	WT02	D												
		ON												
2	WT1	D												
		ON												
	WT2	D												
		ON												
	WT3	D												
		ON												
	WT4	D												
		ON												
	WT5	D												
		ON												
	WT6	D												
		ON												
	WT7	D												
		ON												
	WT8	D												
		ON												
	WT9	D												
		ON												
	WT10	D												
		ON												
	WT11	D												
		ON												
	WT12	D												
		ON												
3	WT13	D												
		ON												
	WT14	D												
		ON												
	WT15	D												
		ON												
	WT16	D												
		ON												
	WT17	D												
		ON												
	WT18	D												
		ON												
	WT19	D												
		ON												
	WT20	D												
		ON												

Anhang

Betrieb	Identification	Enrichment	Urea	culture	Real Time		STEC	Ct	CIN	CT-SMAC	Ct	Stx1	Stx2	mb
					YE	Ct								
	WT21	D												
		ON												
4	WT22	D												
		ON								+				
	WT23	D												
		ON												
	WT24	D												
		ON												
	WT25	D												
		ON												
	WT26	D								+			+	
		ON												
	WT27	D												
		ON												
	WT28	D												
		ON												
	WT29	D												
		ON								+				
5	WT30	D							-	-				
		ON							-	-				
	WT31	D							-	-				
		ON							-	-				
	WT32	D							-	-				
		ON							-	-				
	WT33	D												
		ON												
	WT34	D												
		ON												
	WT35	D												
		ON												
	WT36	D												
		ON												
	WT37	D							-	-				
		ON				+			-	-				
	WT38	D												
		ON												
	WT39	D												
		ON												
	WT40	D												
		ON												
	WT41	D												
		ON												
	WT42	D												
		ON												
	WT43	D												
		ON												
	WT44	D												
		ON												
	WT45	D												
		ON												
	WT46	D												
		ON												
	WT47	D												
		ON												
	WT48	D								-				
		ON								+		+		
	WT49	D												
		ON												
	WT50	D												
		ON												
	WT51	D												
		ON												
6	WT53	D												
		ON								+		+	+	

Anhang

Betrieb	Identification	Enrichment	Urea	culture	Real Time		STEC	Ct	CIN	CT-SMAC	Ct	Stx1	Stx2	mb
					YE	Ct								
	WT54	D												
		ON												
	WT55	D												
		ON												
	WT56	D												
		ON												
	WT57	D												
		ON				+			+					
	WT58	D												
		ON												
	WT59	D												
		ON												
	WT60	D												
		ON												
	WT61	D												
		ON												
	WT62 Zg	D												
		ON												
	WT63 Zg	D												
		ON												
	WT64 Zg	D												
		ON												

- W Wiederkäuer-Kotproben mit fortlaufender Nummer
- WT Wiederkäuer-Tonsillenproben mit fortlaufender Nummer
- D Direktausstrich
- ON Übernachtenreicherung
- Urea Urease-Test
- Culture Kolonien auf Platte: *Y. enterocolitica*- bzw. STEC-verdächtig
- YE *Y. enterocolitica*- Ergebnis mittels Real-Time PCR
- CT Threshold cycle
- STEC STEC-Ergebnis mittels Real-Time PCR
- CIN *Y. enterocolitica*-verdächtige Kolonien auf CIN-Agar
- CT-SMAC STEC-verdächtige Kolonien auf CT-SMAC-Agar
- stx1/stx2 stx1-bzw. stx2-positives Ergebnis mittels Real-Time PCR
- mb Mikrobank

Literaturverzeichnis

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB
Untersuchung von Lebensmitteln
Horizontales Verfahren zum Nachweis von präsumptiv pathogenen *Yersinia enterocolitica*
L 00.00.90
Dezember 2004

ABUL AL-SOUD W. und RÂDSTRÖM P. (1998a):
Capacity of nine thermostabile DNA Polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples.
Appl. Environ. Microbiol. **64**, 3748-3753

ABUL AL-SOUD W., LANZ W., BÄCKMAN A., OLCEN P. und RÂDSRÖM P. (1998):
A sample preparation method which facilitates detection of bacteria in blood culture by the polymerase chain reaction.
J. Microbiol. Meth. **32**, 217-224

ACHESON D.W., WOLF L.E. und PARK C.H. (1997):
E.coli and the haemolytic-uremic syndrome.
Engl.J.Med. **336**, 515

aid-Auswertungs-und Informationsdienst für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten e.V.
Schaf-und Ziegenrassen 1996
Online-Version: Informationszentrum für Genetische Ressourcen (IGR)-ZADI
<http://www.aid.de/landwirtschaft/tierspecial/schafressen/>
download 15.10.07

ALEKSIC S., STEIRGERWALT A.G., BOCKEMÜHL J., HUNTLEY-CARTER G.P.,
BRENNER D. (1987):
Yersinia rhodei sp. isolated from human and dog feces and surface water
Int. J. Bact. **37**, 327-332

ALEKSIC S. und BOCKEMÜHL J. (1990):
Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen
Immun. Infekt. **18**, 178-185

ALEKSIC S. (1995):
Occurrence of *Y. enterocolitica* antigens O:3 O:9 and O:8 in different *Yersinia* species
their corresponding H antigens and origin
Contrib. Microbiol. Immunol. **13**, 89-92

ALEKSIC S. und BOCKEMÜHL J. (1996):
Untersuchungen von *Yersinia*-Stämmen aus Deutschland, 1993-1994
Bundesgesundheitsbl. **3**, 94-97

ALEKSIC S. und BOCKEMÜHL J. (1999):

Yersinia and other enterobacteriaceae

In: MURRAY P.R., BARON E.J., PFALLER M.A., TENOVER F.C., YOLKEN R.H.

(Hrsg.):

Manual of clinical microbiol.

7th edition, American society for microbiology, Washington D.C., 483-496

AL MOHSEN I., LUEDTKE G., ENGLISH B. K. (1997):

Invasive infection caused by *Yersinia enterocolitica* in infants.

Pediatr. Infect. Dis. **16**, 253-255

ANTOIGNOLI M.C., SALMAN M D., TRIANTIS J.,HERNANDEZ J. und KEFEE T. (2001):

A one-tube nested polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium bovis* in spiked milk samples: an evaluation of concentration and lytic techniques.

J. Vet . Diagn. Invest. **13**, 111-116

ARNOLD T., NEUBAUER H., NIKOLAOU K., ZOESLER U. UND HENSEL A. (2004):

Identification of *Yersinia enterocolitica* in Minced Meat: A Comparative Analysis of API 20E, *Yersinia* Identification Kit and a 16S rRNA-based PCR Method

J. Vet. Med. B **51**, 23-27

ARNOLD T., NEUBAUER H., GANTER M., NIKOLAOU K., RÖSLER U., TRUYEN U. und HENSEL A. (2006):

Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in goat herds from Northern Germany.

J. Vet.Med. **53 (8)**, 382-386

ASPLUND K. (1998):

Epidemiological and ecological aspects of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:3.

Vet. Med. Diss.,Helsinki, Univ. Veterinär. Fak.

BAILEY J.S. (1998):

Detection of Salmonella cells within 24 to 26 hours in poultry samples with the polymerase chain reaction BAX system.

J. Food Protect. **61**, 792-795

BAILEY J.S., VANSELOW B.A., HORNITZKY M.A., HUM S.I., EAMENS G.J., GILL P.A., WALKERS K.H. und CRONIN J.P. (2003):

A study of the foodborne pathogens: *Campylobacter*, *Listeria* and *Yersinia*, in faeces from slaughter-age cattle and sheep in Australia.

Commun.Diss. Intel. **27 (2)**, 249-257

BANGSOW T., HUCH R., MALE D., MÜLLER S. (2002):

Polymerase-Kettenreaktion

In: SCHIMPF (Hrsg.): Gentechnische Methoden

Spektrum Akadem.Verlag Berlin Heidelberg, Seite 147-167

BASTIAN S.N., CARLE I. und GRIMONT F. (1998):

Comparison of 14 PCR Systems for the detection and subtyping of *stx* genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*.

Res. Microbiol. **149**, 457-472

BAYERISCHES LANDESAMT FÜR STATISTIK UND DATENVERARBEITUNG (2007a):
Schafbestand Bayern
85 / 2006 / 33 / C
www.statistik.bayern.de

BAYERISCHES LANDESAMT FÜR STATISTIK UND DATENVERARBEITUNG (2007b):
Statistische Berichte
Kennziffer: C III 2 j 2006, S. 9
www.statistik.bayern.de

BAYERISCHES LANDESAMT FÜR STATISTIK UND DATENVERARBEITUNG (2007c):
Statistische Berichte
Kennziffer: C III 2 j 2006, S. 7
www.statistik.bayern.de

BAUMGARTEN R., MIERSCH H. UND FENGLER J.D. (1977):
Krankheitsbilder von Yersiniainfektionen
Dtsch. Gesundh.-Wes. **32**, 1218

BEJ A.K., MAHBUBANI M.H., DICESARE J.I. und ATLAS R.M. (1991):
Polymerase chain reaction- gene probe detection of microorganisms by using filter-
concentrated samples.
Appl. Environ. Microbiol. **57**, 3529-3534.

BERCOVIER H. und MOLLARET H.H. (1984):
Genus XIV *Yersinia* van Loghem
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, **1**, S.498-506

BERCOVIER H., BRAULT J., BAARE N., TREIGNIER M., ALONSO J.M., MALLARET
H.H. (1978):
Biochemical, serological and phage typing characteristics of 459 *Yersinia* strains isolated
from a terrestrial ecosystem
Curr. Microbiol. **1**, 353-357

BESSETTI J. (2007):
An Introduction to PCR Inhibitors.
Profiles in DNA
www.promega.com
download: 22.10.07

BETTELHEIM K.A., BENSINK J.C., und SIDJABAT-TAMBUNAN H. (2000):
Serotypes of verotoxin-producing (shigatoxin-producing) *Escherichia coli* isolated from
healthy sheep.
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **23**, 1-7

BEUTIN L., GEIER D., STEINRÜCK H., ZIMMERMANN S. und SCHEUTZ F.(1993):
Prevalence and some properties of verotoxin-producing *Escherichia coli* in seven
different species of healthy domestic animals.
J.Clin. Microbiol. **31**, 2483-2488

BEUTIN L., GEIER D., GEIER K. und ZIMMERMANN S., (1994)
Zur Identifizierung von Verotoxin-bildenden (VTEC) und enterohaemorrhagischen E.coli (EHEC) auf Indikatornährböden.
Klein. Lab. **40**, 193-201

BEUTIN L., ZIMMERMANN S., und GLEIER K. (1996):
Rapid detection and isolation of shiga-like-toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay.
J.Clin.Microbiol. **34**, 2812-2814

BEUTIN L., HORBACH I., ZIMMERMANN S. und GLEIER K. (1997):
Vergleich verschiedener diagnostischer Methoden zum Nachweis von Verotoxin (Shiga-toxin) bildenden *Escherichia coli* Stämmen (VTEC) aus klinischen Stuhlproben.
J. of Lab. Med. **21**, 537-546

BEUTIN L. (2000):
Plasmids in VTEC: their role in virulence and their use in typing.
In: Verotoxigenic *Escherichia coli* in Europe: Pathogenicity and Virulence (Proceedings of the 3rd Meeting of the Concerted Action FAIR6-CT98-3935) ed. Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y. und McDowell D.A.
Nat. Food.Cen. 126-139

BEUTIN L., KRAUSE G., ZIMMERMANN S., KAULFUSS S. und GLEIER K. (2003):
Characterisation of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains isolated from human patients in Germany over a three-year-period.
J. Clin. Microbiol. **42** (3), 1099-1108

BEUTIN L (2006):
Emerging Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen
J. Vet. Med. **53** (7), 299-305

BHADURIS S., TURNER-JONES C., TAYLOR M.M., LACHICA R.V. (1991):
Assay of crystal violet binding for rapid identification of virulent plasmid-bearing clones of *Yersinia enterocolitica*
L.Clin. Microbiol. **25**, 1039-1042

BHADURI S. und COTTRELL B. (1997):
Direct detection and isolation of plasmid-bearing virulent serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various foods.
Appl. Environ. Microbiol. **63**, 4952-4955

BHADURI S. (2002):
Comparison of multiplex PCR, PCR-ELISA, and fluorogenic 5' nuclease PC assays for detection of plasmid-bearing virulent *Yersinia enterocolitica* in swine faeces.
Mol. Cell. Robes **16**, 191-196

BHADURIS S., WHESLEY I.V. und BUSH E.J. (2005):
Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains in pig in the United States.
Appl. Envir. Microbiol. **71** (11), 7117-7121

BLAIS B.W. und PHILLIPPE L.M. (1995):

Comparative analysis of *yadA* and *ail* polymerase chain reaction methods for virulent *Yersinia enterocolitica*

Food Control **6**(4), 211-214

BLANCO J., BLANCO M., BLANCO J.E., MORA A., ALONSO M.P. GONZALES E.A. und BERNARDEZ M.I. (2001):

Epidemiology of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants.

In: Verocytotoxigenic *Escherichia coli* ed.DUFFY G., GARVEY P. und MC DOWELL D.A. Food and Nutrition Press Inc.,113-148

BLANCO M., BLANCO J.E., MORA A., REY J., ALONSO J.M., HERMOSO M., ALONSO M.P., DAHBI G., GONZALES E.A., BERNARDEZ R.I. und BLANCO J. (2003):

Serotypes, Virulence genes, and Intimin types of shigatoxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain.

J. Clin. Microbiol. **41** (4), 1351-1356

BOCKEMÜHL J. und ROGGENTIN P. (2004):

Enterale Yersiniosen, Klinische Bedeutung, Epidemiologie, Diagnostik und Prävention Bundesgesundheitsbl. – Gesundheitsforsch. – Gesundheitsschutz (**7**), 685-691

BOERLIN P., MCEWEN S.A., BOERLIN-PETZOLD F., WILSON J.B., JOHNSON R.P. und GYLES C.L. (1999):

Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans.

J. Clin. Microbiol. **37** (3), 497-503

BONARDI S., FONI E., CHIAPONI C., SALSI A. und BRINDANI F. (2007):

Detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serogroups O157 and O126 in the cecal content and lymphatic tissue of cattle at slaughter in Italy.

J. Food Prot. **70** (6), 1493-1497

BOTTONE E.J. (1997):

Yersinia enterocolitica: The charisma continues

Crit. Rev. Microbiol., 257-276

BOTTONE E.J. (1999):

Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates

Microbes Infect. **1**, 323-333

BOYD B und LINGWOOD C (1989):

Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue.

Nephron **51**, 207-210

BRENNER D.J. (1981):

Classification of *Yersinia enterocolitica*

In: BOTTONE E.J. (Hrsg.): *Yersinia enterocolitica*

CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, S.1-8

BRENNER D.J., DAVIS B.R., STEIGERWALD A.G., RIDDLE C.F., Mc WHORTER A.C., ALLEN S.D., FARMER J.J., SAITOH Y. und FANNING G.R. (1982):

Atypical biogroups of *Escherichia coli* found in clinical specimen and description of *Escherichia hermannii* sp.

J. Clin. Microbiol. **15**, 703

BRETT K.N., RAMACHANDRAN V., HORNITZKY M.A., BETTELHEIM K.A., WALKER M.J. und DJORDJEVIC S.P. (2003):

Stx1c is the most common shiga toxin 1 subtype among shigatoxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle.

J.Clin. Microbiol. **41**, 926-936

BREUER, J. und KNIEWALLNER, K. (1985)

Vorkommen von Yersinien in Hackfleisch, Innereien, Mettwürsten und Geflügel

26. Arbeitstag. Arbeitsgeb. Lebensmittelhyg., Garmisch-Partenkirchen DVG, 30.Sept.03
Oktober 1985, 260- 266

BRITISH SHEEP AND WOOL, British Wool Marketing Board

Oak Mills, Station Rd.,

Clayton, Bradford 112pp.

BUCHER M., FREDRIKSSON-AHOMAA M. und STOLLE A. (2002):

Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Puten.

43. Arbeitstag. Arbeitsgeb. Lebensmittelhyg. vom 24.-28.09.2002 in Garmisch
Partenkirchen.

BROWN C.A., HARMON G., ZHAO G. und DOYLE M.P. (2001):

Healthy animals as carriers of STEC.

In: Verotoxigenic *Escherichia coli* ed.

DUFFY G., GARVEY P. und MCDOWELL D.A.

Food and Nutrition Press, Inc., 263-276

BUCHENAUER D. (1997a):

Schafhaltungsformen

In: SAMBRAUS H.H. und STEIGER A. : Das Buch vom Tierschutz

Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 132-133

BUCHENAUER D. (1997b):

Schafhaltungsformen

In: SAMBRAUS H.H. und STEIGER A. : Das Buch vom Tierschutz

Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 147-157

BÜLTE M., KLEIN G. und REUTER G. (1991)

Pig slaughter – Is the meat contaminated by *Yersinia enterocolitica* strains pathogenic to man?

Fleischwirtsch., **72** 1267-1270

BUNCIC S und AVERY S.M. (1997):

Escherichia coli 0157:H7 in healthy dairy cows.

N Z Vet J. **45** (2), 45-48

BURNENS A.P., FREY A. UND NICOLET J. (1996):

Association between clinical presentation, biogroups and virulence attributes of *Yersinia enterocolitica* strains in human diarrhoeal disease

Epidemiol. Infect. **116**, 27-34

BUSTIN S.A. (2000):

Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays

J. Mol. Endocrinol. **25**, 169-193

CAPRIOLI A., LUZZI I., GIANVITI A., RÜSSMANN H. und KARCH H. (1995):
Pheno-genotyping of verotoxin 2 (VT2)-producing *Escherichia coli* causing hemorrhagic colitis and hemolytic uraemic syndrome by analysis of patient's stool.
J. Med. Microbiol. **43**, 348-353.

CARNIEL E. (1995):
Chromosomal virulence factors of *Yersinia*
Contr. Microbiol. Immunol. **13**, 218-224

CHAPMAN P.A., SIDDONSON C.A., ZADIK P.M. und JEWES L. (1996):
An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157.
J. Med. Microbiol. **35**, 107-110

CLARK R.C., WILSON J.B., READ S.C., RENWICK S., RAHN K., JONSON R.P.,
ALVES D., KARMALI M.A., LIOR H., MCEWEN S.A., SPIKA J. und GYLES C.L. (1994):
Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in the food chain: preharvest and
processing perspectives.
In: KARMALI M.A. und GOGLIO A.D.
Recent advances in verotoxin-producing *Escherichia coli* infections.
Elsevier Science B.V., 17-24

CLARKE S.C., HAIGH R.D., FREESTONE P. und WILLIAMS P.H. (2003):
Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen.
Clin. Microbiol. Rev. **16**, 365-378

COOKSON A.L., TAYLOR S.C. und ATTWOOD G.T. (2006):
The prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and sheep in the lower
North Island, New Zealand.
N.Z. Vet. J. **54** (1), 28-33

CORNELIS G.R. (1998):
The *Yersinia* deadly kiss.
J. Bacteriol. **180**, Nr.21, 5495-5504

COUSINS D.V., EVANS R.J. und FRANCIS B.R. (1995):
Use of BACTEC radiometric culture method and PCR for the rapid screening of faeces
and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*.
Aust. Vet. J. **72** (12), 458-462

COVER T. und ABER R. (1989):
Yersinia enterocolitica
N. Engl. J. Med. **321**, 16-24

DAHLENBORG M., BORCH E., und RADSTRÖM P. (2001):
Development of a combined selection and enrichment PCR procedure for *Clostridium*
botulinum types B, E, and F and its use to determine prevalence in fecal samples from
slaughtered pigs.
Appl. Environ. Microbiol. **67**, 4781-4788

DEDIE K., BOCKEMÜHL J., KÜHN H., VOLKMER K.-J. und WEINKE T. (1993):
Yersinia mit enterischem Verlauf beim Mensch
Lehrbuch über bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch, Epidemiologie, Pathologie,
Klinik, Diagnostik und Bekämpfung
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 377-398

- DE KONING-WARD T.F., WARD A.C. UND ROBINS-BROWNE R.M. (1994):
Characterization of the urease-encoding gene complex of *Yersinia enterocolitica*.
Gene **145**, 25-32
- DE LOMAS J.G., SUNZERI F.J. und BUSCH M.P. (1992):
False-negative results by polymerase chain reaction due to contamination by glove powder.
Transfusion **32**, 83-85
- DELOR J. und CORNELIS G. (1992):
Role of Yst toxin in experimental infection of young rabbits.
Infect.Immun. **10**, 4268-4277
- DELOR I., KAECKENBEECK A., WAUTERS G. UND CORNELIS G.R. (1990):
Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gen encoding the heat-stabel enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic Yersiniae.
Infect. Immun. **58**, 2983-2988
- DEMKE T und ADAMS R.P. (1992):
The effect of plant polysaccharides und buffer additives on PCR.
BioTechniques **12**, 332-334
- DIMICHELE L.J. und LEWIS M.J. (1995):
Rapid, species-specific detection of lactic acid bacteria frm beer using the polymerase chain reaction.
J. Am. Brew. Chem. **51**, 63-66
- DITTRICH K. und SEUSER K.(1996):
Schaf- und Ziegenrassen, Begleitheft zur Diaserie 7161
Auswertungs- und Informationsdienst für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (aid) e.V.
- DJORDJRVIC S.P., HORNITZKY M.A., BAILEY G., GILL P., VANSELOW B., WALKER K., und BETTELHEIM K. (2001):
Virulence properties and serotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healty australian slaughter-age sheep.
J. Clin. Microbiol. **39 (5)**, 2017-2021
- DJORJEVIC S.P., RAMACHANDRAN V., BETTELHEIM K.A., VANSELOW B.A.,HOLST P., BAILEY G. und HORNITZKY M.A. (2004):
Serotypes and virulence gene profiles of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from feces of pasture-fed and lot-fed sheep.
Appl. Environ. Microbiol, **70**, 3910-3917
- DOPPELBAUER J.P. (2002):
Ziegenzucht und Ziegenhaltung in der EU und den Beitrittsländern.
Fachtagung für Ziegenzüchter und –halter in Irdning
12.-13. November 2002
- DUFFY G., GARVEY P. und MCDOWELL D.A. (2001):
Nomenclature of verocytotoxins.
In: Verocytotoxigenic *Escherichia coli*
Food and Nutrition Press, Inc . 447-452

DYLLA B.L., VETTER E.A., HUGHES J.G. und COCKERILL F.R. (1995):
Evaluation of an immunoassay for direkt detection of *Escherichia coli* 0157 in stool specimens.
J.Clin.Microbiol. **33**, 222-224

EFSA-EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2005):
The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in Euroean Union in 2005.
The EFSA Journal, 2005., 310

FAHLE G.A. und FISCHER S.H. (2000):
Comparison of six commercial DNA extraction kits for recovery of cytomegalovirus DNA from spiked human specimens.
J. Clin. Microbiol. **38**, 3860-3863

FANG G., HAMMAR S. und GRAMMET R. (1992):
A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomics DNA.
Bio Technique **13**, 52-56

FANTASIA M., MINGRONE D.M., MARTINI A., BOSCATO C. und CROTTI D. (1993):
Characterisation of *Yersinia* species isolaed from kennel and and from cattle and from pig farms.
Vet. Rec. **132**, 532-534

FAO-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS
(2006a):
ResourceSTAT,Livestock
<http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx>
download vom 05.03.2008

FAO-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS
(2006b):
ProdSTAT. Livestock primary and processed
<http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx>
download: 05.03.08

FAO-OECD-Agricultural Outlook: 2007-2016
Agrarausblick 2007
<http://www.oecd.org/dataoecd/55/53/39097524.pdf>
download: 07.08.07

FEGAN N. und DESMARCHELIER P. (1999):
Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in sheep and preslaughter lambs in eastern Australia.
Lett. Appl. Microbiol. **28**, 335-339
FENOLLAR F. und RAOULT D. (2004):
Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms.
APMIS **112**,785–807.

- FENWICK S.G., MADIE P. und WILKS C.R. (1994):
Duration of carriage and transmission of *Yersinia enterocolytica* biotyp 4 serotyp 0:3 in dogs.
Epidemiol. Infect. **113**, 471-477
- FRANK G.H., BRIGGS R.E. und SCHNEIDER R.A. (1994):
Characerisation of *Escherichia coli* isolated from the tonsils of cattle.
J. Clin. Microbiol. **32** (1), 256-258
- FRANK C. und ALPERS K. (2003):
Bericht aus der Abteilung für Infektionsepidemiol., Fachgebiet gastrointestinale Infektionen.
BfR-Wissenschaft, Seite 143-146
- FRATAMICO P.M., SACKITEY S.K., WIEDMANN M. und DENG M.J. (1995):
Detection of *Escherichia coli* 0157:H7 by multiplex PCR.
J.Clin.Microbiol. **33**, 2188-2191
- FRATAMICO P.M., BAGI L.K. UND PEPE T. (2000):
A multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection and identification of *Escherichia coli* 0157:H7 in foods and bovine feces.
J. Food Protection **63**, 1032-1037
- FREDRIKSSON-AHOMAA M., HIELM S. und KORKEALA H. (1999):
High prevalence of yadA- positive *Yersinia enterocolitica* in pig tongues and minced meat at the retail level in Finland.
J. Food. Protect., **63**, 31-35
- FREDRIKSSON-AHOMAA M., BUCHER M. und STOLLE A. (2000):
Prävalenz von *Yersinia enterocolitica* Bioerotyp 4/0:3 in Tonsillen bei Schlachtschweinen in der Region München.
41. Tagung Arbeitsgeb. Lebensmittel DVG, Garmisch-Partenkirchen, Teil 1
Vorträge, 116-122
- FREDRIKSSON-AHOMAA M., STOLLE A., und KORKEALA H. (2006):
Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections
Immuno Med Microbiol. **47**, 315-329
- FREISE J., GERARD H.C. und BUNKE T.(2001):
Optimised sample DNA preparation for detection of *Chlamydia trachomatis* in synovial tissue by polymerase chain reacion and ligase chain reacion.
Ann. Rheum. Dis. **60**, 140-145
- FRUTH A., RICHTER H., TIMM M., STRECKEL W., KLIE H., PRAGER R., REISSBRODT R., GALLIEN P., SKIEBE E., RIENÄCKER I., KARCH H., BOCKEMÜHL J., PERLBERG K.W. und TSCHÄPE H. (2000):
Zur Verbesserung der gegenwärtigen bakteriologischen Diagnostik von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC).
Bundesgesundheitsbl. **43**, 310-317
- FUKUSHIMA H, HOSHINA K, ITOWA H und GOMYODA M (1997)
Introduktion into Japan of pathogenic *Yersinia* through imported pork, beef and fowl.
Int. J. Food Microbiol., **35**, 205-212

FUNK J.A. (1998):

Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in groups of swine at slaughter.
J. Food Protect., **61**: 677-682

GALLIEN P., KLIE H., LEHMANN S., PROTZ D., HELMUTH R., SCHÄFER R. und
EHRLER M. (1994):

Detection of verotoxin-producing *E. coli* in field isolates from domestic and agricultural
animals in Sachsen-Anhalt.

Berl. Munch. Tierärztl. Wochenschr. **107** (10), 331-334,

GANNON V.P.J., KING R.K., KIM J.Y. und GOLDSTEYN T. (1992):

Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in
ground beef using the polymerase chain reaction.

Appl. Environ. Microbiol. **58**, 3809-3815

GEOFFRE`A., MEICHTRI L., MILIWEBSKY E., BASCHKIER A., CHILLEM I. G.,
ROMANO I.M., SOSA ESTANI S., CATALDI A., RODRIGUEZ R. und RIVAS M. (2002):

Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR in cattle in Argentina.

Evaluation of two procedures.

Vet. Microbiol. **87**, 301-313

GERRITSEN M.J., OLYHOEK T., SMITS M.A. und BOKHOUT B.A. (1991):

Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitative
detection of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* subtype *hardjobovis* in bovine urine.

J. Clin. Microbiol. **29**, 2805-2808

GLiPHA-Global Livestock Production and Health Atlas (2004a)

Livestock Population of sheep in the world

<http://www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp>

download: 05.03.08

GLiPHA-Global Livestock Production and Health Atlas (2004b)

Livestock Population of goats in the world

<http://www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp>

download: 05.03.08

GRANT T., BENNETT-WOOD V. UND ROBINS-BROWNE R.M. (1998):

Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of *Yersinia
enterocolitica* lacking classical virulence markers

Infect. Immun **66(3)**, 1113-1120

GRIFFIN P.M. und TAUXE R.V. (1991):

The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other
enterohaemorrhagic *E.coli*, and the associated haemolytic uremic syndrome.

Epidemiol. Rev. **13**, 60-98

GRIFFIN P.M. (1995):

Escherichia coli O157:H7 and other enterohaemorrhagic *Escherichia coli*.

In: BLASER M.J., SMITH P.D., RAVDINJ.I., GREENBERG H.B., GUERRANT R.L.:

Infections of the gastrointestinal tract.

New York: Raven Press, 739 – 761.

GYLES C. (2001):

Pathogenic aspects of VTEC-Infections in non-ruminant animals.

In: Verotoxigenic *Escherichia coli*

DUFFY G., GARVEY P. und MCDOWELL D.A.

Food and Nutrition Press, Inc., 227-240

HANCOCK D.D., BESSER T.E., KINSEL M.L., TARR P.I., RICE D.H. und PAROS M.G. (1994):

The prevalence of *Escherichia coli* 0157:H7 in dairy and beef cattle in Washington state. *Epidemiol. Infect.* **113**, 199-207

HACKER, J. und HEESEMANN, J. (2000):

Molekulare Infektionsbiologie

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin

HARING F.:

Schafzucht.

Eugen-Ulmer-Verlag, HB-Schwäbische Alb

HARNETT N., LIN Y.P. und KRISHNAN C. (1996):

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* using the multiplex polymerase reaction

Epidemiol. Infect. **117**, 59-67

HARTUNG M. (2000):

Mitteilung der Länder über *Y. enterocolitica*-Nachweise in Deutschland

Bgvv-Hefte 08/2000, 133-136

HEESEMANN J und GRÜTER L. (1987):

Genetic evidences that outer membran protein YOP 1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherences and phagocytosis resistance to human epithelial cell.

FEMS Microbiol. Lett. **40**, 105-110

HEESEMANN J. (1990):

Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische Methoden

Immun. Infekt **18**, 186-191

HILL W.E., PAYNE W.L., AULISIO C.C.G. (1983):

Detection and enumeration of virulent *Yersinia enterocolitica* in food by DNA colony hybridization

Appl. Environ. Microbiol. **46**, 636-641

HOF H und DÖRRIS R. (2002):

Medizinische Mikrobiologie.

Thieme Verlag Stuttgart, 2. Auflage

HOOGKAMP-KORSTANJE J.A.A. und DE KONING J. (1990):

Klinik, Diagnostik und Therapie von *Yersinia enterocolitica*-Infektionen

Immun. Infekt **18**, 192-197

HUSSEIN H.S. und SAKUMA T. (2005):

Prevalence of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products.

J. Dairy Sci. **88** (2), 450-465.

- IBRAHIM A., LIESACK W., PIKE S. UND STACKEBRANDT W. (1992):
The polymerase chain reaction: an epidemiological tool to differentiate between two clusters of pathogenic *Yersinia enterocolitica*
FEMS Microbiol.Lett. **97**, 63-66
- IBRAHIM A., LIESACK W., GRIFFITHS M.W. UND ROBINS-BROWNE R.M. (1997):
Development of a Highly Specific Assay for Rapid Identification of Pathogenic Strains of *Yersinia enterocolitica* Based on PCR Amplification of the *Yersinia* Heat-Stable Enterotoxin Gene (*yst*)
J. Clin. Microbiol. **35**, 1636-1638
- IRADJ A. und BARDIA A. (2006):
Haemolytic uraemic syndrom: an overview.
Nephrology **11**, 213-218
- JOHANNESSEN G.S., KAPPERUD G und KRUSE H: (2000):
Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Norwegian pork products determined by a PCR Methode and a traditional culturing methode.
Int. J. Food Microbiol., 54, 75-80
- JOHNSON R.P., CLARKE R.C., WILSON J.B., READ S.C., RAHN K., RENWICK S.A., SANDHU K.A., ALVES D., KARMALLI M.A., LIOR H., MCEWEN S.A., SPIKA J.S. und GYLES C.L. (1996):
Growing concerns and recent outbreaks involving non-0157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*.
J. Food Prot. **59**, 1112-1122
- JOURDAN A.D., JOHNSON S.C. UND WESLEY I.V. (2000):
Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the *ail* gene of pathogenic *Yersinia enterocolitica*
Appl. Environ. Microbiol. **66**, 3750-3755
- KAPPERUD G. (1991):
Yersinia enterocolitica in food hygiene
Int. J. Food Microbiol. **12**, 53-66
- KAPPERUD G. und BERGAN 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
- KARCH A., und BOCKEMÜHL J. (1989):
Infektionen durch enterohämorrhagische *E.coli* (EHEC): ein klinisches und mikrobiologisches Problem und eine Herausforderung für den öffentlichen Gesundheitsdienst.
Immun. Infekt. **17**, 206-211
- KARCH H., SCHMIDT H. und SCHWARZKOPF A. (1996):
Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC).
Die gelben Hefte **36**, 125-135

- KARCH H., SCHMIDT H. und BRUNDER W. (1998):
Plasmid encoded determinants in *Escherichia coli* 0157:H7.
In *Escherichia coli* 0157:H7 and other Shiga Toxin-producing *E.coli* Strains
Aus: Kaper J.B. and O'Brien, A.D.
ASM Press, 183-184.
- KARCH H., BOCKEMÜHL J. und HUPPERTZ H. (2000):
Erkrankungen durch enterohämorrhagische *E.coli* (EHEC).
Dt. Ärzteblatt 97 (36), 2314-2318
- KECHAGIA N., NICOLAOU C., IOANNIDOU V., KOURTI E., IOANNIDIS A., LEGAKIS
N.J. und CHATZIPANAGIOTOU S. (2007):
Detection of chromosomal and plasmid-encoded virulence determinants in *Yersinia
enterocolitica* and other *Yersinia* spp. isolated from food animals.
Int. J. of Food Microbiol. 118, 326-331
- KONOWALCHUK J., SPEIRS J.L., STAVRIC S. (1977)
Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*.
Infection and Immunity 18, 775-779
- KORTE T., FREDRIKSSON-AHOMAA M., NISKANEN T. und KORKEALA H. (2004):
Low prevalence of *yadA*-positive *Yersinia enterocolitica* in sows.
Foodborne Patho. Dis. 1 (1), 45-52
- KROGSTAD O., TEIGE J. JR. und LASSEN J. (1972)
Yersinia enterocolitica type 2 associated with disease in goat.
Acta Vet. Scand. 4, 594-596
- KUGLER R., BUSCH U., BAYER M., GERBER L., HELLEIN G., BARANKAY. und
HUBER H.C. (1998):
Vergleich von ELISA, Verozelltest, PCR und Immunomagnetischer Separation (IMS) in
der Diagnostik von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Stuhlproben.
Bundesgesundheitsbl., Sonderheft Oktober 1998, 13-19
- KWAGA J., IVERSEN J.O. UND MISRA V. (1992):
Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by Polymerase Chain Reaction and
Digoxigenin-Labeled Polynucleotide Probes
J. Clin. Microbiol. 30, 2668-2673
- LANADA E.B., MORRIS R.S., JACKSON R. und FENWICK S.G. (2005):
Prevalence of *Yersinia* species in goat flocks.
Aust. Vet. J. 83 (9), 563-566
- LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT, SACHSEN (2004):
Wirtschaftlichkeit der Milchschaft- und Ziegenhaltung, Ergebnisse der
Betriebszweigabrechnungen.
[www. LANDWIRTSCHAFT.SACHSEN.DE/LFL](http://www.LANDWIRTSCHAFT.SACHSEN.DE/LFL)
- LANTZ P.-G., MATSSON M., WADSTRÖM T. UND RADSTRÖM P. (1997):
Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous
two-phase system for sample preparation prior to PCR
J. Microbiol. Methods 28, 159-167

LANTZ P.G. (1998a):

PCR-based detection of microorganisms in complex biological samples
Dep. Appl. Microbiol., Lund University, Sweden

LANTZ P.G., KNUTSSON R., BLIXT Y., AL-SOUD W.A., BORCH E. UND RADSTRÖM P. (1998b):

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a multiplex PCR: a study of sample preparation and PCR-inhibitory components
Int. J. Food Microbiol. **45**, 93-105.

LANTZ P.G., ABU AL-SOUD W., KNUTSSON R., HAHN-HÄGERDAL B., UND RADSTROM P. (2000):

Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples
Biotech. Annual Rev. **5**, 87-130

LEJEUNE J., HANCOCK D., WASTESON Y., SKJERVE E. Und URDAHL A.M. (2006):

Comparison of E.coli 0157 and Shiga toxin-encoding genes (stx) prevalence between Ohio, USA and Norwegian dairy cattle.
Inter. J. of Food Microbiol. **109**, 19-24

LEVIN, M.M (1987):

Escherichia coli that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent
J. Infect. Dis., **155**, 377-389

LFL SACHSEN: Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft (2004):

Wie wirtschaftlich ist die Milchziegenhaltung in SN?

www.Landwirtschaft.Sachsen.de/lfl

download: 10.01.08

LINGWOOD C.A. (2003):

Shiga toxin receptor glycolipid binding. Pathology an utility.

In: PHILLIPOTT D. und EBEL F. (eds): E.coli, Shigatoxin methods and protocol.
Human Press Totowa, New Jersey, 165-186

LOUISE C.B. und OBRIG T.G. (1995):

Specific interaction of *Escherichia coli* 0157:H7-derived Shiga-like toxin with human renal endothelial cells.

J. Infect. Dis. **172**, 1397-1401

MACKAY I.M. (2004):

Real-time PCR in the microbiology laboratory

Clin. Microbiol. Infect. **10**, 190-212

MAINIL J G. (1999):

Shiga/verotoxigenes and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals.

Vet. Res. 30 (2), 235-257

MAINIL J.G. und DAUBE G. (2005):

Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans, and food: who is who?

J. Appl. Microbiol. **98** (6), 1332-1344

MARUYAMA T. (1987)

Yersinia enterocolitica infections in humans and isolation of the mikroorganism from pigs in Japan.

Contrib. Microbiol. Immunol. **9**, 48-55

MASON I.L. (1996):

A World Dictionary of Livestock Breeds, Types and Varieties. Fourth Edition.

C.A.B. International, Seite: 273

MC KILLIP J. und DRAKE M. (2004):

Real-Time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food

J. Food Protect. **67**, 823-832

MC NALLY A., CHEASTY T., FEARNLEY C., DALZIEL R.W., PAIBA G.A., MANNING G. und NEWELL D.G. (2004):

Comparisons of the biotypes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs, cattle and sheep at slaughter and from humans with yersiniosis in Great Britain during 1999-2000.

Letters in Appl. Microbiol. **39**, 103-108

MC PHERSON M.J. und MOLLER S.G. (2000):

Analysis, sequencing and in vitro expression of PCR products

In: PCR

Springer Verlag, New York, 169-174

MELTON-CELSA A.R. und O`BRION A.D. (1998):

Structure, biology and reactice toxicity of Shigat toxin family members for cells and animals.

In: *Escherichia coli* 0157:H7 and other Shigatoxin-producing *E. coli*

Von: KAPER J.B. und O`BRIAN A.D.

ASM-Press, S. 121-128

MERHEJ V., ADEKAMBI T., PAGNIER I., RAOULT D und DRANCOURT M. (2008):

Yersinia massiliensis sp. nov. isolated from fresh water.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**, 779-784

MERTZ A., BATSFORD S., CURSCHELLAS E., KIST J.M. und GONDOLF K.B. (1991):

Cationic *Yersinia* antigen-induced chronicallergic arthritis in rats. A model for reactive arthritis in humans.

J. Clin. Invest. **88**, 632-642

MILNES A.S., STEWART I., CLIFTON-HADLEY F.A., DAVIES R.H., NEWELL D.G., SAYERS A.R., CHEASTY T., CASSAR C., RIDLEY R., COOK A.J.C., EVANS S.J., TEALE C.J., SMITH R.P., MCNALLY A., TOSZEGHY M., FUTTER R., KAY A. und PAIBA G.A. (2007):

Intestinal carriage of verotoxigenic *Escherichia coli* 0157, *Salmonella*, thermophylic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003.

Epidemiol Infect. 1-13

MOLLARET H. (1976):

Contribution à l'étude épidémiologique des infections à *Yersinia enterocolitica*.

Med. Malad. Infect., **6**, 442-448

- MOLLARET H., BERCOVIER H. und ALONSO J. (1979):
Summary of the data received at the Reference Center for *Yersinia enterocolitica*
Contr. Microbiol. Immunol., **5**, 174-184
- MONTEIRO L., BONNEMAISON D., VEKRIS A., PETRY K.G., BONNET J., VIDAL R.,
CABRITA J. UND MEGRAUD F. (1997):
COMPLEX POLYSACCHARIDES AS PCR INHIBITORS IN FECES: *HELICOBACTER*
PYLORI MODEL.
J.KLIN.MIKROBIOL. **35**, 995-998
- MORAND-FEHR P. UND BOYAZOGLU J. (1999):
PRESENT STATE AND FUTURE OUTLOOK OF THE SMALL RUMINANT SECTOR.
SMALL RUMINANT RESEARCH **34**, 175-188
- NAKAJIMA H., INOUE M., MORI T., ITOH K.-I., ARAKAWA E., WATANABE H. (1992):
Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia*
enterocolitica by an improved polymerase chain reaction method
J. Clin. Microbiol. **30**, 2484-2486
- NAKTIN J. und BEAVIS K. G. (1999):
Yersinia enterocolitica and *Yersinia pseudotuberculosis*.
Clin. Lab. Med. **19**, Nr. 3. 523-536
- NATARO J. P. und KAPER J.B. (1998):
Diarrheagenic *Escherichia coli*
Clin. Microbiol. Rev., **11**, 142-201
- NATTERMANN H. HORSCH F., SEEGER M., DEE W., SCHLINGMANN G. UND
SCHLINGMANN H. (1985):
Epizootiologie der *Yersinia enterocolitica* Infektion in einem Schweinebestand
Mh. Vet. Med. **40**, 366-370
- NATTERMANN H., DEDEK J. und LOEPELMANN H. (1986a):
Serologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* beim
Schwarzwild
Mh. Vet. Med., **41**, 565-567
- NATTERMANN H., HORSCH F., DEE W. UND ORTMANN G. (1986b):
Die *Yersinia enterocolitica* Infektion bei landwirtschaftlichen Nutztieren
Mh. Vet. Med. **41**, 23-26
- NECHVATAL J.M., RAM J.L., BASSON M.D., NAMPRACHAN P., NIEC S.R., BADSHA
K.Z., MATHERLY L.H., MAJUMDAR A.P. und KATO I. (2008):
Fecal collection, ambient preservation and DNA extraction for PCR amplification of
bacterial and human markers from human feces.
J. Microbiol. Methods **72**, 124-132
- NEUBAUER H., HENSEL A., ALEKSIC S. und MEYER H. (2000a):
Identification of *Yersinia enterocolitica* within the genus *Yersinia*
System. Appl. Microbiol. **23**, 58-62

NEUBAUER H., MOLITOR M., RAHALISON L., ALEKSIC S., BACKES H., CHANTEAU S. UND MEYER H. (2000b):
A miniaturised semiautomated system for the identification of *Yersinia* species within the genus *Yersinia*
Clin. Lab. **46**, 561-567

NEUBAUER H., SPRAGUE L.D., SCHOLZ H. UND HENSEL A. (2001):
Die Diagnostik der *Yersinia enterocolitica*-Infektionen: Eine Übersicht über klassische Nachweistechiken und neue molekularbiologische Methoden
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **114**, 1-7

Niederösterreichischer Landeszuchtverband für Schafe und Ziegen (2007):
Schafzucht
[http://www.schaf- und ziege.at/index.php?id=65](http://www.schaf-undziege.at/index.php?id=65)
download: 10.03.08

NIKOLAOU K., HENSEL A., BARTLING C., TOMASO H., ARNOLD T., RÖSLER U., GANTER M., PETRY T. und NEUBAUER H. (2005):
Prevalence of Anti-*Yersinia* outer protein antibodies in goats in Lower Saxony.
J.Vet.Med. **52**, 1-17

NILSSON A., LAMBERTZ S.T., STALHANDSKE P., NORBERG P. UND DANIELSSON-THAM M.-L. (1998):
Detection of *Yersinia enterocolitica* in food by PCR amplification
Letters Appl. Microbiol. **28**, 140-144

OLCÉN P., LANZ P.G., BÄCKMAN A., und RÅDSTRÖM P. (1995):
Rapid diagnosis of bacterial meningitis by a seminested PCR strategy.
Scand. J. Infect. Dis. **27**, 537-539

OLSEN J.J., AABO S., HILL W. NOTERMANN S., WERNARS K., GRANUM P.E., POPOVIC T., RASMUSSEN H.N. UND OLSVIK Ö. (1995):
Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens
Int. J. Food Microbiol. **28**, 1-78

ONAN G.:
Animal and Food Science Department, University of Wisconsin
River Falls, River Falls WI.

OSEK J. (2002):
Rapid and specific identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in faeces by multiplex-PCR.
Letters in Applied Microbiol. **34**, 304-310

OSTROFF S.M., TARR P.I., NEILL M.A., LEWIS J.H., HAGRETT-BEAN N. und KOBAYASHI J.M. (1998):
Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequela in *Escherichia coli* O157:H7 infections.
J. Infect. Dis. **160** (6), 994-998

OSU-Oklahoma State University (1995):

Breeds of livestock/sheep

<http://www.ansi.okstate.edu/breeds/sheep/>

download: 10.03.08

PAL C.H., MORSE V. und SEEMAYER T.A. (1980):

Experimental *Yersinia enterocolitica*-enteritis in rabbits.

Infect. Immun., 28 238

PELAGALLI G.V., LANGELLA M. und COLELLA G. (1983):

The palatine tonsil of the ox *Bos Taurus* and buffalo *Bubalus buffulus*.

Anat. Histol. Embryol. **12**, 253-265

PHILBEY A.W., GLASTONBURY J.R., LINKS I.J. und MATTHEWS L.M. (1991):

Yersinia species isolated from sheep with enterocolitis.

Aust. Vet. J. **68 (3)**, 108-110

PIERSON D. und FALKOW S. (1990):

Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional inv-homologous sequences

Infect. Immun. **58**, 1059-1064

PRAGER R., ANNEMÜLLER S. und TSCHÄPE H. (2005):

Diversity of virulence patterns among shiga toxin producing *Escherichia coli* from human clinical cases-need for more detailed diagnostics.

Int.J. Med. Microbiol **295**, 429-438

PUTZKER M., SAUER H., und SOBE D. (2001):

Plague and other human infections caused by *Yersinia* species.

Clin. Lab. **47**, Nr. 9-10, 453-466

QUANTRELL R.J., NAYLOR S.W., ROE A.J., SPEARS K. und GALLY D.L. (2004):

EHEC 0157:H7 – getting to the bottom of the burger bug.

Microbiol. Today **31**, 127-128

RADSTÖM P., KNUTSSON R., WOLFFS P., LÖVENKLEV M. und LÖFSTRÖM C. (2004):

Pre-PCR-Processing

Mol. Biotech. **26**,133-146

RAMACHANDRAN V., HORNITZKY M.A., BETTELHEIM K.A., WALKER M.J. und DJORDJEVIC S.P. (2001):

The common ovine shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx2d toxin type.

J. Clin. Microbiol. **39**, 1932-1937

REY J., BLANKO J.E., BLANCO M., MORA A., DAHBI G., ALONSO J. M., HERMOSO M., HERMOSO J., ALONSO M.P., USERA M.A., GONZALEZ E.A., BERNARDEZ M.I. und BLANCO J. (2003):

Serotypes, phage types and virulence genes of shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain.

Vet. Microbiol. **24,94 (1)**,47-56

RILEY L.W., REMIS R.S., HELGERSON S.D., MCGEE H.B., WELLS J.G., DAVIS B.R., HERBERT R.J., OLCOTT E. S., JOHNSON L.M., HARGRETT N.T., BLAKE P.A. und COHEN M.L. (1983):
Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotyp.
N. Engl. J. Med. **308**, 681-685

RKI-ROBERT KOCH INSTITUT (2002):
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002

RKI-ROBERT KOCH INSTITUT (2006):
Bakterielle gastrointestinale Infektionen in Deutschland 2005
Epidemiol. Bulletin **41**, 355-356

ROETHER D. (2003):
Der Markt für Fleisch und Milch von Schafen und Ziegen sowie für die daraus hergestellten Produkte.
Diplomarbeit zur Erlangung des Grades eines Diplom-
Ernährungswissenschaftlers, Weimar.

ROLFS A., SCHULLER I., FINCK U. und WEBER-ROLFS I. (1992):
PCR: Clinical diagnostic and research.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1-10 und 53-57

ROLLE M. und MAYR A. (1993):
Allgemeine Infektions- und Seuchenlehre – Unspezifische und antigenspezifische körpereigene Abwehr.
In: MAYR A (1993):
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre (6. Auflage) 53-83
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1993, Germany

SAMBRAUS H.H. (1993):
Nutztiere.
Kosmos Naturführer, 67

SANDVIG K. und VAN DEURS B. (1994):
Endocytosis and intracellular sorting of ricin and Shiga toxin.
FEBS Lett. **346**, 99-102

SANGER J.M., CHANG R., ASHTON F., KAPER J.B. und SANGER J.W (1996):
Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surface of infected cells.
Cell Motil. Cytoskeleton **34**, 279-287

SAVARINO S.J., MC VEIGH A., WATSON J., MOLINA J., CRAVIATO A., ECHEVERRIA P., BHAN M. K., LEVIN M.M. und FASANO A. (1996):
Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*.
J.Infect.Dis. **173**, 1019-1022

SCHIAMANN 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. (1989):
Yersinia enterocolitica and *Yersinia pseudotuberculosis*
In: DOYLE M.P. (Hrsg): Foodborne Bacterial Pathogens
Marcel Dekker, New York, 601-672
- SCHMIDT H.L., BEUTIN L. und KARCH H. (1995):
Molecular analysis of the plasmid encoded hemolysin of *Escherichia coli* 0157:H7 strain EDL 933.
Infect. Immun. **63**, 1055-1061
- SCHÜTZ B., HACK B., KEINER K., ZIMMERMANN K. und RUSCH V. (1993):
Multiprimer PCR als Screening-Verfahren zum Nachweis der Toxingene LT1, ST1, VT1 und VT2 bei *E. coli*-Pathotypen.
Lab med **17**, 496-501
- SCHWÄGELE F. (1999):
Polymerase Chain Reaction-PCR, Möglichkeiten und Grenzen der Anwendung in der Lebensmittelanalytik
Fleischwirtschaft **1**, 121-123
- SHAMES B., FOX J.G., DEWHIRST F., YAN L., SHEN Z. und TAYLOR N.S. (1995):
Identification of widespread *Helicobacter hepaticus* infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay.
J. Klin. Microbiol. **33**, 2968-2972
- SIEBERT P.D. und LARRICK J.W. (1993):
PCR MIMICS: Competitive DNA fragments for use as internal standards in qualitative PCR.
Bio Techniques **14**, 244-249
- SKURNIK M., BATSFORD S., MERTZ A., SCHLITZ E., TOIVANEN P. (1993).
THE PUTATIVE ARTHRITOGENIC CATIONIC 19 KILDALTON ANTIGEN OF
YERSINIA ENTEROCOLITICA IS A UREASE B-SUBUNIT
INFECT. IMMUN., **61**, 2498- 2504
- SLEE J.K. UND SKILBECK N.W. (1992):
EPIDEMIOLOGY OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* AND *Y. ENTEROCOLITICA*
INFECTIONS IN SHEEP IN AUSTRALIA.
J. CLIN. MICROBIOL. **30** (3), 712-715
- SPRAGUE L.D., SCHOLZ H.C., AMANN S., BUSSE H.J., NEUBAUER H. (2008):
YERSINIA SIMILIS SP. NOV.
INT.J. SYST. EVOL. MICROBIOL., **58**, 952-958
- STARBUCK M.A., HILL P.J. UND STEWART G.S. (1992):
ULTRA SENSITIVE DETECTION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN MILK BY THE
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR).
LETT. APPL. MICROBIOL **15**, 248-252

STMLF, STAATSMINISTERIUM FÜR LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN, BAYERN
(2006):
SCHAF UND ZIEGENZUCHT UND-HALTUNG
http://www.stmlf.bayer.de/landwirtschaft/tier/linkurl_1_7.pdf
DOWNLOAD: 06.03.08

ST.PIERRE B.S., NEUSTOCK P., SCHRAMM U., KIRCHNER H. und BEIN G. (1994):
Seasonal breakdown of Polymerase chain reaktion.
Lancet **343**,673

STREYER L. (1996):
Der molekulare Bauplan des Lebens – die Erforschung der Gene
In: STREYER L. (1999): Biochemie (1. korrigierter Nachdruck 1999 der 4.Auflage 1996)
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Oxford, Berlin, 123-152

STRITTMATTER K., FISCHER A., KAULFUSS K.H., NITTER G. und PULS H. (2003a):
Schafzucht
Ulmer Verlag, Stuttgart, Seite 11

STRITTMATTER K., FISCHER A., KAULFUSS K.H., NITTER G. und PULS H. (2003b):
Schafzucht
Ulmer Verlag, Stuttgart, Seite 12

STROBEL E., HEESEMANN J., MAYER G., PETERS J., MÜLLER-WEIHRICH S. UND
EMMERLING P. (2000):
Bacteriological and serological findings in a further case of transfusion-mediated *Yersinia
enterocolitica* sepsis
J. Clin. Microbiol. **38**, 2788-2790

TEBBE C.C. und VAHJEN W. (1993):
Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and
transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast.
Appl. Environ. Microbiol. **59**, 2657-2665

TENNANT S.M., SKINNER N.A., JOE A., ROBINS-BROWNE R.M. (2003):
Yersinia enterocolitica biotype A: not as harmless as you think
Advan.Experim. Med. Biol. **529**, 125-128

THORBE C.M., RITCHIE J.M. und ACHESON D.W. (2002):
Enterohemorrhagic and other shigatoxin-producing *Escherichia coli*.
In: *Escherichia coli*: Virulence Mechanism of a Versatile Pathogen
DONNENBERG M.S.
Academic Press 119-154

THORNTON C. und PASSEN S. (2004):
Inhibition of PCR Amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimen
with phytase to reduce inhibition.
J. Clin.Microbiol. Methods **59**, 43-52

TSCHÄPE H. und FRUTH A. (2001):
In: Mühldorfer I. and Schäfer H. (eds.)
Emerging pathogens.
Karger Verlag, Zürich

URDAHL A.M., BEUTIN L., SKJERVE E. und WASTESON Y. (2001):
Shiga toxin genes (stx) in Norwegian sheep herds.
Epidemiol.Infect. **127** (1), 129-134

URDAHL A.M., BEUTIN L., SKJERVE E. und WASTESON Y. (2002):
Serotypes and virulence factors of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy Norwegian sheep.
J. of Appl. Microbiol. **93**,1026-1033

VAN DER GIESSEN J.W., EGER A., HAAGSMA J., HARING R.M., GAASTRA W. und VAN DER ZEIJST W. (1992):
Amplification of 16S rRNA sequences to detect *Mycobacterium paratuberculosis*.
J.Med. Microbiol. **36**, 255-263

VAN NOYEN R., VANDERPITTE J., WAUTERS G. (1980):
Non-value of cold enrichment of stools for the isolation of *Yersinia enterocolitica* serotypes 0:3 and 0:9 from patients.
J.Clin. Microbiol. **11**,127-131

VARY P.H., ANDERSEN P.R., GREEN E., HERMON-TAYLOR J. und MACFADDEN J.J. (1990):
Use of high specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in John's disease.
J. Clin. Microbiol. **28**, 933-937

WALLACE J.S., CHEASTY T. und JONES K. (1997):
Isolation of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* 0157 from wild birds.
J. Applied. Microbiol. **82**, 399-404

WANI S.A., SAMANTA I., BHAT M.A. und NISHIKAWA Y. (2004):
Investigation of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in avian species in India.
Let. Appl. Microbiol. **39** (5), 389-394

WATSON R.J. und BLACKWELL B. (2000):
Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction.
Can. J. Microbiol. **46**, 633-642

WAUTERS G. (1981):
Antigens of *Yersinia enterocolitica*
In: Botton E.J. (Hrsg.), *Yersinia enterocolitica*
CRC Press inc., Boca Raton, Florida, 42-52

WAUTERS G, KONDOLO K und JANSSENS M (1987):
Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*
Contrib. Microbiol. Immunol., **9**, 14-21

WAUTERS G., GOOSSENS V., JANSSENS M. UND WANDEPITTE J. (1988):
New enrichment method for isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 from pork.
Appl. Environ. Microbiol. 1988, 851-854

- WEBER A. und LEMBKE C. (1981):
Untersuchungen zum Vorkommen von humanpathogenen *Yersinia enterocolitica* bei Katzen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **94**, 325-327
- WEBER A., (1985):
Welche Rolle spielen Hunde und Katzen im Zusammenhang mit *Yersinia enterocolitica*-Infektionen des Menschen?
Öff. Gesundheitswesen, **47**, 111-113
- WIELER L.H., BAUERFEIND R. und BALJER G. (1992):
Characterisation of shigatoxin-producing *E. coli* (STEC) isolated from calves with and without diarrhoea.
Zentralbl. Bakteriol. **276**, 243-253
- WILSON M.W. UND BETTELHEIM K.A. (1980):
CYTOTOXIC ESCHERICHIA COLI SEROTYPES.
THE LANCET **I**, 201
- WILSON I.G. (1997):
Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification
Appl. Environ. Microbiol. **63**, 3741-3751
- WILSON I.G., GILMOUR A. UND COOPER J.E. (1993):
Detection of enterotoxigenic microorganisms in food by PCR
In: KROLL R.G., GILMOUR A., SUSSMAN M. (Hrsg.): New techniques in food and beverage microbiology
Scientific Publishers, Blackwell Oxford, United Kingdom
- WITTWER C.T., HERRMANN, M.G., GUNDRY C.N. UND ELENITOBA-JOHNSON K.S.J. (2001):
Real-Time Multiplex PCR Assays
Methods **25**, 430-442
- WUTHE H.-H. und ALEKSIC S. (1997)
Yersinia enterocolitica Serovar 2a, 2b, 3:b,c Biovar 5 bei Infektionen von Feldhase und Schaf.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., **110**, 176-177
- ZADIC P.M., CHAPMAN P.A. und SIDDONS C.A. (1993):
Use of tellurit for the selection of verotoxigenic *Escherichia coli* 0157.
J. Med. Mikrobiol. **39**, 155-158
- ZINK D.L., FEELEY J.C., WELLS J.G., VANDERZANT C., VICKERY H.C., ROOF W.C. und O` DONOVAN G.A. (1980)
Plasmid-mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica*.
Nature **238**, 224-226
- ZMP ZENTRALE MARKT-UND PREISBERICHTSSTELLE (2006a):
Schaf- und Ziegenbestand in Europa und in wichtigen Überseeländern
ZMP Vieh und Fleisch; Deutschland, Europäische Union, Weltmarkt **2007**, 160

ZMP ZENTRALE MARKT-UND PREISBERICHTSSTELLE (2006b):
Erzeugung von Schaffleisch auf dem Wendepunkt
ZMP Vieh und Fleisch; Deutschland, Europäische Union, Weltmarkt **2006**, 159-160

ZMP ZENTRALE MARKT-UND PREISBERICHTSSTELLE (2006b):
Bestandsabbau bringt Rekordschlachtungen, Preise dennoch auf hohem Niveau
ZMP Vieh und Fleisch; Deutschland, Europäische Union, Weltmarkt **2006**, 93

ZMP ZENTRALE MARKT UND PREISBERICHTSSTELLE (2007):
Bruttoeigenerzeugung von Schaf und Ziegenfleisch
ZMP Agrarmärkte in Zahlen 2006-Europäische Union **2007**, 121-125
ZMP ZENTRALE MARKT-UND PREISBERICHTSSTELLE (2007b):
Erzeugung auf Talfahrt
ZMP Markt Analyse **9**

ZSCHÖCK M., HAMANN H.P., KLOPPERT B. und WOLTER W. (2000):
Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats:
Prevalence and virulence properties.
Lett. Appl. Microbiol. **31**,203-208

ZWEIFELC., ZYCHOWSKA M.A., und STEPHAN R. (2004a):
Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonelle*
spp. And *Campylobacter* spp. Isolated from slaughtered sheep in Switzerland.
Int J. Food Microbiol. **92**(1), 45-53

ZWEIFEL C., SCHUMACHER S., BLANCO M., BLANCO J.E., TASARA T. und
STEPHAN R. (2004b):
Phenotypic and genotypic characteristics of non-0157 Shigatoxin-producing *Escherichia*
coli (STEC) from Swiss cattle.
J.Vet. Microbiol. **105** (1), 37-45