

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

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

**Entwicklung eines kombinierten Verfahrens zum Nachweis von pathogenen
Yersinia enterocolitica in Schweinefleisch mittels Real-Time PCR und
Kolonie-DNA-Hybridisierung**

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

von
Sarah Nicole Prohaska
aus Bietigheim-Bissingen

München 2009

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Stolle
Korreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Matis

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	8
EINLEITUNG.....	12
LITERATUR.....	14
1 <i>Yersinia enterocolitica</i>	14
1.1 Taxonomie und Eigenschaften	14
1.2 Pathogenitätsfaktoren.....	16
1.3 <i>Y. enterocolitica</i> -Infektionen	19
1.4 Vorkommen in Lebensmitteln	21
2 Nachweismethoden für <i>Y. enterocolitica</i>	23
2.1 Klassische kulturelle Nachweismethoden.....	23
2.2 Molekularbiologische Nachweismethoden.....	27
2.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	27
2.2.1.1 Kontrollen.....	33
2.2.1.2 Probenvorbereitung	39
2.2.1.3 Zielgene zum Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i>	41
2.2.2 Kolonie-DNA-Hybridisierung	43
3 Validierung mikrobiologischer Verfahren	46
3.1 DIN EN ISO 16140:2003	46
3.2 Schweizerische Akkreditierungsstelle (SAS).....	49
EIGENE UNTERSUCHUNGEN	53
4 Allgemeiner Versuchsaufbau.....	53
5 Probenmaterial und Bakterienstämme	53
6 Methoden.....	54
6.1 Erster Teil: Vorversuche zur Real-Time PCR.....	54
6.1.1 Vorversuche mit SYBR Green	54
6.1.2 Vorversuche mit der TaqMan Sonde	56
6.1.3 Konstruktion einer IAC für die TaqMan PCR	58
6.2 Zweiter Teil: Vorversuche zur Kolonie-DNA-Hybridisierung.....	62
6.2.1 Herstellung der mit Digoxigenin markierten Hybridisierungssonde.....	62
6.2.2 Ermittlung des optimalen Anreicherungsmediums	64
6.3 Dritter Teil: In house-Validierung des Verfahrens	66
6.3.1 Inklusivität und Exklusivität der Real-Time PCR	66
6.3.2 Inklusivität und Exklusivität der Kolonie-DNA-Hybridisierung	71

6.3.3	Bestimmung der Nachweisgrenzen und Verfahrensvergleich	72
6.3.3.1	Einwaage und Erstansatz mit Beimpfung	73
6.3.3.2	Nachweisgrenze der Real-Time PCR	73
6.3.3.3	Nachweisgrenze der Kolonie-DNA-Hybridisierung	74
6.3.3.4	Nachweisgrenze des kulturellen Verfahrens nach KNÖDL (2008)	74
6.4	Vierter Teil: Verfahrensdiagramm	75
6.5	Fünfter Teil: Untersuchung der Schweinefleischproben	75
ERGEBNISSE		76
7	Erster Teil: Vorversuche zur Real-Time PCR	76
7.1	Vorversuche mit SYBR Green	76
7.2	Vorversuche mit der TaqMan Sonde	78
7.3	Konstruktion einer IAC für die TaqMan PCR	79
8	Zweiter Teil: Vorversuche zur Kolonie-DNA-Hybridisierung	81
8.1	Herstellung der mit Digoxigenin markierten Hybridisierungssonde	81
8.2	Ermittlung des optimalen Anreicherungsmediums	82
9	Dritter Teil: In house-Validierung des Verfahrens	83
9.1	Inklusivität und Exklusivität der Real-Time PCR	83
9.2	Inklusivität und Exklusivität der Kolonie-DNA-Hybridisierung	85
9.3	Ergebnis der Nachweisgrenzen	85
9.3.1	Nachweisgrenze der Real-Time PCR	86
9.3.2	Nachweisgrenze der Kolonie-DNA-Hybridisierung	86
9.3.3	Nachweisgrenze des kulturellen Verfahrens nach KNÖDL (2008)	88
9.4	Ergebnis des Verfahrensvergleiches	89
9.4.1	Vergleich der Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens mit dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008)	90
9.4.2	Vergleich des eigenen Verfahrens mit dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008) in Bezug auf die inokulierten bzw. nicht-inokulierten Proben	92
10	Vierter Teil: Verfahrensdiagramm	94
11	Fünfter Teil: Ergebnisse der Untersuchung der Schweinefleischproben	103
11.1	Ergebnisse des Real-Time PCR Screenings	103
11.2	Ergebnisse des kulturellen Nachweises mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung	103
11.3	Ergebnisse des Real-Time PCR Screenings und des kulturellen Nachweises im Vergleich	106

DISKUSSION	108
12 Erster Teil: Vorversuche zur Real-Time PCR.....	109
12.1 Vorversuche mit SYBR Green	109
12.2 Vorversuche mit der TaqMan Sonde	109
12.3 Konstruktion einer IAC für die TaqMan PCR.....	109
13 Zweiter Teil: Vorversuche zur Kolonie-DNA-Hybridisierung.....	110
13.1 Herstellung der mit Digoxigenin markierten Hybridisierungssonde	110
13.2 Ermittlung des optimalen Anreicherungsmediums	111
14 Dritter Teil: In house-Validierung des Verfahrens	112
14.1 Inklusivität und Exklusivität der Real-Time PCR.....	113
14.2 Inklusivität und Exklusivität der Kolonie-DNA-Hybridisierung.....	114
14.3 Nachweisgrenze der Real-Time PCR.....	114
14.4 Nachweisgrenze der Kolonie-DNA-Hybridisierung	115
14.5 Nachweisgrenze des kulturellen Verfahrens nach KNÖDL (2008).....	116
14.6 Vergleichsuntersuchung	117
14.6.1 Vergleich der Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens mit dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008)	117
14.6.2 Vergleich des eigenen Verfahrens mit dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008) in Bezug auf die inokulierten bzw. nicht-inokulierten Proben.....	118
15 Vierter Teil: Verfahrensdigramm	120
16 Fünfter Teil: Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> im Schweinefleisch	122
16.1 Real-Time PCR Screening	122
16.2 Kultureller Nachweis mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung.....	124
16.3 Vergleich des Real-Time PCR Screenings und des kulturellen Nachweises	126
ZUSAMMENFASSUNG	128
SUMMARY	130
ANHANG.....	132
17 Tabellarische Übersicht der untersuchten Proben	132
18 Mikroorganismenstämme	135
19 Nährmedien	136
19.1 Flüssige Medien	136
19.2 Feste Medien	138

20	Reagenzien und Chemikalien.....	141
20.1	Allgemein	141
20.2	Real-Time PCR	142
20.3	Kolonie-DNA-Hybridisierung.....	143
21	Geräte und Laborbedarf	147
21.1	Allgemein	147
21.2	Real-Time PCR	149
21.3	Kolonie-DNA-Hybridisierung.....	149
LITERATURVERZEICHNIS		151
ABBILDUNGSVERZEICHNIS		175
TABELLENVERZEICHNIS		176
DANKSAGUNG		178

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Ail, <i>ail</i>	Attachment invasion locus
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
a_w	activity of water, Wasseraktivität
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton
cfu	colony forming units
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
cm	Zentimeter
C_t	Threshold Cycle
CVUA KA	Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxynukleosidtriphosphate
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EAC	externe Amplifikationskontrolle
EFSA	European Food Safety Authority, Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EN	Europäische Norm
et al.	et alli
FAM	6-Carboxyfluorescein
FP	Fertigpackung
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanin

g	Gramm
h	Stunde
IAC	interne Amplifikationskontrolle
Inv	Invasin
<i>inv</i>	invasion
ISO	International Organization for Standardization
ITC	Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat
JOE	6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein
kb	Kilobase
KbE	Koloniebildende Einheiten
kDA	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch)
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LUA	Landesuntersuchungsamt für Chemie, Hygiene und Veterinärmedizin
lux	light upon extension
M	Molar (mol/l)
mAU	milliAnson Unit
mg	Milligramm
MgCL ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NBT	4-Nitro-blue-tetrazolium-chloride
NCTC	National Collection of Type Cultures
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
n.m.	nicht messbar
NMKL	Nordic Committee on Food Analysis, Nordisches Komitee für Lebensmitteluntersuchung
Nr.	Nummer
NTC	No Template Control
O-Antigene	Oberflächenantigene
OW	offene Ware
PC	Plate-Count

PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
<i>per</i>	Perosamine Synthetase-Gen
pg	Pikogramm
pH	potentia Hydrogenii
pmol	Pikomol
PSB	Pepton-Sorbit-Gallensalz-Bouillon
pYV	Plasmid for <i>Yersinia</i> virulence
<i>rfbC</i>	Strukturgen, kodiert für Proteine der O-Antigenbiosynthese
rDNA	ribosomale DNA
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamine
rpm	revolutions per Minute, Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde
SAS	Schweizerische Akkreditierungsstelle
SSC	Äquilibrierungslösung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSDC	Salmonella-Shigella-Agar mit Natriumdesoxycholat und Calciumchlorid
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamine
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TE	TRIS-EDTA
TET	Tetrafluorescein
T _{opt.}	optimale Hybridisierungstemperatur
T _M	Schmelztemperatur
™	Trade mark
U	Unit
V	Volt
VIC	Farbstoff von APPLIED BIOSYSTEMS
VirF, <i>virF</i>	Virulence Factor
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>
<i>YadA</i> , <i>yadA</i>	<i>Yersinia</i> adhesion
YeCM	<i>Y. enterocolitica</i> chromogenic medium
YGC	Yeast Glucose Chloramphenicol Agar
<i>Yops</i> , <i>yops</i>	<i>Yersinia</i> outer proteins

Yst, *yst* Yersinia heat-stable toxin

z. B. zum Beispiel

µl Mikroliter

µM Mikromolar

EINLEITUNG

Enteropathogene *Yersinia (Y.) enterocolitica* stellen nach wie vor bedeutende Erreger von lebensmittelbedingten gastrointestinalen Infektionen des Menschen dar. Im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung besteht daher ein großer Bedarf an schnellen und zuverlässigen Methoden zum Nachweis dieser Keime. In den vergangenen Jahren hat sich die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als eine Erfolg versprechende Methode zum Nachweis von pathogenen Keimen in Lebensmitteln dargestellt. Die Real-Time PCR ist im Vergleich zu der konventionellen PCR mit einem deutlich geringeren Arbeits- sowie Zeitaufwand verbunden, da die Amplifikation und die Detektion der Amplifikate in einem geschlossenen System erfolgen. Daher entfällt bei der Real-Time PCR die Notwendigkeit der Verwendung von Ethidiumbromid, das als mutagen gilt, und es besteht darüber hinaus ein signifikant verringertes Kontaminationsrisiko der Umgebung. Da beim Einsatz der PCR aus Lebensmitteln mit dem Auftreten von inhibitorischen Faktoren gerechnet werden muss, sollte die Real-Time PCR immer eine Amplifikationskontrolle zur Vermeidung von falsch-negativen Ergebnissen beinhalten.

Positive PCR-Ergebnisse müssen allerdings zur Überprüfung der Lebensfähigkeit sowie zur weiteren Bestätigung und Charakterisierung der Stämme mit Kulturmethoden bestätigt werden. Die kulturelle Isolierung der Keime ist daher unumgänglich. Das „Horizontale Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Y. enterocolitica*“ (L 00.00-90), aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB), stellt derzeit die Methode der Wahl für Überwachungs- und Erhebungszwecke dar. Als ein rein kulturelles Isolierungsverfahren ist diese Methode jedoch mit einem hohen Arbeits- und Zeitaufwand verbunden. Die Unterscheidung pathogener und apathogener Stämme ist nur mittels aufwändiger Bestätigungsreaktionen möglich. Aufgrund der geringen Sensitivität kultureller Nachweisverfahren gelingt der Nachweis der pathogenen *Y. enterocolitica* darüber hinaus nur selten. Die Kolonie-DNA-Hybridisierung dagegen stellt eine alternative Isolierungsmethode dar, die sich durch den Einsatz einer Hybridisierungssonde molekularbiologischer Methoden bedient. Sie ist mit einem geringeren zeitlichen Aufwand verbunden und liefert zusätzlich einen direkten Pathogenitätsnachweis.

Schweine gelten als wichtigste Träger der pathogenen *Y. enterocolitica*. Da gerade Schweinehackfleisch vielfach roh verzehrt wird und gesundheitliche Risiken durch Kreuzkontaminationen nicht immer ausgeschlossen werden können, war es Ziel dieser Arbeit ein kombiniertes Verfahren bestehend aus Real-Time PCR und Kolonie-DNA-Hybridisierung zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* in Schweinefleisch, zu

entwickeln. Um einen ökonomischen Einsatz der Zeit- und Personalressourcen zu gewährleisten, sollte die Real-Time PCR als Screening-Methode eingesetzt werden. Nur bei einem positiven Real-Time PCR Screening müsste die Kolonie-DNA-Hybridisierung zur kulturellen Isolierung der Keime angeschlossen werden.

In Vorversuchen wurde zunächst eine Optimierung der Real-Time PCR sowie der Kolonie-DNA-Hybridisierung erzielt. Um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden, erfolgte die Konstruktion einer internen Amplifikationskontrolle (IAC) für die Real-Time PCR. Zur näheren Charakterisierung und Bewertung des Verfahrens unter den Bedingungen im Anwenderlabor, sowie zur Überprüfung der Anwendbarkeit der Real-Time PCR als Screening-Methode und der Kolonie-DNA-Hybridisierung als eine alternative Isolierungsmethode, erfolgte im Anschluss die Durchführung einer In house-Validierung. Abschließend wurde die Eignung des validierten Verfahrens für den Routineeinsatz durch die Untersuchung von 100 rohen Schweinefleischproben überprüft.

LITERATUR

1 *Yersinia enterocolitica*

1.1 Taxonomie und Eigenschaften

Yersinien werden der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet. Sie sind gram-negative, kokkoide bis pleomorphe, zumeist alkalistabile, psychrophile Kurzstäbchen. Sie zeigen aerobes bis fakultativ anaerobes Wachstum und sind oxidasenegativ sowie katalasepositiv. Bei Temperaturen $< +30\text{ °C}$ sind Yersinien (mit Ausnahme von *Y. pestis*) aufgrund einer peritrichen Begeißelung beweglich. Diese Beweglichkeit geht jedoch bei $+37\text{ °C}$ verloren (NEUBAUER et al. 2001a; KLEER 2003). Die Gattung *Yersinia* umfasst derzeit 14 Spezies: *Y. aldovae*, *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. mollaretii*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri* und *Y. similis* (NEUBAUER et al. 2001a; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004; SPRAGUE und NEUBAUER 2005; MERHJEJ et al. 2008; SPRAGUE et al. 2008). Der taxonomische Status der fischpathogenen Spezies *Y. ruckeri* ist jedoch aufgrund von Abweichungen des G/C-Quotienten fraglich (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und bestimmte Bioserotypen von *Y. enterocolitica* sind obligate Krankheitserreger des Menschen (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990). Bei den anderen Spezies handelt es sich um weitverbreitete apathogene Umweltkeime, die bestenfalls bei immungeschwächten Patienten von Bedeutung sind (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004).

Y. pestis ist der Erreger der Pest. Die durch pathogene *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* hervorgerufenen Krankheitsbilder werden als enterale Yersiniosen bezeichnet. Die Übertragung der Yersiniose erfolgt in der Regel oral-alimentär (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990). *Y. pseudotuberculosis* führt in erster Linie zu Infektionen bei Tieren und nur selten beim Menschen. Als wichtigste Erregerreservoir für *Y. pseudotuberculosis* gelten Nager (Mäuse, Ratten), Lagomorphe (Hasen, Kaninchen) und Wildvögel (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). *Y. enterocolitica* besitzt als Lebensmittelinfektionserreger die größte Bedeutung für den Menschen. Nach dem Infektionsschutzgesetz sind der direkte oder indirekte Nachweis von darmpathogenen *Y. enterocolitica* meldepflichtig (KLEER 2003). *Y. enterocolitica* besitzt eine ausgeprägte Psychrotoleranz, eine Vermehrung der Erreger findet selbst bei Kühlschranktemperaturen statt. Das Wachstumsoptimum von *Y. enterocolitica* liegt bei etwa $+28\text{ °C}$. Schweine stellen das wichtigste Reservoir für eine menschliche Infektion dar, wobei *Y. enterocolitica* bei

praktisch allen warmblütigen Wild-, Nutz- und Heimtieren zu finden ist (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004).

Die Spezies *Y. enterocolitica* bildet eine heterogene Gruppe von pathogenen und apathogenen Stämmen, die aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften, ihrer Pathogenität und ihrer geographischen Verteilung in verschiedene Biotypen eingeteilt werden (Tabelle 1). Nach diesem Schema können sechs verschiedene Biotypen unterschieden werden, wobei nur die Biotypen 1B, 2, 3, 4 und 5 das Virulenzplasmid tragen und somit obligat pathogen sind (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Der Biotyp 1A, der vor allem in der Umwelt und in der Vegetation weitverbreitet ist, wird allgemein als apathogen angesehen (WAUTERS et al. 1987; ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990; BOTTONE 1999; NEUBAUER et al. 2001a; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). In der Zwischenzeit wurden allerdings sporadische Fälle und einzelne nosokomiale Ausbrüche mit Biotyp 1A-Stämmen beschrieben, deren Pathogenese noch weiterer Klärung bedarf (TENNANT et al. 2003; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Außerdem gelang es bereits das Vorkommen des Virulenzgens *ail* (attachment invasion locus) bei dem Biotyp 1A nachzuweisen (GRANT et al. 1998; FALCÃO et al. 2006). Für die Differenzierung des Biotyps 1A sind die Reaktionen Salicin, Äskulin und Pyrazinamidase von großer Bedeutung, da diese eine Abgrenzung gegenüber den anderen pathogenen Biotypen ermöglichen (WAUTERS et al. 1987; ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990). Die Biotypen 2, 3, 4 und 5 enthalten die in Europa vorkommenden, für den Menschen pathogenen Stämme (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990; NEUBAUER et al. 2001a). Der Biotyp 4 weist sowohl in Europa, als auch in den USA und Asien die weiteste Verbreitung auf (KAPPERUD 1991; BOTTONE 1999; BUCHER et al. 2005a; EFSA 2007). Der Biotyp 1B enthält die erstmals in den USA vorgekommenen pathogenen Stämme, die sporadisch auch in Europa und Japan zu finden sind (ICHINOHE et al. 1991; ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990; BOTTONE 1999; NEUBAUER et al. 2001a; SCHUBERT et al. 2003).

Tabelle 1: Biotypen von *Y. enterocolitica* modifiziert nach WAUTERS et al. 1987 (nach BOTTONE 1999)

Reaktion	Biotyp					
	1A	1B	2	3	4	5
Lipaseaktivität (Tween-Esterase)	+	+	-	-	-	-
Salicin (24 h)	+	-	-	-	-	-
Äskulin (24 h)	+/-	-	-	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	-	v
Trehalose	+	+	+	+	+	-
Indol	+	+	v	-	-	-
Ornithin Decarboxylase	+	+	+	+	+	+/c
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+/c
Pyrazinamidase	+	-	-	-	-	-
Sorbose	+	+	+	+	+	-
Inositol	+	+	+	+	+	+
Nitratreduktion	+	+	+	+	+	-

c = verzögerte Reaktion
v = variable Reaktion
+ = positive Reaktion
- = negative Reaktion

Neben der Einteilung von *Y. enterocolitica* in Biotypen kann eine serologische Unterscheidung mit Hilfe der somatischen O-Antigene (Oberflächenantigene) mittels Serotypisierung vorgenommen werden. Von den insgesamt 60 *Yersinia*-O-Antigenen entfallen 28 Serotypen auf die Spezies *Y. enterocolitica* (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990). Von diesen Serotypen werden nur wenige mit Erkrankungen des Menschen assoziiert, vor allem die Antigene O:5,27, O:3, O:9 und O:8 sind hier jedoch zu nennen (BOTTONE 1999; NEUBAUER et al. 2001a). Da nicht alle der für pathogene *Y. enterocolitica* charakteristischen O-Antigene Spezies spezifisch sind und somit auch bei anderen *Yersinia* spp. vorkommen, muss zur Überprüfung der Pathogenität von *Y. enterocolitica* sowohl die Serotypisierung als auch die Biotypisierung herangezogen werden (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990; BOTTONE 1999). Für die wichtigsten O-Antigene stehen kommerzielle Agglutinationsseren zur Verfügung, die mittels Objektträgeragglutination überprüft werden können (NEUBAUER et al. 2001a).

1.2 Pathogenitätsfaktoren

Eine Infektion mit *Y. enterocolitica* verläuft in der Regel oral-alimentär über kontaminierte Lebensmittel oder über das Trinkwasser. Da diese Lebensmittel meist bei Kühlschranktemperaturen gelagert werden, müssen sich die Keime im Rahmen der Infektion zunächst an die höheren Temperaturen im Wirt adaptieren. Dafür stehen ihnen eine ganze Reihe an chromosomal und plasmid kodierten Virulenzfaktoren zur Verfügung, die temperaturabhängig exprimiert werden (BOTTONE 1999). Die Besiedlung des

Intestinaltraktes erfolgt im Bereich des terminalen Ileums und proximalen Colons über die Mucosa-Epithelzellen (spezialisierte Zellen über den Peyerschen Platten) mit Hilfe verschiedener Virulenzfaktoren wie den YadA (*Yersinia* adhesion)-, Ail (attachment invasion locus)- und Inv (Invasin) -Proteinen (BOTTONE 1997, 1999). Im weiteren Verlauf vermehren sich die pathogenen *Y. enterocolitica* in den Mucosa-Epithelzellen und in den darunterliegenden Peyerschen Platten, was zur Bildung von Mikroabszessen und Entzündungsreaktionen führt. Dadurch sind die pathogenen Keime in der Lage sich in weiteren Organen, wie den regionalen Lymphknoten, der Milz oder der Leber auszubreiten (BOTTONE 1997, 1999).

Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren:

Das *ail* (attachment invasion locus)-Gen kodiert für ein 17 kDA großes Außenmembranprotein Ail, welches für die Adhäsion und Invasion an die Epithelzellen verantwortlich ist. Die maximale Expression des Ail-Proteins erfolgt bei +37 °C (BOTTONE 1999). Zusammen mit dem YadA- ist das Ail-Protein an der bakteriellen Resistenz gegenüber dem Komplementsystem beteiligt (BLISKA und FALKOW 1992; NEUBAUER et al. 2001a; BIEDZKA-SAREK et al. 2005). Das *ail*-Gen konnte bisher nur bei pathogenen *Y. enterocolitica*, die bei einem Krankheitsgeschehen beteiligt waren, nachgewiesen werden (MILLER et al. 1989; NEUBAUER et al. 2001a).

Das *inv* (invasion)-Gen kodiert ebenfalls für ein Außenmembranprotein (Invasin) mit einem Molekulargewicht von 92 kDA, welches bei +28 °C exprimiert wird. Es ist wie das Ail-Protein an der bakteriellen Adhäsion und Invasion beteiligt, indem es über β 1-Integrine an die Oberfläche von Epithelzellen bindet (BOTTONE 1999; NEUBAUER et al. 2001a). Das Invasin-Protein wird auch bei apathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen synthetisiert, besitzt hier allerdings keine vollständige Funktionsfähigkeit (NEUBAUER et al. 2001a).

Das Enterotoxin Yst (*Yersinia* heatstable toxin), welches durch das *yst*-Gen kodiert wird, ist ein weiterer chromosomal kodierter Virulenzfaktor, der bei +28 °C exprimiert wird. Er ist vermutlich an einer Primärschädigung des Darmepithels beteiligt, indem eine intestinale Flüssigkeitssekretion ins Darmlumen verursacht wird (BOTTONE 1999; NEUBAUER et al. 2001a; DELOR und CORNELIS 1992). Das Yst-Enterotoxin ist äußerst resistent gegenüber Temperatur- und pH-Einflüssen (BOYCE et al. 1979).

Plasmid kodierte Virulenzfaktoren:

Alle für den Menschen pathogenen *Y. enterocolitica* besitzen ein circa 75 kb großes Virulenzplasmid pYV (Plasmid for *Yersinia* virulence), welches maßgeblich für die Virulenz verantwortlich ist (PORTNOY et al. 1981; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Zahlreiche phänotypische Merkmale werden mit dem Vorkommen des Virulenzplasmids assoziiert, darunter die Calciumabhängigkeit bei +37 °C, die Autoagglutination bei +35 °C bis +37 °C sowie die Aufnahme von Kongorot und Kristallviolett (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Diese Merkmale können zum Erkennen pathogener Stämme herangezogen werden (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990). Das Virulenzplasmid von *Y. enterocolitica* kodiert für eine große Anzahl an Proteinen, wie beispielsweise für das YadA (*Yersinia* adhesion) oder für die Yops (*Yersinia* outer proteins) (BOTTONE 1997). Im Laufe der Isolierungsverfahren kann es allerdings durch bestimmte Bedingungen, wie beispielsweise einer Inkubation bei +37 °C, verloren gehen (ZINK et al. 1980; BLAIS und PHILLIPPE 1995; NEUBAUER et al. 2001a).

Das fibrilläre Außenmembranprotein YadA (*Yersinia* adhesion) erleichtert die bakterielle Adhäsion und Invasion, indem es an Fibronektine, Kollagene oder Laminine der Epithelzellen bindet. Die Expression des YadA-Proteins erfolgt bei +37 °C (BOTTONE 1997; NEUBAUER et al. 2001a). YadA gilt außerdem als wichtigster Faktor der bakteriellen Serumresistenz, da es die Phagozytose inhibiert (NEUBAUER et al. 2001a; BIEDZKA-SAREK et al. 2005). Weiterhin ist das YadA für die Autoagglutination plasmidtragender *Y. enterocolitica* verantwortlich (SKURNIK et al. 1984; BOTTONE 1997). Die Expression des YadA-Proteins erfolgt im Gegensatz zu der Expression der Yops calciumunabhängig (EL TAHIR und SKURNIK 2001).

Yops (*Yersinia* outer proteins) stellen weitere plasmidkodierte Virulenzfaktoren dar, die sowohl temperatur- als auch calciumabhängig bei +37 °C exprimiert werden (BOTTONE 1997). Sie werden nach Kontaktaufnahme in die Wirtszellen injiziert (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Die Yop-Sekretion plasmidtragender *Y. enterocolitica* findet nur bei Abwesenheit von Calcium-Ionen bei +37 °C und gleichzeitiger Wachstumseinschränkung statt (BOTTONE 1997; CORNELIS et al. 1998). Sie sind an der Resistenz gegenüber der Phagozytose beteiligt und bieten somit einen Schutz vor der unspezifischen Immunabwehr des Wirtes (FORSBERG et al. 1994; BOTTONE 1997; BOTTONE 1999). Für ihr Wachstum benötigen plasmidtragende *Y. enterocolitica* bei +37 °C allerdings calciumreiche Medien. Diese Eigenschaft plasmidtragender *Y. enterocolitica* bei +37 °C wird Calciumabhängigkeit genannt (CORNELIS et al. 1998).

Die Transkription der Gene der Yops und des YadA werden durch den Transkriptionsaktivator VirF (Virulence Factor) aktiviert. Das VirF-Protein ist ein 30 kDA großes Protein, welches vom *virF*-Gen kodiert wird. Die Expression erfolgt temperaturabhängig bei +37 °C. Diese Temperaturabhängigkeit erklärt die Tatsache, dass die Yops und das YadA ebenfalls nur bei +37 °C exprimiert werden (SKURNIK und TOIVANEN 1992; CORNELIS et al. 1998; NEUBAUER et al. 2001a; EL TAHIR und SKURNIK 2001).

1.3 *Y. enterocolitica*-Infektionen

Infektionen bei Menschen:

Die durch pathogene *Y. enterocolitica* hervorgerufene enterale Yersiniose des Menschen ist nahezu weltweit verbreitet. Sie kommt in den gemäßigten und subtropischen Gebieten Europas, Nord-, Zentral- und Ostasiens, Australiens, Südafrikas und Nord- und Südamerikas vor. In den tropischen Gebieten Südasiens und Afrikas wird sie allerdings sehr selten gefunden oder fehlt vollständig (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Ihr Nachweis ist nach § 7 des Infektionsschutzgesetzes (N.N. 2000) meldepflichtig. In Deutschland stellt sie eine der häufigsten bakteriell bedingten Magen-Darm-Infektionen dar (RKI 2007a, b). Für das Jahr 2006 wurden hier 5.161 Erkrankungen gemeldet, bei denen in der Mehrzahl der Fälle der Serotyp O:3, gefolgt von den Serotypen O:9, O:5,27 und O:8 nachgewiesen werden konnten. Auffällig war die altersspezifische Inzidenz, welche die höchsten Werte bei Kleinkindern im Alter von einem bis vier Jahren aufwies (RKI 2007b).

Die Epidemiologie der *Y. enterocolitica* Infektion ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. Als wichtigstes Erregerreservoir für den Menschen gilt das Schwein, welches regelmäßig für den Menschen pathogene Stämme (vor allem Bioserotyp 4/O:3) beherbergt. Die Infektion erfolgt in der Regel oral-alimentär über kontaminierte Lebensmittel, wobei rohes oder unvollständig durcherhitztes Schweinefleisch die Hauptinfektionsquelle darstellt (TAUXE et al. 1987; ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004; MC NALLY et al. 2004; BUCHER et al. 2005a; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2006a). Als weitere Infektionsquellen gelten der direkte Kontakt zwischen Menschen und Schweinen in der Landwirtschaft oder im Schlachthof sowie der direkte Kontakt zwischen Haustieren und Menschen (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990; KAPPERUD 1991; NESBAKKEN et al. 1991b; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a). Darüber hinaus stellen mit *Y. enterocolitica* kontaminierte Blutkonserven eine weitere Infektionsquelle dar (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990; N.N. 1999).

Y. enterocolitica ruft nach einer Inkubationszeit von 3-10 Tagen eine akute Enteritis hervor. Als Hauptsymptome werden Durchfall, krampfartige Bauchschmerzen, Pseudoappendizitis, Tenesmen, Erbrechen, Fieber sowie Entzündungen im Halsbereich genannt. Vor allem Kinder und Jugendliche sind häufig betroffen (TAUXE et al. 1987; NEUBAUER et al. 2001c; RKI 2007a). Bei Erwachsenen mit schweren Grundleiden kann es im weiteren Verlauf zu schweren Septikämien mit Abszedierung in innere Organe kommen (NEUBAUER et al. 2001c; KLEER 2003; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Als Folgeerkrankung einer intestinalen Infektion mit *Y. enterocolitica*, können extraintestinale, immunologisch bedingte Reaktionen, wie Erythema nodosum, reaktive Arthritis, Glomerulonephritis, Thyroiditis, Myokarditis oder Uveitis auftreten (NEUBAUER et al. 2001c; KLEER 2003; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004; RKI 2007a).

Infektionen bei Tieren:

Y. enterocolitica kommt praktisch bei allen warmblütigen Wild-, Nutz-, und Heimtieren vor und wurde darüber hinaus in Reptilien, Fischen, Muscheln und Insekten nachgewiesen. Die Übertragung erfolgt zwischen Tieren bei engerem Kontakt über erregerehaltigen Kot und über die damit kontaminierte Umwelt. Bei Karnivoren erfolgt die Infektion über kontaminierte Beute- und Futtertiere, vor allem über rohes Schweinefleisch (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). In der Regel sind die Tiere asymptomatische Träger des Bakteriums, in seltenen Fällen können jedoch klinische Erscheinungen auftreten (NEUBAUER et al. 2001b).

Das Schwein stellt das wichtigste Reservoirtier für Erkrankungen des Menschen dar (NEUBAUER et al. 2001b; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Pathogene *Y. enterocolitica*, vor allem des Bioserotyps 4/O:3, können regelmäßig aus der Mundhöhle, insbesondere den Tonsillen und der Zunge, von Schlachtkörpern und aus Kotproben von Schweinen isoliert werden (TAUXE et al. 1987; NESBAKKEN 1988; DE BOER und NOUWS 1991; KAPPERUD 1991; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999, 2000, 2001b, 2001c, 2004, 2007; BUCHER et al. 2005a; BHADURI et al. 2005; BHADURI und WESLEY 2006; BOWMAN et al. 2007). Die klinische Yersiniose tritt beim Schwein überwiegend als Jungtiererkrankung mit Enteritiden, Serositiden, Arthritiden und Pneumonien auf. Bei Sauen sind außerdem Fruchtbarkeitsstörungen und Aborte möglich (NEUBAUER et al. 2001b).

Auch Rinder, als weitere lebensmittelliefernde Tiere, können Träger pathogener *Y. enterocolitica*, überwiegend des Serotyp O:9, Biotyp 2 oder 3 sein und scheiden diese mit dem Kot aus (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1996). Als Reservoir für pathogene *Y. enterocolitica* spielen sie jedoch eher eine untergeordnete Rolle (BUCHER et al. 2002).

1.4 Vorkommen in Lebensmitteln

Bedingt durch die Psychrotoleranz von *Y. enterocolitica*, ist eine Vermehrung der Keime selbst bei Kühlschranktemperaturen von 0 bis +4 °C möglich (HANNA et al. 1977; KAPPERUD 1991; BOTTONE 1999). Auch in tiefgefrorenen Lebensmitteln sind die Keime in der Lage zu überleben (SCHIEMANN 1989; BHADURI 2006). Darüber hinaus findet eine Vermehrung der Keime auch im vakuumverpackten Fleisch bei Kühltemperaturen statt (KAPPERUD 1991). Im Gegensatz dazu ist *Y. enterocolitica* nicht sehr hitzestabil. Eine 5-minütige Erhitzung bei +60 °C sowie die Pasteurisierung reichen aus, um die Keime zu inaktivieren (HEIM et al. 1984; BOTTONE 1999). Kochsalzempfindlichkeit (max. 5%), pH-Grenzwerte (4,2-9,6) und der untere a_w -Grenzwert (0,97) sind vergleichbar mit anderen *Enterobacteriaceae* (KLEER 2003).

Der Verzehr von rohem oder unvollständig durcherhitztem Schweinefleisch gilt als Hauptinfektionsquelle für lebensmittelbedingte Infektionen mit pathogenen *Y. enterocolitica* (TAUXE et al. 1987; ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990; BUCHER et al. 2005a; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2006a). Daher wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Untersuchungen zur Prävalenz von *Y. enterocolitica* in rohem Schweinefleisch mittels kulturellen sowie PCR-basierenden Nachweismethoden durchgeführt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* in rohem Fleisch und Fleischprodukten vom Schwein

Produkt	Probenanzahl	Anzahl (n) positiver Proben								Zielgen	Land	Quelle
		kulturell		konv. PCR		Real-Time PCR: SYBR Green		Real-Time PCR: Sonde				
		n	%	n	%	n	%	n	%			
Zungen	51	40	78%	47	92%					<i>yadA</i>	Finnland	FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999
	99	79	80%	82	83%					<i>yadA</i>	Finnland	FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001b
	15	5	33%					10	67%	<i>yst</i>	USA	VISHNUBHATLA et al. 2001
	4	1	25%	1	25%					<i>ail</i>	Deutschland	KNÖDL 2008
Hackfleisch	255	4	2%	63	25%					<i>yadA</i>	Finnland	FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999
	100	32	32%					47	47%	<i>yst</i>	USA	VISHNUBHATLA et al. 2001
	350	0	0%					133	38%	<i>ail</i>	USA	BOYAPALLE et al. 2001
	100	5	5%	35	35%					<i>ail</i>	Schweden	THISTED LAMBERTZ et al. 2007
	70	0	0%			17	24%	9	13%	<i>ail</i>	Deutschland	HARTMANN 2007
Tonsillen	31	0	0%					2	6,5%	<i>ail</i>	Deutschland	GRÖTZBACH 2007
	32	0	0%	4	13%					<i>ail</i>	Deutschland	KNÖDL 2008
	200	70	35%					175	88%	<i>ail</i>	Deutschland	FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2006b
	212	72	34%			186	88%	181	85%	<i>ail</i>	Schweiz	FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2007
Fleisch	300	6	2%	50	17%					<i>yadA</i>	Norwegen	JOHANNESSEN et al. 2000
	100	0	0%					7	7%	<i>ail</i>	Deutschland	FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2006b
	30	0	0%			9	30%	3	10%	<i>ail</i>	Deutschland	HARTMANN 2007
	109	0	0%					11	10%	<i>ail</i>	Deutschland	GRÖTZBACH 2007
Innereien	34	17	50%	21	62%					<i>yadA</i>	Finnland	FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000
	16	5	31%	9	56%					<i>yadA</i>	Finnland	FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001b
	7	0	0%	0	0%					<i>ail</i>	Deutschland	KNÖDL 2008
Salami	97	0	0%	11	11%					<i>ail</i>	Schweden	THISTED LAMBERTZ et al. 2007
Darm	350	28	8%					278	79%	<i>ail</i>	USA	BOYAPALLE et al. 2001

Bei all diesen Untersuchungen konnte mit den PCR-basierenden Methoden eine deutlich höhere Prävalenz im Vergleich zu den kulturellen Nachweismethoden erzielt werden (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Vor allem Zungen, Tonsillen und Innereien vom Schwein weisen eine hohe Prävalenz mit pathogenen *Y. enterocolitica* auf (Tabelle 2). Gerade die Tonsillen werden im Verlauf der Schlachtung als bedeutende Kontaminationsquelle angesehen. Sie werden im Rahmen des Schlachtvorgangs zusammen mit dem Geschlinge entfernt und führen zwangsläufig zu einer Kreuzkontamination der Innereien, Zungen und des Schlachtkörpers. Diese Kreuzkontamination lässt sich allerdings durch eine Abtrennung des Kopfes samt den Tonsillen und der Zunge vor der Eviszeration vermeiden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000, 2001b).

Die Nachweisrate in rohem Fleisch und Hackfleisch ist insgesamt niedriger; sie erreicht aber mittels PCR zum Teil recht hohe Prävalenzen (Tabelle 2). Diese Erkenntnisse führen zu der Vermutung, dass mittels kulturellen Nachweisverfahren die tatsächliche Kontaminationsrate in früheren Studien unterschätzt wurde (VISHNUBHATLA et al. 2001). Neben den rohen

Produkten vom Schwein konnten die Erreger bisher auch aus verzehrsfertigen Schweinefleischprodukten isoliert werden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2006b; HARTMANN 2007; THISTED-LAMBERTZ et al. 2007).

Pathogene *Y. enterocolitica* konnten darüber hinaus aus Lebensmitteln anderer Tierarten, beispielsweise aus Hackfleisch vom Rind (VISHNUBHATLA et al. 2001) oder aus Geflügelfleisch (LINDBLAD et al. 2006) isoliert werden. Mit Hilfe der PCR gelang ihr Nachweis auch in Salat (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001b; JOHANNESSEN et al. 2002) sowie in Tofu (VISHNUBHATLA et al. 2001). Aufgrund der ermittelten niedrigen Prävalenzen in diesen Lebensmitteln ist hier allerdings von einer Kreuzkontamination durch kontaminiertes Schweinefleisch auszugehen (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004; BUCHER et al. 2005b).

2 Nachweismethoden für *Y. enterocolitica*

2.1 Klassische kulturelle Nachweismethoden

Klassische kulturelle Methoden zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* beinhalten eine vorausgehende Anreicherung, die folgende Ausbringung der Kultur auf Selektivnährböden sowie die biochemische und serologische Überprüfung verdächtiger Kolonien (BUCHER et al. 2005b). Der Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln gestaltet sich, aufgrund der meist geringen Keimzahl bei gleichzeitig hoher Begleitflora, schwierig (SCHIEMANN 1982). Trotz einer Vielzahl an publizierten Nachweistechiken existiert bis heute kein einheitliches und sicheres Laborverfahren zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* (BUCHER et al. 2005a).

Die DIN EN ISO 10273:2003 stellt das Standardverfahren für den Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln dar. Sie wurde in die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB als „Horizontales Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Y. enterocolitica*“ L 00.00-90 (N.N. 2004) übernommen. Die Anreicherung erfolgt im Verhältnis 1:10 in Pepton-Sorbit-Gallensalz-Bouillon (PSB) für 2-3 Tage unter Schütteln bei +25 °C sowie im Verhältnis 1:100 in Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Bouillon (ITC) für 48 h bei +25 °C. Der Ausstrich aus der PSB-Bouillon erfolgt direkt und nach vorheriger Behandlung mit Kaliumhydroxid auf Cefsulodin-Irgasan-Ticarcillin-Agar (CIN). Der Ausstrich aus der ITC-Bouillon wird auf Salmonella-Shigella-Agar mit Natriumdesoxycholat und Calciumchlorid (SSDC) ausgeführt. Die Bebrütung beider Nährböden erfolgt bei +30 °C für 48 h. Im Anschluss werden von jeder Platte fünf

verdächtige Kolonien auf Nähragar ausgestrichen und für 24 h bei +30 °C bebrütet. Von den bebrüteten Nähragar-Platten erfolgt dann eine orientierende Prüfung mittels Harnstoff-Indol-, Kligler- und Oxidase-Test, sowie die biochemische Bestätigung und Biotypisierung. Zur biochemischen Bestätigung können kommerziell erhältliche miniaturisierte Identifizierungskits, die eine Identifizierung von *Y. enterocolitica* ermöglichen, eingesetzt werden. Die Prüfung auf präsuntive Pathogenität erfolgt durch Prüfung der Äskulinvergärung (negativ bei pathogenen *Y. enterocolitica*), durch den Pyrazinamidasenachweis (negativ bei pathogenen *Y. enterocolitica*) sowie durch Prüfung auf Calciumabhängigkeit (positiv bei pathogenen *Y. enterocolitica*) (N.N. 2004). Aufgrund der Vielzahl an Einzeltests ist das Standardverfahren sehr arbeits- und zeitaufwändig, so dass sein Einsatz für Routinelaboratorien wenig geeignet scheint (NEUBAUER et al. 2001a).

Anreicherung von *Y. enterocolitica*:

Bedingt durch die meist nur geringen Keimzahlen an *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln ist eine vorausgehende Anreicherung nötig, um die Zahl der pathogenen Zielkeime zu erhöhen (DE BOER 1992; THISTED LAMBERTZ et al. 2000). Die Auswahl der Anreicherung gestaltet sich jedoch aufgrund der großen Heterogenität innerhalb der Spezies schwierig, da die einzelnen Serotypen unterschiedliche Anforderungen an die Nährmedien stellen (SCHIEMANN 1982).

Die von WAUTERS et al. (1988) entwickelte ITC-Bouillon wurde zur selektiven Anreicherung des Bioserotyps 4/O:3 entwickelt. Für die Anzucht des Serotyps O:9 ist diese Bouillon allerdings aufgrund der hohen Konzentration an Kaliumchlorat weniger geeignet (DE ZUTTER et al. 1994). Die PSB-Bouillon kann zur Anreicherung verschiedener Serotypen von *Y. enterocolitica* verwendet werden und wird im „Horizontalen Verfahren zum Nachweis von präsuntiv pathogenen *Y. enterocolitica*“ L 00.00-90 (N.N. 2004) aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB als Anreicherungsverfahren beschrieben (WEAGANT und KAYSNER 1983). Bedingt durch die Psychrotoleranz von *Y. enterocolitica* stellt die Kälteanreicherung in phosphatgepufferter Kochsalzlösung bei +4 °C für 3 Wochen eine weitere, allerdings sehr zeitaufwändige Möglichkeit der Anreicherung dar (DE BOER und NOUWS 1991; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Neben den selektiven Anreicherungsmedien besteht zudem die Möglichkeit einer Anreicherung in nicht-selektiven Medien, wie beispielsweise der Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (CASO-Bouillon). Eine Hemmung der Begleitflora kann mit den nicht-selektiven Anreicherungsmedien allerdings nicht erzielt werden.

Nährböden zur Isolierung von *Y. enterocolitica*:

Nicht-selektive Nährböden zur Isolierung von pathogenen *Y. enterocolitica* sind weniger geeignet, da eine ungehemmte Vermehrung der Begleitflora erfolgt (BUCHER et al. 2005b). Daher werden selektive Nährböden, allen voran der CIN- sowie der SSDC-Agar, in der Routinediagnostik am häufigsten eingesetzt (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003).

Der CIN-Agar wirkt durch Zusatz von Antibiotika hemmend auf das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* sowie *Proteus mirabilis*. Durch die Fermentation von Mannit bilden *Yersinia*-Stämme Kolonien mit einem himbeerroten Zentrum, umgeben von einer klaren Randzone (SCHIEMANN 1979). Allerdings zeigen *Citrobacter freundii*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas spp.* und *Proteus spp.* eine ähnliche Kolonienmorphologie wie *Yersinia spp.* und können daher zu Verwechslungen führen (HEAD et al 1982; DE BOER und SELDAM 1987). Zur Anzucht von Stämmen des Bioserotyps 3/O:3 ist der Agar allerdings nicht geeignet, da sie auf CIN-Agar gehemmt werden (FUKUSHIMA und GOMYODA 1986). Der größte Nachteil dieses Agars besteht darin, dass virulente *Y. enterocolitica* Kolonien nicht eindeutig von apathogenen *Yersinia spp.* differenziert werden können (FUKUSHIMA 1987; VISHNUBHATLA et al. 2001; THISTED-LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM 2005; WEAGANT 2008).

Der SSDC-Agar macht sich die hohe Resistenz von *Y. enterocolitica* gegenüber Desoxycholat zunutze (WAUTERS 1973). Charakteristische Kolonien von *Y. enterocolitica* stellen sich grau mit einem unscharfen Rand dar (N.N. 2004). Einige Spezies von *Morganella*, *Proteus*, *Serratia* und *Aeromonas* können jedoch ebenfalls auf SSDC wachsen und erschweren somit eine eindeutige Differenzierung (DE BOER 1992; BUCHER et al. 2005b).

Mit dem YeCM-Agar (*Y. enterocolitica* chromogenic medium) als ein neues, chromogenes Medium ist die direkte Differenzierung von pathogenen *Y. enterocolitica* Kolonien des Biotyps 1B sowie 2-5 möglich. Diese stellen sich ähnlich den Kolonien auf CIN-Agar dar, während der Biotyp 1A und andere apathogene *Yersinia spp.* violette bis blaue Kolonien bilden. Der Agar enthält Cellobiose als Zucker, ein chromogenes Substrat sowie selektive Inhibitoren (WEAGANT 2008).

Biochemische Bestätigung von *Y. enterocolitica*:

Eine erste biochemische Bestätigung erfolgt über den Nachweis des Abbaus von Harnstoff (BUCHER et al. 2005b). Das Prinzip des Urease-Tests beruht auf dem Vorkommen des Enzyms Urease bei pathogenen *Y. enterocolitica*. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung des im Agar vorhandenen Harnstoffs zu Ammoniak und Carbamat. Dadurch ergibt sich eine Erhöhung des pH-Wertes im Agar, welche durch einen Farbumschlag durch Verfärbung des Indikators angezeigt wird (DE KONING-WARD und ROBINS-BROWN 1995; MOBLEY et al. 1995). Für die Identifizierung von *Yersinia spp.* liefert der Harnstoffagar nach Christensen optimale Ergebnisse. Jedoch können auch andere *Enterobacteriaceae*, wie z.B. *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.* oder *Serratia spp.*, eine positive Urease Aktivität aufweisen, die allerdings meist verzögert ausfällt (VUYE und PIJCK 1973).

Zur weiteren biochemischen Identifizierung stehen verschiedene kommerziell erhältliche Testsysteme zur Verfügung (z.B. API[®] 20E und Api[®] Rapid 32IDE der Firma BIOMÉRIEUX, *Yersinia*-identification kit der Firma MERLIN). Das Testsystem API[®] 20E der Firma BIOMÉRIEUX wird als Goldstandard zur Identifizierung von *Yersinia spp.* angesehen, da es sowohl die höchste Sensitivität als auch das beste Preis-Leistungs-Verhältnis aufweist (NEUBAUER et al. 1998; ARNOLD et al. 2004). Bei diesem Testsystem konnte bei einer Bebrütungstemperatur von +28 °C, anstelle der vom Hersteller empfohlenen +37 °C und der Annahme einer negativen Voges-Proskauer Reaktion, die Identifikationsrate für *Yersinia spp.* deutlich gesteigert werden (ARCHER et al. 1987).

Bei entsprechenden Reaktionen sind weitere biochemische Tests durchzuführen, um den Biotyp von *Y. enterocolitica* gemäß dem von WAUTERS et al. 1987 beschriebenen Schema zur Biotypisierung zu ermitteln (Tabelle 1) (BUCHER et al. 2005b).

Serologische Identifizierung von *Y. enterocolitica*:

Die Einteilung bezüglich der einzelnen Serotypen erfolgt mittels Objektträgeragglutination durch monovalente Antikörper. Für die wichtigsten O-Antigene stehen kommerziell erhältliche Agglutinationsseren zur Verfügung (NEUBAUER et al. 2001a; BUCHER et al. 2005b). Die Objektträgeragglutination sollte bei Raumtemperatur durchgeführt werden, da die O-Antigene hierbei nicht durch Adhäsinfibrillen verdeckt werden (HEESEMAN 1990; NEUBAUER et al. 2001a).

Prüfung auf Pathogenität:

Neben der genauen biochemischen Identifizierung von *Y. enterocolitica* ist der Pathogenitätsnachweis von entscheidender Bedeutung, um zwischen virulenten und

avirulenten *Y. enterocolitica* Stämmen unterscheiden zu können. Der Nachweis kann auf chromosomal- sowie plasmidcodierten Virulenzfaktoren beruhen (BUCHER et al. 2005b) (Kapitel 1.2). Für den Routinenachweis existieren daher verschiedene Testverfahren, wie beispielsweise der Autoagglutinationstest bei +37 °C, die Calciumabhängigkeit bei +37 °C, die Serumresistenz, die Aufnahme von Kongorot und Kristallviolett bei +37 °C, die Pyrazinamidaseaktivität, die Salicinfermentation sowie die Äskulinspaltung (KAPPERUD 1991; BOTTONE 1997; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003; BUCHER et al. 2005b). All diese Testverfahren sind sehr zeitaufwändig und nicht immer zuverlässig, so dass der Pathogenitätsnachweis immer öfter mittels DNA-basierenden Verfahren, wie der Polymerase Chain Reaction (PCR), über die Detektion von spezifischen Genen verschiedener Virulenzfaktoren durchgeführt wird (NEUBAUER et al. 2001a; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003) (Kapitel 2.2.1.3).

2.2 Molekularbiologische Nachweismethoden

2.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) wurde 1987 von Karry B. Mullis entwickelt. Sie stellt eine In-vitro-Technik dar, mit der gezielt DNA (Desoxyribonukleinsäure)- Abschnitte enzymatisch vervielfältigt (= amplifiziert) werden können. Für die Durchführung einer PCR werden folgende Komponenten benötigt:

- Template (Ausgangs-DNA)
- Oligonukleotidprimer (Startmoleküle)
- DNA-Polymerase (Enzym)
- Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP's)
- Reaktionspuffer

Ausgehend von einer einzelsträngigen Template-DNA synthetisiert die DNA-Polymerase mit Hilfe der Oligonukleotidprimer und den dNTP's einen neuen DNA-Strang. Bei den Primern handelt es sich um einzelsträngige, synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die zu einem definierten Bereich der Template-DNA komplementär sind. Sie dienen als Startmoleküle für die DNA-Polymerase.

Ablauf der PCR:

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Reaktionsschritten, die zyklisch wiederholt werden, wodurch die Ausgangs-DNA exponentiell amplifiziert wird. Die Durchführung der PCR-Zyklen

erfolgt in sogenannten Thermocyclern, welche den zyklischen Temperaturwechsel ermöglichen. Im ersten Schritt (Denaturierung; Denaturation) erfolgt die Hitzedenaturierung der doppelsträngigen Template-DNA zu Einzelsträngen, indem die Temperatur auf bis zu +95 °C erhöht wird. Im zweiten Schritt (Anlagerung; Annealing) hybridisieren die Oligonukleotidprimer an die komplementären Sequenzen der einzelsträngigen Template-DNA. Dafür wird die Temperatur in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur (T_m) der Primer von +95 °C auf +65 °C bis +37 °C abgesenkt. Als Schmelztemperatur wird dabei diejenige Temperatur bezeichnet, bei der die DNA-Moleküle zu 50% denaturiert sind. Die Annealing-Temperatur sollte ungefähr 5 °C unter der errechneten Schmelztemperatur der Primer gewählt werden. Im dritten Schritt (Verlängerung; Extension) erfolgt die Amplifikation der zwischen den Primern gelegenen Sequenzabschnitten durch die DNA-Polymerase, indem die freien dNTP's in die Einzelstränge eingebaut werden. Dieser Schritt findet gewöhnlich bei +72 °C statt, und ist abhängig von dem optimalen Temperaturmaximum der verwendeten DNA-Polymerase. Am häufigsten wird die Taq-Polymerase, ein hitzestabiles Enzym aus dem Eubakterium *Thermus aquaticus*, für die PCR verwendet. Heutzutage wird außerdem mit chemisch modifizierten Enzymen (z.B. HotStarTaq-DNA-Polymerase) gearbeitet, die bei Raumtemperatur in einem inaktiven Zustand vorliegen und erst durch den Denaturierungsschritt bei +95 °C aktiviert werden. Die Amplifikation von nicht spezifisch angelagerten Primern sowie die Entstehung von Primerdimeren kann dadurch verhindert werden (NEWTON und GRAHAM 1994; BANGSOW et al. 2002). Bei der Real-Time PCR werden die beiden letztgenannten Schritte (Anlagerung und Verlängerung) auch häufig zu einem gemeinsamen Schritt zusammengefasst (JOURDAN et al. 2000). In Abhängigkeit von der Menge der eingesetzten Template-DNA werden in der Regel 30-45 Zyklen durchgeführt. Bei einer geringen Menge an Ausgangs-DNA sollte die Zyklenzahl erhöht werden (BANGSOW et al. 2002). Da allerdings mit steigender Zyklenzahl auch die Anzahl der unerwünschten Artefakte zunehmen, kann sie selten auf über 45 Zyklen erhöht werden (NEWTON und GRAHAM 1994).

Detektion der PCR-Produkte:

Die Detektion der PCR-Produkte erfolgt bei der konventionellen PCR mit Hilfe von Elektrophoresesystemen. Die Auftrennung der PCR-Produkte findet nach ihrer Größe im Agarose- oder Polyacrylamidgel statt. Die DNA wird mit Ethidiumbromid, einem fluoreszierenden Farbstoff gefärbt. Durch die anschließende ultraviolette Bestrahlung wird die DNA im Gel sichtbar gemacht. Zur Größenbestimmung der amplifizierten PCR-Produkte wird ein Längenstandardmarker aufgetragen, anhand dessen die Größe der PCR-Produkte abgeschätzt werden kann. Diese Systeme sind zwar kostengünstig, aber gleichzeitig auch sehr arbeits- und zeitaufwändig. Die Verwendung von Ethidiumbromid birgt außerdem eine

hohe Gesundheitsgefahr, da es als mutagen eingestuft wird (NEWTON und GRAHAM 1994; BANGSOW et al. 2002).

Bei der Real-Time PCR hingegen werden die PCR-Produkte mittels Fluoreszenz bereits während des PCR-Laufs in Echtzeit gemessen, was eine deutliche Arbeits- und Zeitersparnis zur Folge hat. Auch die Kontamination der Umgebung mit den PCR-Produkten kann so vermieden werden, da Amplifikation und Detektion in einem geschlossenen System stattfinden (HEID et al. 1996). Außerdem bietet die Real-Time PCR die Möglichkeit der Quantifizierung, indem aus der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt auf die Menge an Ausgangs-DNA geschlossen werden kann (BANGSOW et al. 2002).

Bei der Real-Time PCR existieren zwei verschiedene Möglichkeiten der Detektion: die Verwendung von DNA-bindenden Farbstoffen oder der Einsatz von sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden. In beiden Fällen emittiert die Probe bei Anwesenheit der Zielsequenz ein Fluoreszenz-Signal, welches von Zyklus zu Zyklus neu gemessen wird. Die Fluoreszenz-Einheiten werden auf der y-Achse gegen die Zykluszahl auf der x-Achse aufgetragen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist hierbei proportional zur Menge des gebildeten PCR-Produktes (HEID et al. 1996; BANGSOW et al. 2002; BUSTIN 2005; KUBISTA et al. 2006).

DNA-bindende Farbstoffe sind unspezifische Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. SYBR Green oder Ethidiumbromid. Sie sind nach der Verlängerungsphase der PCR in der Lage, sich an die gebildete doppelsträngige DNA zu binden und dabei ein Fluoreszenzsignal zu erzeugen. Diese Farbstoffe sind relativ kostengünstig; sie weisen allerdings eine geringe Spezifität auf, da es ihnen möglich ist, sich an jede doppelsträngige DNA zu binden, also auch an unspezifische PCR-Produkte oder an gebildete Primerdimere. Um eine Differenzierung der verschiedenen PCR-Produkte zu erreichen, ist die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse von essentieller Bedeutung. Durch letztere ist die Ermittlung der Schmelztemperatur jedes einzelnen PCR-Produktes möglich, da jedes Produkt in Abhängigkeit von der Länge und von der Basenzusammensetzung eine unterschiedliche Schmelztemperatur aufweist. Hierzu wird am Ende des PCR-Laufs die Temperatur langsam bis auf +95 °C erhöht, so dass die DNA-Doppelstränge denaturieren und erneut als Einzelstränge vorliegen. Dadurch sind die Fluoreszenzfarbstoffe nicht mehr in der Lage sich an die DNA zu binden, was sich in einem Abfall des Fluoreszenzsignals beim Schmelzpunkt widerspiegelt (MC KILLIP und DRAKE 2004; BUSTIN 2005; KUBISTA et al. 2006).

Die sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden sind im Gegensatz zu den DNA-bindenden Farbstoffen hochspezifisch, da sie an die zu amplifizierende Zielsequenz hybridisieren. Ein Fluoreszenzsignal kann demzufolge nur durch die Amplifikation des spezifischen PCR-Produktes ermittelt werden. Die meisten dieser sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden basieren auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET). Hierbei bilden die verwendeten Farbstoffe Donor-Akzeptor Paare, wobei der Donor-Farbstoff durch eine Lichtquelle angeregt wird und hierdurch seine Energie auf den in räumlicher Nähe befindlichen Akzeptor-Farbstoff überträgt. Dieser Energie-Transfer ist demzufolge abhängig vom Abstand der Farbstoffe zueinander; mit zunehmender Distanz verändert sich somit die Fluoreszenz des Systems (MC KILLIP und DRAKE 2004; KUBISTA et al. 2006). Folgende sequenzspezifische Fluoreszenzsonden sind von Bedeutung:

- TaqMan Sonde (Hydrolysesonde):

Die TaqMan Sonde ist eine mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sonde. Am 3' Ende der Sonde befindet sich ein Quencher-Farbstoff (Akzeptor-Farbstoff), während am 5' Ende ein Reporter-Farbstoff (Donor-Farbstoff) lokalisiert ist. Solange die Sonde während der Anlagerungsphase auf der Zielsequenz hybridisiert und intakt ist, kommt es zum FRET-Effekt; die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes wird durch die räumliche Nähe zum Quencher-Farbstoff unterdrückt. Im Laufe der PCR wird die hybridisierte Sonde allerdings durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert. Dies führt zur Auflösung der räumlichen Nähe zwischen dem Reporter- und dem Quencher-Farbstoff und somit zur Auflösung des FRET-Effektes, so dass die vom Reporter-Farbstoff emittierte Fluoreszenz einer definierten Wellenlänge während der Elongationsphase detektiert werden kann (HEID et al. 1996; BANGSOW et al. 2002; MACKAY 2004).

- Hybridisierungssonde (FRET Sonde):

Bei der Hybridisierungssonde handelt es sich um zwei sequenzspezifische Sonden, von denen eine am 3' Ende (Donor-Farbstoff) und die andere am 5' Ende (Akzeptor-Farbstoff) mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Beide binden in kurzem Abstand voneinander an die Zielsequenz und lösen somit den FRET-Effekt aus, indem die Fluoreszenz des Akzeptors emittiert wird. Die Messung erfolgt einmal pro Zyklus während der Anlagerungsphase (BANGSOW et al. 2002).

- Molecular Beacons:

Molecular Beacons sind doppelt markierte sequenzspezifische Sonden, die während der Denaturierungs- und Verlängerungsphase in einer Haarnadelstruktur vorliegen. Am 3' Ende befindet sich ein nicht-fluoreszierender Quencher-Farbstoff (Akzeptor-Farbstoff) und am 5' Ende ein Reporter-Farbstoff (Donor-Farbstoff). Die Messung der Fluoreszenz erfolgt während der Anlagerungsphase, indem sich die Schleife öffnet und an die

Zielsequenz hybridisiert. Quencher- und Reporter-Farbstoff werden voneinander getrennt - der FRET-Effekt wird somit aufgehoben -, so dass die Reporterfluoreszenz emittiert werden kann (BANGSOW et al. 2002; MC KILLIP und DRAKE 2004; MACKAY 2004).

- Scorpion Primer:

Hierbei handelt es sich um einen sequenzspezifischen Primer, der über ein Hexethylen-Glykol-Molekül mit einer sequenzspezifischen Sonde in Haarnadelstruktur verbunden ist. Am 3' Ende der Sonde befindet sich ein nicht-fluoreszierender Quencher-Farbstoff und am 5' Ende ein Reporter-Farbstoff. Während der Anlagerungsphase öffnet sich die Haarnadelstruktur und hybridisiert an die komplementäre Sequenz des Amplikons. Der FRET-Effekt wird aufgehoben und die Reporterfluoreszenz emittiert. Das Hexethylen-Glykol-Molekül übernimmt die Funktion eines Stoppers, indem es die Synthese eines komplementären Stranges zur sequenzspezifischen Sonde in Haarnadelstruktur verhindert (MC KILLIP und DRAKE 2004).

- LUX (light upon extension) Primer:

An einem der beiden Primer ist ein einzelner Fluorophor lokalisiert, welcher in Abwesenheit der Zielsequenz durch die Quenching-Fähigkeit von Guanosin-Nukleotiden keine messbare Fluoreszenz aufweist. Die Guanosin-Nukleotide und der einzelne Fluorophor liegen in einer Haarnadelstruktur vor, die sich während der Anlagerungsphase öffnet und somit zur Fluoreszenz des Fluorophors führt (MC KILLIP und DRAKE 2004; MACKAY 2004).

Abhängig von der Art der verwendeten Real-Time-PCR-Geräte ist es möglich die Koamplifikation und -detektion mehrerer Zielsequenzen (= multiplex Real-Time PCR) in einer Reaktion durchzuführen, indem jede Zielsequenz in einem getrennten Filter mit der entsprechenden Wellenlänge detektiert wird (MC KILLIP und DRAKE 2004). Bei Verwendung der TaqMan Sonden werden verschiedene Reporter-Farbstoffe mit unterschiedlichen Ausstrahlungswellenlängen verwendet. Diese Eigenschaft ermöglicht das Mitführen einer internen Amplifikationskontrolle (IAC) (MÄDE et al. 2004).

Die PCR wird aufgrund ihrer schnellen und einfachen Anwendungsmöglichkeit bereits seit über 10 Jahren zur Diagnostik von pathogenen Keimen in Lebensmitteln eingesetzt (MÄDE et al. 2004; MC KILLIP und DRAKE 2004). Sie stellt eine Erfolg versprechende Methode zum Nachweis von pathogenen Keimen in Lebensmitteln dar (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Neben den oben genannten Vorteilen ermöglicht sie außerdem den direkten Nachweis der Pathogenitätsgene (MÄDE et al. 2004). Ein großer Nachteil der PCR ist allerdings, dass auch tote oder sublethal geschädigte Zellen detektiert werden, die für die lebensmittelrechtliche Beurteilung im Hinblick auf eine Gesundheitsgefährdung des

Verbrauchers keinerlei Bedeutung haben (SCHEU et al. 1998; JOHANNESSEN et al. 2000; MÄDE et al. 2004). Indem eine Anreicherung des Lebensmittels vor der PCR-Analyse durchgeführt wird, ist es möglich, die Detektion auf lebende Zellen zu beschränken (SCHEU et al. 1998; WAAGE et al. 1999; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Ein weiterer Nachteil besteht bei stark kontaminierten Lebensmitteln, die durch eine hohe Gesamtkeimzahl von $>10^6$ KBE/g einen hohen Gehalt an Fremd-DNA aufweisen. Aufgrund von Wechselbeziehungen zwischen der Bakterien-DNA und den PCR-Reagentien kann es hier zu einer verminderten Amplifikation kommen (KNUTSSON et al. 2002). Durch den Einsatz von selektiven Anreicherungsmedien kann das Wachstum der Begleitflora allerdings vermindert werden (LANTZ et al. 1998; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Des Weiteren ist beim Einsatz der PCR aus natürlichen Proben, aufgrund der inhibitorischen Komponenten der Lebensmittel, die Sensitivität im Vergleich zum alleinigen Einsatz von Reinkulturen herabgesetzt (ROSSEN et al. 1992; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003).

Auswertung:

Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgt Software-gestützt über die Messung der Fluoreszenz mit Hilfe des sogenannten C_t -Wertes (Threshold Cycle). Dieser markiert die Zyklenzahl, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über das Hintergrundrauschen ermittelt wird. Der C_t -Wert ist dabei antiproportional zur Menge an Ziel-DNA; je mehr Template zu Beginn der Reaktion vorhanden ist, desto weniger Zyklen sind erforderlich, um das Grundrauschen zu übersteigen (GIBSON et al. 1996; MACKAY 2004).

Bedingt durch die hohe Sensitivität der PCR sind falsch-positive Ergebnisse durch eine Kreuzkontamination mit Fremd-DNA, beispielsweise durch Haar- oder Hautzellen des Menschen, durch Aerosole oder durch verunreinigte Reagenzien möglich (NEWTON und GRAHAM 1994; BALLAGI-PORDÁNY und BELÁK 1996; WILSON 1997). Zur Vermeidung einer solchen Kontamination sollten die Arbeitsschritte der PCR stets mit Laborkitteln und Handschuhen unter einer sterilen Werkbank durchgeführt werden. Zur Dekontamination eignet sich die ultraviolette Bestrahlung oder eine Natriumhypochlorid-Lösung (NEWTON und GRAHAM 1994; WILSON 1997). Auch die Verwendung von unspezifischen Primern, vor allem bei niedrigen Anlagerungs-Temperaturen oder die Amplifikation von toten Zellen, können ebenfalls zu falsch-positiven Ergebnissen führen (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003).

Falsch-negative Ergebnisse der PCR kommen vor allem durch eine Inhibition durch inhibitorische Substanzen, durch Pipettierfehler oder durch funktionsuntüchtige PCR-

Reagenzien oder Thermocycler zustande (PALLEN et al. 1992; BALLAGI-PORDÁNY und BELÁK 1996; WILSON 1997; THISTED-LAMBERTZ et al. 1998; RÅDSTRÖM et al. 2003; HOORFAR et al. 2004). Aber auch das Vorkommen der thermostabilen Nukleasen bei *Y. enterocolitica*, die durch den alleinigen Erhitzungsschritt bei der DNA-Extraktion nicht entfernt werden, führen zu falsch-negativen Ergebnissen (NAKAJIMA et al. 1994). Um diese zuvor beschriebenen falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnisse auszuschließen, ist die Durchführung von Kontrollen für jede PCR notwendig (Kapitel 2.2.1.1).

2.2.1.1 Kontrollen

In der Methode L 00.00-45 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (N.N. 2006c) (= Übernahme der gleichnamigen nationalen Norm DIN EN ISO 22174:2005) ist das Mitführen von folgenden Kontrollen für den Nachweis von pathogenen Mikroorganismen mittels PCR vorgeschrieben:

- Positive PCR-Kontrolle
- Negative PCR-Kontrolle
- Interne oder externe Amplifikationskontrolle
- Positive Prozesskontrolle
- Negative Prozesskontrolle
- Negative Extraktionskontrolle

Die **positive PCR-Kontrolle** stellt demnach eine Reaktion dar, die die Ziel-DNA in einer festgelegten Menge oder Anzahl an Kopien enthält. Die **negative PCR-Kontrolle** ist eine Reaktion, die mit DNA-freiem Wasser und ohne PCR-Inhibitoren und demzufolge ohne die Zielsequenz durchgeführt wird. Sie dient der Überwachung von falsch-positiven Ergebnissen. Die positive und negative PCR-Kontrolle müssen bei jeder Probencharge in einem PCR-Lauf mitgeführt werden. Eine **interne Amplifikationskontrolle (IAC)** ist eine DNA, die zu jeder Reaktion in einer festgelegten Menge oder Anzahl an Kopien hinzugefügt wird und die als interne Kontrolle in dem gleichen Reaktionsansatz hinsichtlich der Amplifikation dient. Im Gegensatz dazu steht die **externe Amplifikationskontrolle (EAC)**, die zwar auch eine Kontroll-DNA darstellt, welche jedoch in einem getrennten Reaktionsansatz amplifiziert wird. Die Amplifikationskontrolle muss, im Gegensatz zu der positiven und negativen PCR-Kontrolle, bei jeder einzelnen PCR-Reaktion mitgeführt werden. Sie dient der Überwachung von falsch-negativen Ergebnissen. Welche Amplifikationskontrolle (intern oder extern) eingesetzt wird, bleibt dem Anwender überlassen; auch über die Art und Weise der Konstruktion der Amplifikationskontrollen wird keine Aussage getroffen.

Diese bisher genannten PCR-Kontrollen stellen Kontrollen für die Amplifikation und den Nachweis der entsprechenden Ziel-Gene dar. Um auch die Probenaufbereitung und die Nukleinsäureextraktion mitzukontrollieren, fordert die Amtliche Methode L 00.00-45 nach § 64 LFGB (N.N. 2006c) in regelmäßigen Abständen und immer dann, wenn eine der anderen Kontrollen nicht zu den erwarteten Ergebnissen führt, das Mitführen von zusätzlichen Kontrollen. Hierunter fallen eine positive und negative Prozesskontrolle, (Kontrolle der Probenaufbereitung und der Nukleinsäureextraktion) sowie die negative Extraktionskontrolle (Kontrolle der Nukleinsäureextraktion). Die **positive Prozesskontrolle** ist eine mit dem Zielkeim beimpfte Probe, die genauso wie die zu untersuchenden Proben behandelt wird. Die **negative Prozesskontrolle** ist eine Probe der Lebensmittelmatrix ohne den pathogenen Zielkeim, die sämtliche Stufen des analytischen Prozesses durchläuft. Bei der **negativen Extraktionskontrolle** werden alle Schritte der DNA-Extraktion ohne Zugabe des Untersuchungsmaterials durchgeführt. Die Häufigkeit der Durchführung dieser Kontrollen muss im Qualitätssicherungsprogramm des Labors festgelegt werden.

Amplifikationskontrollen:

Bei der Interpretation der Ergebnisse einer PCR ist es von entscheidender Bedeutung wahr-negative von falsch-negativen Ergebnissen unterscheiden zu können. Durch den Einsatz von Amplifikationskontrollen können falsch-negative Ergebnisse, meistens bedingt durch eine Inhibition der PCR, ausgeschlossen werden. Ohne das Mitführen von Amplifikationskontrollen kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob das Ergebnis der PCR tatsächlich negativ war oder ob inhibitorische Faktoren zur Inhibition der PCR geführt haben (HOORFAR et al. 2004). Die inhibitorischen Faktoren können sowohl biologischen (z.B. Hämoglobin, Harnstoff, Begleitflora) als auch chemischen Ursprungs (z.B. Heparin, Phenole) sein oder aus Inhaltsstoffen von Lebensmitteln (z.B. Glykogen, Fett, Calcium, Proteine) stammen. Die Mechanismen der Inhibition sind vielfältig: die Inhibitoren können beispielsweise die Lyse der Zellen, die Isolierung der Nukleinsäure oder die Aktivität der DNA-Polymerase beeinflussen. Selbst zum Abbau von bereits amplifizierter DNA kann es mitunter kommen. Das Auftreten der Inhibition erfolgt entweder als totale oder als partielle Inhibition. Bei der totalen Inhibition kommt es zu falsch-negativen Ergebnissen, wohingegen die partielle Inhibition sich in einem Verlust an Sensivität widerspiegelt (WILSON 1997). So konnten ROSSEN et al. (1992) die inhibitorische Wirkung von zahlreichen Anreicherungsmedien (z.B. Fraser, Rappaport), von Verbindungen, die zur DNA-Extraktion verwendet werden (z.B. Natronlauge, Alkohole, Lysozyme) und von zahlreichen Lebensmittelinhaltsstoffen (z.B. Saccharose, Lecithin) aufzeigen. Eine Inhibition der PCR ist auch durch eine zu hohe Konzentration an Ziel-DNA (WANG et al. 1992; LANTZ et al. 1998) sowie durch eine zu hohe Konzentration an Begleitkeimen möglich (TEBBE und VAHJEN

1993; WILSON 1997). Neben den inhibitorischen Wirkungen von Substanzen in den Probenmaterialien kommen als Ursache der Inhibition auch defekte Thermocycler, fehlerhafte Master Mixe oder eine zu geringe Enzymaktivität der DNA-Polymerase in Frage (RÅDSTRÖM et al. 2003; HOORFAR et al. 2004).

Bei den Amplifikationskontrollen können externe und interne Amplifikationskontrollen unterschieden werden. Bei der externen Amplifikationskontrolle (EAC) findet die Amplifikation in einem von der Ziel-DNA unterschiedlichen Reaktionsgefäß statt. Ihr Vorteil liegt in der einfachen Anwendbarkeit; jedoch liefert sie nur allgemeine Informationen über den PCR-Lauf und ist nicht in der Lage, die PCR Effizienz in den einzelnen Reaktionsgefäßen zu ermitteln (BALLAGI-PORDÁNY und BELÁK 1996).

Die interne Amplifikationskontrolle (IAC) stellt eine Nicht-Ziel-DNA dar, die zu jeder Probe in einer festgelegten Anzahl an Kopien hinzugefügt und die gleichzeitig mit der Ziel-DNA in demselben Reaktionsgefäß unter denselben Bedingungen amplifiziert wird. Ihre Zuverlässigkeit ist im Vergleich zur EAC erhöht, da sie in der Lage ist, die Inhibition jedes einzelnen Reaktionsgefäßes zu ermitteln (BALLAGI-PORDÁNY und BELÁK 1996; HOORFAR et al. 2004). Je nach Art des Einsatzes in der PCR werden kompetitive und nicht-kompetitive IAC's unterschieden. Bei der kompetitiven IAC wird zur Amplifikation der Ziel-DNA und der IAC ein identisches Primerpaar verwendet. Eine gegenseitige Konkurrenz von Ziel-DNA und IAC um das eingesetzte Primerpaar ist somit die Folge. Um die gleichzeitige Amplifikation zweier verschiedener DNA-Fragmente zu ermöglichen, müssen daher bei dieser Form der IAC zwei wichtige Parameter beachtet werden:

Der erste Parameter bezieht sich auf die Größe der IAC. Diese sollte stets größer als die Ziel-DNA sein, um die Reaktion in Richtung der kleineren Ziel-DNA zu lenken. Der zweite Parameter hingegen bezieht sich auf die Konzentration der IAC. Hierbei muss die niedrigste Konzentration an IAC sorgfältig mit Hilfe einer dezimalen Verdünnungsreihe ermittelt werden, die gerade noch in der Lage ist, ein positives Signal zu erzielen, ohne jedoch die Amplifikation der Ziel-DNA zu beeinflussen. Bei zu hoher Konzentration an IAC kommt es andernfalls zu einem Abbau des Ziel-Signals, was zu falsch-negativen Ergebnissen führt. Bei der Beurteilung muss berücksichtigt werden, dass das Ergebnis bei einer positiven Amplifikation der Ziel-DNA und gleichzeitigem negativen Signal der IAC als positiv zu bewerten ist. In diesem Fall lag die Ziel-DNA in sehr hoher Konzentration vor. Bei gleichzeitiger negativer Amplifikation von Ziel-DNA und IAC wurde die PCR inhibiert und das Ergebnis besitzt keine Gültigkeit. Als Nachteil der kompetitiven IAC muss allerdings mit einer

herabgesetzten Nachweisgrenze gerechnet werden (SACHADYN und KUR 1998; HOORFAR et al. 2004).

Für die Herstellung der kompetitiven IAC für die konventionelle oder Real-Time PCR existieren verschiedene Möglichkeiten. Ein Ansatz stellt die Konstruktion von sogenannten „Mimics“ dar. Diese werden durch Modifikation der Ziel-DNA durch Deletion oder Insertion zwischen den Primer-Anlagerungsstellen hergestellt. Dabei kommen Restriktionsenzyme und DNA-Ligasen zum Einsatz, wobei häufig ein aufwändiger Klonierungsschritt nötig ist. Ziel-DNA und IAC dürfen bei dieser Konstruktion einerseits nicht zu heterolog sein, da beide Sequenzen unter denselben Bedingungen amplifiziert werden müssen. Andererseits sollten sie aber auch nicht zu homolog sein, da es gegebenenfalls zur Bildung von Heteroduplexen kommen kann, die die Nachweisgrenze der Ziel-DNA herabsetzen können. Ein großer Nachteil dieser Methode ist ihr hoher Arbeits- und Zeitaufwand (SACHADYN und KUR 1998; ABDULMAWJOOD et al. 2002; HOORFAR et al. 2004). Ebenfalls weniger günstig ist die Größe der IAC. Sie ist in der Regel, bedingt durch die Modifikationen, kleiner als die Ziel-DNA, was zu einer effizienteren Amplifikation der IAC führt (BALLAGI-PORDÁNY und BELÁK 1996; HOORFAR et al. 2004).

Eine weitere Möglichkeit stellt die Konstruktion der IAC über die sogenannte „composite primer technology“ dar (SIEBERT und LARRICK 1992; LORENZ et al. 1995, BALLAGI-PORDÁNY und BELÁK 1996; SACHADYN und KUR 1998; HOORFAR et al. 2004). Hierfür werden Primer (= zusammengesetzte Primer) eingesetzt, die an dem 5' Ende überhängende Enden besitzen, die identisch mit den diagnostischen Primern der Ziel-DNA sind. Die 3' Enden dieser Primer sind komplementär zu einer DNA-Sequenz, die völlig heterolog von der Ziel-Sequenz ist. Hierfür wird häufig das Plasmid *pUC19* von *Escherichia coli* eingesetzt. Die Länge und Sequenz der IAC kann mit dieser Methode individuell bestimmt werden. Ein großer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Bildung von Heteroduplexen durch die starken Unterschiede in den DNA-Sequenzen vermieden werden kann. Die Konstruktion einer solchen IAC ist wenig zeitaufwändig und günstig (SACHADYN und KUR 1998; HOORFAR et al. 2004). Beispielhaft soll die Konstruktion einer solchen IAC mit den zusammengesetzten Primern und dem *pUC19* als Template anhand einer Abbildung nach SACHADYN und KUR (1998) sowie ABDULMAWJOOD et al. (2002) erläutert werden (Abbildung 1):

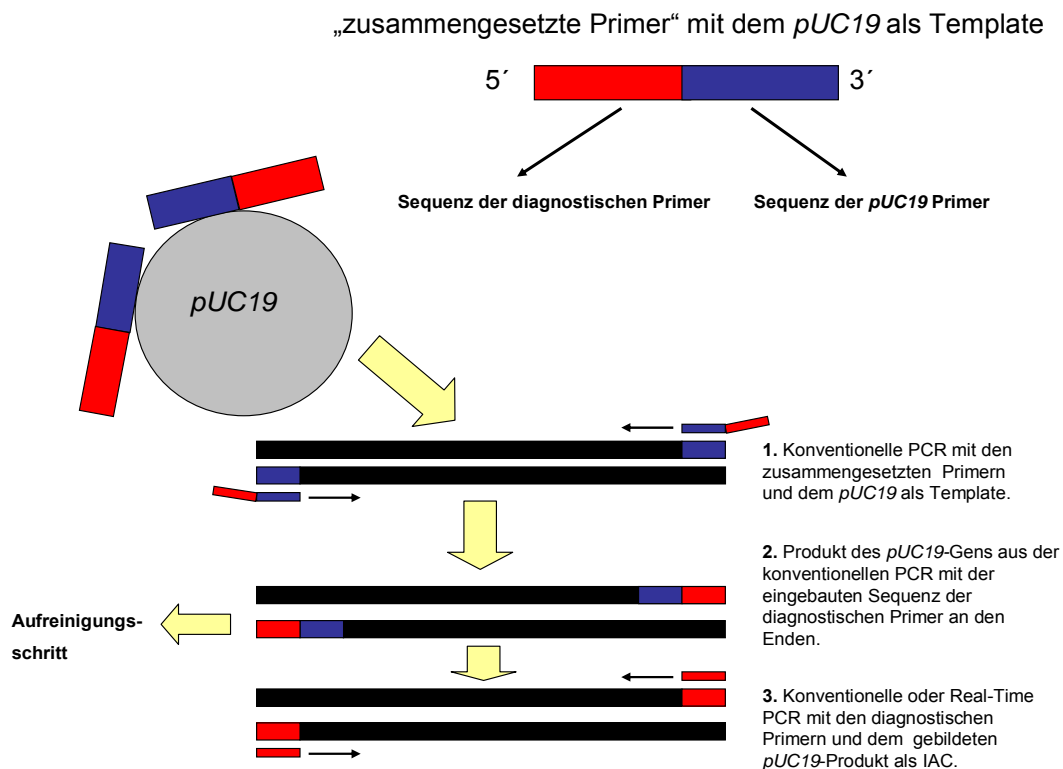


Abbildung 1: Schema der Konstruktion der IAC über die composite primer technology, beispielhaft mit dem *pUC19* als Template (nach SACHADYN und KUR 1998; ABDULMAWJOOD et al. 2002)

In einem ersten konventionellen PCR-Schritt wird das *pUC19* als Template mit den zusammengesetzten Primern (5' Ende: Sequenz der diagnostischen Primer, 3' Ende: Sequenz der *pUC19* Primer) amplifiziert. Die Sequenz der am 5' Ende lokalisierten diagnostischen Primer wird in das entstehende Produkt des *pUC19*-Gens eingebaut, so dass dieses an seinen Enden von der Sequenz der diagnostischen Primer flankiert wird (SIEBERT und LARRICK 1992). Somit besitzt die hergestellte IAC die gleichen Primeranlagerungsstellen wie die Ziel-DNA (MÜLLER et al. 1998). Dadurch sind die diagnostischen Primer der konventionellen oder Real-Time PCR in der Lage, sowohl die Sequenz der Ziel-DNA als auch die Sequenz des *pUC19* als IAC gleichzeitig zu amplifizieren. Eine derart hergestellte IAC kann nach einem Aufreinigungsschritt und nach der Ermittlung der optimalen kleinsten Konzentration sowohl in die konventionelle wie auch in die Real-Time PCR eingesetzt werden.

Die Unterscheidung von Ziel-DNA und IAC erfolgt bei der konventionellen PCR über die Größe der Amplifikate. Bei der Real-Time PCR mit SYBR Green werden Ziel-DNA und IAC anhand der unterschiedlichen Schmelzkurven unterschieden. Voraussetzung dafür ist eine

unterschiedliche Schmelztemperatur beider Produkte. Bei der Real-Time PCR mit fluoreszenzmarkierten Sonden werden für die Ziel-DNA und IAC unterschiedlich markierte Sonden eingesetzt. Die Farbstoffe der Sonden besitzen unterschiedliche Emissionswellenlängen, so dass die Kodetektion ermöglicht wird. Für die Ziel-DNA wird gewöhnlich der Reporter-Farbstoff FAM eingesetzt, für die IAC hingegen können z. B. die Reporter-Farbstoffe VIC, JOE oder TET eingesetzt werden (HOORFAR et al. 2004).

Da die Konzentration der IAC in niedrigen Konzentrationen in nukleasefreiem Wasser abnimmt, sollte die IAC in möglichst hohen Konzentrationen in einem alkalischen Puffer (z.B. TRIS-EDTA (TE)-Puffer) zur Stabilisierung eingefroren werden (LÜBECK et al. 2003; HOORFAR et al. 2004); ebenso sollten zur Lagerung keine Gefäße aus Polypropylen verwendet werden, da es zu einer Denaturierung der IAC-DNA durch Interaktion mit der Gefäßwand kommen kann (HOORFAR et al. 2004).

Bei der nicht-kompetitiven IAC dagegen, werden zwei verschiedene Primerpaare zur Amplifikation von Ziel-DNA und IAC eingesetzt. Es müssen daher zwei verschiedene PCR Reaktionen entwickelt werden, die unter den gleichen Bedingungen funktionieren. Um die Konkurrenz beider Reaktionen um die dNTP's und die DNA-Polymerase zu begrenzen, sollten suboptimale Konzentrationen der IAC-Primer eingesetzt werden. Dadurch wird die Amplifikation der IAC im Vergleich zur Ziel-DNA beschränkt. Am geläufigsten ist der Einsatz der 16S oder 23S rDNA als IAC-Sequenz. Durch Unterschiede in den Primer-Sequenzen spiegelt die Amplifikation der IAC jedoch nicht genau die Verhältnisse der Amplifikation der Ziel-DNA wieder. Der größte Vorteil der nicht-kompetitiven IAC besteht darin, dass sie für verschiedene PCR-Reaktionen in demselben Labor eingesetzt werden kann (HOORFAR et al. 2004).

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die bisher verwendeten Amplifikationskontrollen in Lebensmitteln oder Reinkulturen zum Nachweis von *Y. enterocolitica* mittels PCR.

Tabelle 3: PCR-Verfahren mit Amplifikationskontrollen zum Nachweis von *Y. enterocolitica*

Gen	PCR-Art	Art der Amplifikationskontrolle		Proben	Quelle
		extern	intern		
			kompetitiv		
<i>virF</i>	konventionelle PCR		über Mimics	Reinkulturen	PALLEN et al. (1992)
<i>ail</i>	konventionelle PCR		über zusammengesetzte Primer, Template: humane β -actin DNA	künstlich kontaminierter Blauschimmelkäse	THISTED LAMBERTZ et al. (1998)
<i>per</i>	TaqMan Real-Time PCR			Reinkulturen	JACOBSEN et al. (2005)
<i>ail</i>	TaqMan Real-Time PCR				Template: Virale Hämorrhagische Septikämie Virus
<i>ail</i>	TaqMan Real-Time PCR				Template: <i>pUC18</i>
<i>ail</i>	TaqMan Real-Time PCR				Template: <i>pUC19</i>
<i>ail</i>	konventionelle PCR		über zusammengesetzte Primer, Template: humane β -actin DNA	Hackfleisch, Rohwurst	BfR (2007) nach MÄDE
<i>ail</i>	konventionelle PCR (nested PCR)		über zusammengesetzte Primer, Template: humane β -actin DNA	Hackfleisch, Rohwurst	BfR (2007) nach FREDRIKSSON-AHOMAA
<i>yadA</i>	konventionelle PCR (nested PCR)		über zusammengesetzte Primer, Template: humane β -actin DNA	Hackfleisch, Rohwurst	THISTED LAMBERTZ et al. (2007)

2.2.1.2 Probenvorbereitung

Beim Einsatz der PCR zum Nachweis von pathogenen Keimen aus Lebensmitteln ist in der Regel eine vorherige Anreicherung nötig. Diese verfolgt das Ziel, die Zahl der pathogenen Zielkeime zu erhöhen, um bei einer geringen Keimzahl detektierbare Konzentrationen zu erreichen. Außerdem erhöht sie die Wahrscheinlichkeit, lebende Zellen zu detektieren (THISTED LAMBERTZ et al. 2000). Durch den Einsatz von selektiven Anreicherungsmedien wird zudem das Wachstum der Begleitflora vermindert, was zu einer erhöhten Nachweisgrenze der PCR führt (LANTZ et al. 1998). Bei der Anwendung der PCR aus natürlichen Lebensmittelproben muss allerdings, aufgrund der komplexen Zusammensetzung und der inhibitorischen Komponenten der Lebensmittel, mit einer herabgesetzten Sensitivität im Vergleich zum alleinigen Einsatz von Reinkulturen gerechnet werden (ROSSEN et al. 1992; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Daher ist die Effizienz der Probenvorbereitung maßgeblich an der Sensitivität der PCR beteiligt. Sie dient der Entfernung von PCR inhibitorischen Substanzen, der Konzentrierung der Zielzellen sowie der Gewinnung der DNA (LANTZ et al. 1998). Verschiedene Techniken werden hierfür eingesetzt:

Die Zentrifugation der Probe als alleiniges Verfahren dient der Konzentrierung der Zielorganismen; gleichzeitig kommt es hierbei allerdings auch zu einer Anhäufung der inhibitorischen Partikel (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Bei der Buoyant

density centrifugation erfolgt die Zentrifugation der Probe mit Lösungen unterschiedlicher Dichte. Die Bestandteile des Lebensmittels und die inhibitorischen Substanzen verbleiben aufgrund ihrer geringeren Dichte im oberen Bereich, während die lebenden Bakterien sich im unteren Bereich ansammeln (LINDQVIST et al. 1997). Dies führt zu einer Konzentrierung der Zielorganismen bei gleichzeitiger Entfernung inhibitorischer Substanzen (LANTZ et al. 1998; THISTED LAMBERTZ et al. 2000; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Zur Bindung der Bakterienzellen verwendet die Immunomagnetische Separation paramagnetische Partikel, die mit Antikörpern überzogen sind. Dadurch werden die inhibitorischen Komponenten abgetrennt; gleichzeitig erfolgt auch eine Konzentrierung der Zielorganismen (KAPPERUD et al. 1993; SCHEU et al. 1998). Bei den Silikabasierenden Verfahren wird die DNA an eine Matrix gebunden, um die inhibitorischen Substanzen auszuspülen. Anschließend kann die gereinigte DNA gewonnen werden (SCHEU et al. 1998).

Durch die Verdünnung von stark kontaminierten Lebensmittelproben kann eine Inhibition der PCR durch hohe Konzentration an Nicht-Ziel-DNA oder durch andere inhibitorische Komponenten verhindert werden. Bei einer geringen Konzentration an Template-DNA kann es allerdings zu einer herabgesetzten Sensitivität kommen, da die Zielzellen ebenfalls verdünnt werden (SCHEU et al. 1998; WAAGE et al. 1999; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Hitze dient der Denaturierung der Zellwände der Mikroorganismen, um die DNA zu extrahieren und um hitzelabile PCR Inhibitoren zu inaktivieren. Für die Untersuchung von natürlichen Proben auf das Vorkommen von pathogenen *Y. enterocolitica* ist die Hitzebehandlung jedoch nicht ausreichend (KANEKO et al. 1995; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Der Einsatz von Proteinase K dient ebenfalls der Gewinnung der DNA. Hierbei werden sowohl die Zellwandproteine als auch die inhibitorischen Substanzen abgebaut. Darüber hinaus kommt es zu einer Zerstörung der bei *Y. enterocolitica* vorkommenden hitzestabilen Nukleasen, die zu einem Abbau der PCR-Produkte führen können (NAKAJIMA et al. 1994; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003).

In der Zwischenzeit sind zahlreiche kommerzielle Kits zur DNA-Aufreinigung und Isolierung erhältlich. LANTZ et al. (1998) untersuchte die Nachweisgrenze von verschiedenen Anreicherungsmedien für *Y. enterocolitica* mit unterschiedlichen Aufreinigungsmethoden. Die niedrigste Nachweisgrenze konnte mit der selektiven ITC-Anreicherung und anschließender Buoyant density centrifugation erzielt werden. Auch THISTED-LAMBERTZ et al. (2007) verglich zwei kommerziell erhältliche Kits (PrepMan[®] Ultra Sample Preparation Reagent von APPLIED BIOSYSTEMS und DNeasy[®] Blood & Tissue Kit von QIAGEN) mit der Buoyant

density centrifugation zur Aufreinigung von künstlich kontaminiertem Hackfleisch und Rohwürsten (mit *Y. enterocolitica*). Ohne eine Voranreicherung lieferte der DNeasy® Blood & Tissue Kit von QIAGEN das beste Ergebnis, während nach einer eintägigen Anreicherung mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit von QIAGEN und der Buoyant density centrifugation vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden. HARTMANN (2007) konnte durch vergleichende Untersuchungen von Schweinefleischproben auf *Y. enterocolitica* mit Hilfe dreier kommerziell erhältlicher Kits (DNeasy® Blood & Tissue Kit von QIAGEN, Genomic Tissue Kit von BIORAD und InstaGene™ Matrix von BIORAD) die höchste Nachweisrate mit dem Genomic Tissue Kit von BIORAD erzielen.

Für viele der kommerziell erhältlichen Kits stehen bereits automatisierte Geräte zur Verfügung, die die Probenaufreinigung durchführen. Hieraus resultiert eine deutliche Zeitersparnis sowie die Reduzierung der Kreuzkontamination (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Auch die Methode L 00.00-109 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (N.N. 2007b) (= Übernahme der gleichnamigen nationalen Norm DIN EN ISO 20837:2006) beschäftigt sich eingehend mit der Probenvorbereitung, indem mögliche Anreicherungsschritte sowie DNA-Extraktionsverfahren detailliert dargestellt werden.

2.2.1.3 Zielgene zum Nachweis von *Y. enterocolitica*

Zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* aus Reinkulturen, Lebensmitteln oder klinischen Proben wurden zahlreiche konventionelle PCR-Verfahren entwickelt, die sowohl auf dem Chromosom als auch auf dem Virulenzplasmid lokalisierte Zielgene detektieren (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003).

Zu den **chromosomalen Zielgenen** gehört das *ail-Gen*, welches das am häufigsten eingesetzte Zielgen darstellt (FENWICK und MURRAY 1991; NAKAJIMA et al. 1992; WEYNANTS et al. 1996; NMKL 1998; THISTED LAMBERTZ et al. 2000; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Es konnte bisher nur bei pathogenen *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden (MILLER et al. 1989; JOURDAN et al. 2000). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass auch *Y. pseudotuberculosis* zum Teil homologe *ail*-Sequenzen zu *Y. enterocolitica* aufweist (MILLER et al. 1989; JOURDAN et al. 2000; THISTED-LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM 2005). Das *inv-Gen* (RASMUSSEN et al. 1994) stellt ein weiteres chromosomales Zielgen dar, welches bei allen *Y. enterocolitica* vorkommt. Jedoch besitzt es nur bei den pathogenen Stämmen eine volle Funktionsfähigkeit (NEUBAUER et al. 2001a). Auch hier gilt, dass *Y. pseudotuberculosis* ein homologes *inv-Gen* besitzt. Eine Unterscheidung der zwei Spezies anhand des *inv*-Gens ist somit nicht möglich (PEPE und

MILLER 1990; NAKAJIMA et al. 1992). Ein weiteres chromosomales Zielgen ist das yst (IBRAHIM et al. 1997; WANG et al. 1997; ÖZBAS et al. 2000), dessen Rolle für die Pathogenität von Yersinien allerdings noch unklar ist (NEUBAUER et al. 2001a). Es konnte bereits bei weiteren *Enterobacteriaceae*-Spezies (KWAGA et al. 1992) sowie bei *Y. kristensenii* nachgewiesen werden (IBRAHIM et al. 1992a, 1997; JOURDAN et al. 2000). Es ist in der Lage Sequenzunterschiede zwischen den amerikanischen und europäischen Stämmen aufzuzeigen (IBRAHIM et al. 1992b). Mit Hilfe von rbc-spezifischen Primern (WEYNANTS et al. 1996; THISTED-LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM 2005) des chromosomalen *rbc*-Operons kann der pathogene Serotyp 0:3 von *Y. enterocolitica* identifiziert werden (NEUBAUER et al. 2001a). Auch die *Yersinia*-spezifische Region der 16S rRNA wird häufig eingesetzt, um *Yersinia*-Spezies zu detektieren (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003; SEN 2000).

Zu den **plasmidkodierten Zielgenen** zählt das virF-Gen sowie das yadA-Gen. Zahlreiche Verfahren mit *virF*-spezifischen Primern wurden bereits beschrieben (WREN und TABAQCHALI 1990; FENG et al. 1992; THISTED-LAMBERTZ et al. 1996). *Y. pseudotuberculosis* besitzt ebenfalls das *virF*-Gen, so dass eine PCR auf der Grundlage dieses Gens keine Unterscheidung der zwei Spezies erlaubt (WREN und TABAQCHALI 1990; NEUBAUER et al. 2001a). Auch für das *yadA*-Gen wurden mehrere Verfahren beschrieben (KAPPERUD et al. 1993; BLAIS und PHILLIPPE 1995; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999). Außer bei pathogenen *Y. enterocolitica* ist das *yadA*-Gen auch bei *Y. pseudotuberculosis* vorhanden, jedoch bietet das *yadA*-Gen den Vorteil, dass es Sequenzen aufweist, welche ausschließlich bei pathogenen *Y. enterocolitica* vorkommen (NEUBAUER et al. 2001a). PCR-Verfahren, die plasmidkodierte Zielgene nachweisen, können aufgrund eines möglichen Plasmidverlustes zu falsch-negativen Ergebnissen führen (NEUBAUER et al. 2001a). Daher wurden in der Vergangenheit zahlreiche PCR-Verfahren (NAKAJIMA et al. 1992; KANEKO et al. 1995; BLAIS und PHILLIPPE 1995; WEYNANTS et al. 1996) entwickelt, die eine gleichzeitige Amplifikation von chromosomalen und plasmoidalen Zielgenen erlauben (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003).

In der Zwischenzeit existieren mehrere Real-Time PCR Verfahren zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* aus Lebensmitteln. JOURDAN et al. (2000), BOYAPALLE et al. (2001) und FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2006b) beschreiben jeweils eine Real-Time PCR auf der Grundlage des *ail*-Gens. WOLFFS et al. (2004) beschreibt eine Real-Time PCR auf der Grundlage der 16S rRNA. JACOBSEN et al. (2005) entwickelte eine Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis des Serotyps 0:9 mit Hilfe des *per*-Gens. Eine Real-Time PCR

auf der Grundlage des *yst*-Gens wurde ebenfalls beschrieben (VISHNUBHATLA et al. 2000, 2001).

2.2.2 Kolonie-DNA-Hybridisierung

Die Kolonie-DNA-Hybridisierung ist ein weiteres molekularbiologisches Verfahren zum Nachweis pathogener *Y. enterocolitica*. Gleichzeitig stellt sie allerdings auch ein kulturelles Verfahren dar, mit dem Ziel der Isolierung der pathogenen Zielkeime. Die Hybridisierung bezeichnet die Zusammenlagerung zweier komplementärer Nukleinsäurestränge zu einem Doppelstrang. Bei der Kolonie-DNA-Hybridisierung erfolgt die Hybridisierungsreaktion zwischen der bakteriellen DNA, welche auf eine Membran transferiert und fixiert wurde und einer komplementären, markierten Sonde (HOFF et al. 2002).

Die zur Hybridisierung eingesetzten Sonden binden an chromosomal- oder plasmidkodierte Virulenzfaktoren der bakteriellen DNA (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Zur Herstellung der markierten Sonde wird in der Regel die PCR verwendet. Die Markierung erfolgt während der Amplifikationsphase mit dem nichtradioaktiven Digoxigenin, welches sich an jede zwölfte Base anlagert. Die entstehenden Sonden (Polynukleotidsonden) sind circa 100 bis 600 Basenpaare (bp) lang und somit unempfindlicher gegenüber kleinen Veränderungen der Hybridisierungs- und Waschbedingungen. Mit Digoxigenin markierte Sonden sind bei -20 °C für mehr als 8 Monate haltbar und können mehrere Male verwendet werden. Früher wurden häufig geklonte Sonden eingesetzt, welche mit radioaktiven Isotopen (z.B. ³²P) markiert wurden. Aufgrund der sehr begrenzten Haltbarkeit (Halbwertszeit von ³²P beträgt 14 Tage), den besonderen Sicherheitsmaßnahmen sowie der mühsamen und kostspieligen Entsorgung werden radioaktiv markierte Sonden allerdings nur noch selten eingesetzt (WEAGANT et al. 1999).

Zur Durchführung der Kolonie-DNA-Hybridisierung werden circa 100-200 µl des homogenisierten Lebensmittels auf entsprechende Nährböden ausgespatelt, welche im Anschluss bebrütet werden. Eine Membran wird auf den mit Kolonien bewachsenen Nährboden (= Mutterplatte) gelegt und nach einer kurzen Einwirkzeit abgezogen (HILL und KEASLER 1991). Problematisch kann in diesem Zusammenhang die unvollständige Adhäsion der Kolonien an die Membran sein. WEAGANT et al. (1999) empfehlen daher die Membran auf den Nährboden auszulegen, dann die Probe direkt auf der Membran auszuspätern und erst danach zu bebrüten. In weiteren Arbeitsschritten werden die Bakterienzellen auf der Membran mit Hilfe verschiedener Lösungen lysiert. Im Anschluss wird die DNA durch ultraviolettes Licht oder Hitze auf der Membran fixiert (HILL und

KEASLER 1991; HOFF et al. 2002). Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wird die Membran zunächst vorhybridisiert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgt durch Zuführen der mittels PCR-Verfahren hergestellten Sonde, welche an den komplementären Abschnitt der bakteriellen DNA bindet. Die Hybridisierung findet in einem Hybridisierungsofen bei der ermittelten optimalen Hybridisierungstemperatur statt. Die optimale Hybridisierungstemperatur errechnet sich über die Schmelztemperatur und ist abhängig von der Zusammensetzung und Länge der Sonde sowie von dem zur Hybridisierung eingesetzten Puffer. Die optimale Hybridisierungstemperatur liegt 20 °C bis 25 °C unter der errechneten Schmelztemperatur (ROCHE 2000, 2003, 2004; HOFF et al. 2002). Nach der Hybridisierung wird die Membran mittels verschiedener Waschlösungen gewaschen, um unspezifisch gebundene Proben zu entfernen (ROCHE 2000, 2003, 2004). Die immunologische Detektion der gebundenen, mit Digoxigenin markierten Sonde, erfolgt über eine Antigen-Antikörper-Reaktion durch Zugabe eines Antikörpers, welcher mit einem Enzym markiert ist. Das Enzym spaltet bei der anschließenden Färbung die chromogenen Substrate und löst somit die Farbbildung aus. Radioaktiv markierte Sonden hingegen werden mit Hilfe der Autoradiographie detektiert. Anhand der positiven Farbsignale können die Kolonien mit Hilfe der Mutterplatte identifiziert und isoliert werden (HILL und KEASLER 1991; ROCHE 2000, 2003, 2004).

Die Kolonie-DNA-Hybridisierung benötigt zur Durchführung keine Reinkulturen, dies ermöglicht im Vergleich zu anderen kulturellen Verfahren eine schnellere Detektion der pathogenen Zielkeime (HILL et al. 1983; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Sie ist außerdem in der Lage durch den Einsatz der Hybridisierungssonde, direkt auf den Mutterplatten zwischen pathogenen und apathogenen *Y. enterocolitica* unterscheiden zu können (DURISIN et al. 1997). Des Weiteren ermöglicht sie, im Vergleich zu den PCR-basierenden Verfahren, den Nachweis von ausschließlich lebenden Kolonien (JOHANNESSEN et al. 2000). Die Ergebnisse sind jedoch abhängig von der Begleitflora; bei Gesamtkeimzahlen von circa 10^6 - 10^7 KbE/g Lebensmittel wird die Effizienz der Hybridisierung reduziert, da das Wachstum der Zielzellen durch die hohe Begleitflora reduziert ist (HILL et al. 1985; JAGOW und HILL 1988; HILL und KEASLER 1991; DURISIN et al. 1997; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Nach HILL und KEASLER (1991) erfordern Kolonie-DNA-Hybridisierungs-Verfahren 10^5 bis 10^6 Kopien der Zielsequenz, um ein positives Signal zu bilden. Wird die Kolonie-DNA-Hybridisierung anhand des gebildeten Hybridisierungssignals beurteilt, weist sie dennoch eine höhere Sensitivität als kulturelle Nachweisverfahren auf (NESBAKKEN et al. 1991a; GOVERDE et al. 1993). Durch Verwendung von Selektivnährböden sowie Selektivanreicherungen ist eine Steigerung der Sensitivität möglich (HILL et al. 1983; JAGOW und HILL 1986). Bei vergleichenden

Untersuchungen von GOVERDE et al. (1993) zum Einsatz der selektiven Nährböden SSDC und CIN zur Hybridisierung, erwies sich letzterer als geeigneter.

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über Untersuchungen zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln und Reinkulturen mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung:

Tabelle 4: Übersicht über Untersuchungen von Lebensmitteln und Reinkulturen mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung auf *Y. enterocolitica*

Keim	Hybridisierungssonde		Proben	Quelle
	Gen	Art der Sonde		
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>yadA</i>	Oligonukleotidsonde, radioaktiv markiert	Reinkulturen, künstlich kontaminiertes Schweinefleisch	KAPPERUD et al. 1990
	<i>yadA</i>	Polynukleotidsonde, radioaktiv markiert	Reinkulturen, künstlich kontaminiertes Schweinefleisch	KAPPERUD et al. 1990
	<i>yadA</i>	Oligonukleotidsonde, radioaktiv markiert	natürlich kontaminierte Schweineprodukte	NESBAKKEN et al. 1991a
	<i>ail, inv</i>	Polynukleotidsonden, mit Digoxigenin markiert	Reinkulturen, natürlich kontaminierte Schweinezungen	GOVERDE et al. 1993
	<i>yst</i>	Polynukleotidsonde, mit Digoxigenin markiert	künstlich kontaminiertes Schweinefleisch und Milch, natürlich kontaminiertes Schweinefleisch und Milch	DURISIN et al. 1997
	<i>virF, yadA</i>	Polynukleotidsonden, mit Digoxigenin markiert	Reinkulturen, künstlich kontaminierte Schokoladenmilch und Tofu	WEAGANT et al. 1999
	<i>ail</i>	Polynukleotidsonde, mit Digoxigenin markiert	natürlich kontaminiertes Schweinefleisch	GRÖTZBACH 2007

3 Validierung mikrobiologischer Verfahren

Mit der Validierung soll eine Methode anhand von Laboruntersuchungen möglichst gut charakterisiert und deren Eignung für den vorgesehen Zweck belegt werden. Im Gegensatz zu chemischen Methoden können bei mikrobiologischen Prüfverfahren Messunsicherheiten oft nicht genau bestimmt werden, weil lebende Materie gemessen wird, die sich dynamisch in Bezug auf Vermehrung, Absterben, Schädigung und Inaktivierung verhält (HÜBNER et al. 2002).

3.1 DIN EN ISO 16140:2003

Mit der DIN EN ISO 16140:2003 (Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren) steht eine normierte internationale Arbeitsvorschrift zur Validierung von qualitativen und quantitativen Verfahren auf dem Gebiet der mikrobiologischen Untersuchung von Lebensmitteln und Futtermitteln zur Verfügung. Bei qualitativen Verfahren geht es um die Frage, ob Mikroorganismen in einer bestimmten Matrix vorhanden sind oder nicht, während es bei quantitativen Verfahren um die Überwachung von Grenzwerten geht. Die Validierung umfasst demnach in der ersten Phase eine Verfahrensvergleichsuntersuchung des alternativen Verfahrens gegenüber dem Referenzverfahren sowie in der zweiten Phase einen Ringversuch mit jedem der beiden Verfahren. Die **Verfahrensvergleichsuntersuchung von qualitativen Verfahren** umfasst die Ermittlung der relativen Genauigkeit, der relativen Spezifität, der relativen Empfindlichkeit (= Sensitivität), der Positivabweichung, der Negativabweichung, der relativen Nachweisgrenze, der Inklusivität sowie der Exklusivität. Tabelle 5 und Tabelle 6 listen die Definitionen und Berechnungen der Validierungskriterien gemäß DIN EN 16140:2003 auf.

Tabelle 5: Definitionen und Berechnungen der Validierungskriterien (nach DIN EN ISO 16140:2003)

Validierungskriterium	Definition	Formel
relative Genauigkeit	Grad der Übereinstimmung zwischen dem durch das Referenzverfahren erzielten und dem durch das alternative Verfahren erzielten Ergebnis bei identischen Proben.	$(a + d)/n \times 100$
Positivabweichung	Wenn das alternative Verfahren ein Positivergebnis ergibt, während das Referenzverfahren ein Negativergebnis ergibt und es dabei eine Positivabweichung zeigt, wird es falsch positiv. Eine Positivabweichung wird als richtig positiv angesehen, wenn das wahre Ergebnis als positiv bewiesen werden kann.	/
Negativabweichung	Das alternative Verfahren zeigt eine Negativabweichung, wenn es ein Negativergebnis erbringt, während das Referenzverfahren ein Positivergebnis erbringt.	/
relative Spezifität	Eignung des alternativen Verfahrens, den Analyt nicht nachzuweisen, wenn er mit dem Referenzverfahren nicht nachgewiesen wird.	$d/(c + d) \times 100$
relative Empfindlichkeit (= Sensitivität)	Eignung des alternativen Verfahrens, den Analyt nachzuweisen, wenn er mit dem Referenzverfahren nachgewiesen wird.	$a/(a + b) \times 100$
relative Nachweisgrenze	Kleinste Anzahl anzüchtbarer Mikroorganismen, die mit einer 50%igen Treffsicherheit durch das alternative und das Referenzverfahren in der Probe nachgewiesen werden kann. Sie liegt zwischen den beiden Konzentrationen der Kontamination, die weniger bzw. mehr als in 50 % der Fälle die Nachweisgrenze ergeben. Sie wird folglich als Bereich ausgedrückt.	/
Inklusivität	Eignung des alternativen Verfahrens den Zielanalyten in einem breiten Spektrum von Stämmen nachzuweisen.	/
Exklusivität	Nichtvorhandensein störender Einflüsse eines relevanten Spektrums von Nicht-Zielstämmen beim alternativen Verfahren.	/

Tabelle 6: Auswerteschema zur Berechnung der relativen Genauigkeit, relativen Spezifität und relativen Empfindlichkeit (nach DIN EN ISO 16140:2003)

Ergebnisse	Referenzverfahren positiv	Referenzverfahren negativ	Σ
Alternatives Verfahren positiv	a	c	
Alternatives Verfahren negativ	b	d	$n = a + b + c + d$

a = Anzahl der bei beiden Methoden positiven Analysenergebnisse

b = Anzahl der falsch-negativen Analysenergebnisse bezüglich der Referenzmethode

c = Anzahl der falsch-positiven Analysenergebnisse bezüglich der Referenzmethode

d = Anzahl der bei beiden Methoden negativen Analysenergebnisse

n = Gesamtanzahl Analysenergebnisse

Die Ermittlung und Berechnung der Validierungskriterien erfolgt stets in Bezug auf das Referenzverfahren, so dass diese als „relative Validierungskriterien“ bezeichnet werden. Zur Berechnung der **relativen Genauigkeit, der relativen Spezifität und der relativen Empfindlichkeit (= Sensitivität)** (Tabelle 5 und Tabelle 6) sollen fünf Lebensmittelkategorien eingesetzt werden. Für *Yersinia spp.* werden neben rohen Fleisch- und Geflügelfleischprodukten auch die Kategorien roher Fisch, rohe Produkte aus Obst und Gemüse sowie rohe Molkereiprodukte genannt. Für jede Lebensmittelkategorie ist es

vorgesehen 60 Proben einzusetzen. Die Proben sollten natürlicherweise mit dem nachzuweisenden Analyt kontaminiert sein; die künstliche Kontamination der Proben ist jedoch erlaubt, falls eine ausreichende Anzahl natürlich kontaminierter Proben nicht zur Verfügung steht.

Bei der Ermittlung der **relativen Nachweisgrenze** werden die fünf Lebensmittelkategorien mit fünf unterschiedlichen Zielkeimen in mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen beimpft. Jeder der Zielkeime sollte, wenn möglich, einer Lebensmittelkategorie zugehörig sein. Die erste Beimpfungskonzentration muss der Negativkontrolle entsprechen. Die zweite Beimpfungskonzentration hingegen sollte der theoretischen Nachweisgrenze entsprechen und die dritte Beimpfungskonzentration muss gerade oberhalb der theoretischen Nachweisgrenze liegen. Für jede Beimpfungskonzentration und jede Lebensmittelkategorie werden sowohl mit dem alternativen als auch mit dem Referenzverfahren sechs Mehrfachuntersuchungen durchgeführt. Die Berechnung erfolgt für jede Beimpfungskonzentration und jede Lebensmittelkategorie.

Zur Ermittlung der **Inklusivität** werden mindestens 50 Reinkulturen von Zielorganismen eingesetzt. Die Beimpfungskonzentration muss hierbei 10- bis 100-mal größer sein als die geringste Nachweiskonzentration des alternativen Verfahrens. Zur Ermittlung der **Exklusivität** sollen mindestens 30 Reinkulturen von Nicht-Zielorganismen eingesetzt werden. Die Beimpfungskonzentration muss dabei der Konzentration entsprechen, die in allen verwendeten Lebensmittelkategorien erwartet wird. Zur Überprüfung der Inklusivität und Exklusivität werden keine Lebensmittelproben zugesetzt, es werden nur die Reinkulturen von Stämmen untersucht. Der sich anschließende **Ringversuch** muss mindestens zehn teilnehmende Laboratorien umfassen.

Die Anwendung der in dieser Norm beschriebenen Verfahren zur Validierung alternativer Verfahren ist mit einem sehr hohen Aufwand verbunden und daher nicht immer praktikabel. Im Anwendungsbereich dieser Arbeitsvorschrift wird daher darauf hingewiesen, dass es zweckmäßig sein kann, an die Validierung eines alternativen Verfahrens, welches als Routineverfahren zur hausinternen Untersuchung eingesetzt wird, weniger strenge Anforderungen zu stellen. Neben der DIN EN ISO 16140:2003 existieren weitere Vorschriften zur Validierung (Tabelle 7):

Tabelle 7: Übersicht über weitere Vorschriften zur Validierung

AOAC International (FELDSINE et al. 2002)	NordVal (N.N. 2007a)	Schweizerische Akkreditierungsstelle (SAS, N.N. 2006a)
AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative microbiological official methods of analysis	Protocol for the validation of alternative microbiological methods in the Nordic countries	Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie

3.2 Schweizerische Akkreditierungsstelle (SAS)

Die Schweizerische Akkreditierungsstelle (N.N. 2006a) beschreibt in ihrem Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie spezifische Anforderungen für eine In house-Validierung durch individuelle Labore. Sie orientiert sich an den Anweisungen der Publikation „In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren“ von HÜBNER et al. (2002). Hierbei richtet sich die Auswahl der Matrices und der Umfang der Validierung nach dem Untersuchungsziel. Bei der Validierung muss prinzipiell zwischen qualitativen und quantitativen Verfahren sowie zwischen neuen Verfahren, für die keine genormten Prüfanweisungen bestehen und Alternativverfahren zu bereits existierenden Referenzmethoden, unterschieden werden. Alternativverfahren werden hierbei grundsätzlich mittels Methodenvergleich validiert.

Um die zu validierende Methode mit einem im Labor bereits etablierten Referenzverfahren zu vergleichen, werden die Ergebnisse des Verfahrenvergleiches in das Auswerteschema (Vierfeldertest) für qualitative Verfahren eingesetzt (Tabelle 8). Die Ermittlung und Berechnung der Validierungskriterien erfolgt ebenfalls stets in Bezug auf die Referenzmethode, so dass diese als „relative Validierungskriterien“ bezeichnet werden (Tabelle 9).

Tabelle 8: Auswerteschema des Vierfeldertests (nach N.N. 2006a; SACHS 2002)

Zu validierende Methode	+		-	Σ
		a	b	a + b
Referenzmethode	-		c	c + d
		d		
	Σ	a + c	b + d	a + b + c + d = n

+ = positiver Nachweis

- = negativer Nachweis

a = Anzahl der bei beiden Methoden positiven Analyseergebnisse

b = Anzahl der falsch-negativen Analyseergebnisse bezüglich der Referenzmethode

c = Anzahl der falsch-positiven Analyseergebnisse bezüglich der Referenzmethode

d = Anzahl der bei beiden Methoden negativen Analyseergebnisse

n = Gesamtanzahl Analyseergebnisse

Tabelle 9: Definitionen und Berechnungen der Validierungskriterien in Bezug auf die Referenzmethode (nach N.N. 2006a)

Validierungskriterium	Definition	Bemerkung	Formel
			In Bezug auf die Referenzmethode mittels Vierfeldertest
Anwendungsbereich	Die Auswahl der eingesetzten Lebensmittelkategorien richtet sich nach dem vorgesehen Anwendungsbereich des zu validierenden Verfahrens.	/	/
relative Richtigkeit	Sie bezeichnet den Grad der Übereinstimmung der Resultate, welche mit der zu validierenden Methode und der Referenzmethode an mindestens 20 gleichen Proben erhalten werden.	Sie ist, aufgrund der mangelnden Kenntnis über die Vermehrungsfähigkeit und Verteilung der Mikroorganismen im Lebensmittel, die im Rahmen der Validierung am schwierigsten zu bestimmende Größe.	$(a + d)/n \times 100$
relative Sensitivität	Gibt an, wie viel % aller sicher positiven Proben als positiv erkannt werden.	Es wird von der gleichen Sensitivität der zu validierenden Methode ausgegangen, wenn der Zielorganismus sowohl von der Referenzmethode als auch von der zu validierenden Methode nachgewiesen wird.	$a/(a + b) \times 100$
relative Falsch-Negativ-Rate	Sie gibt an, wie viel % der Proben mit dem alternativen Prüfverfahren als falsch-negative Befunde gewertet wurden.		$b/(a + b) \times 100$
relative Spezifität	Gibt an, wie viel % aller sicher negativen Proben als negativ erkannt werden.	Es wird von der gleichen Spezifität der zu validierenden Methode ausgegangen, wenn der Zielorganismus sowohl von der Referenzmethode als auch von der zu validierenden Methode nicht nachgewiesen wird.	$d/(c + d) \times 100$
relative Falsch-Positiv-Rate	Sie gibt an, wie viel % der Proben mit dem alternativen Prüfverfahren als falsch-positive Befunde gewertet wurden.	Falsch positive Befunde müssen durch weitere Charakterisierung der Keime bestätigt werden.	$c/(c + d) \times 100$
relative Nachweisgrenze	Sie beschreibt die kleinste Anzahl Zielkeime, welche mit einer vorgegebenen statistischen Sicherheit entdeckt werden kann. Sie ist der tiefste Wert, bei dem alle Resultate positiv ausfallen.	/	/
Statistische Übereinstimmung	Beschreibt das Maß der Übereinstimmung zweier Prüfverfahren bezüglich eines Analyseparameters.	Berechnung über den Konkordanzindex Kappa.	$\text{Kappa} = \frac{2 \times (a \times d - b \times c)}{((a + c) \times (c + d) + (a + b) \times (b + d))}$

Beim Auftreten von falsch-positiven Befunden müssen diese durch weitere Charakterisierung bestätigt werden. Erst bei erfolgreicher Bestätigung können diese als wahre falsch-positive Befunde bezeichnet werden.

Die Auswahl der eingesetzten Lebensmittelkategorien richtet sich nach dem vorgesehen Anwendungsbereich der zu validierenden Methode. Falls das Verfahren nur für den Nachweis von Mikroorganismen in einem Produkt bestimmt ist, so ist nur diese eine Matrix bei dem Verfahrensvergleich einzusetzen. Falls es sich um ein horizontales Verfahren handeln soll, so sind die Untersuchungen an mindestens vier Lebensmittelkategorien durchzuführen. Pro jeweilige Lebensmittelkategorie sind mehr als 20 verschiedene natürlich kontaminierte und mehr als 20 verschiedene nicht kontaminierte Proben sowohl mit der zu validierenden Alternativ- als auch mit der Referenzmethode zu untersuchen. Die künstliche Kontamination der Proben ist erlaubt, sofern eine genügende Anzahl natürlich kontaminierter

Proben nicht zu beschaffen ist. Die Auswertung des Konkordanzindex Kappa der statistischen Übereinstimmung erfolgt durch Zuordnung zu einer Übereinstimmungsstufe (Tabelle 10).

Tabelle 10: Auswertung des Konkordanzindexes Kappa (nach SACHS 2002)

Kappa	Übereinstimmung
< 0,10	keine
0,10-0,40	schwache
0,41-0,60	deutliche
0,61-0,80	starke
0,81-1,00	fast vollständige

Zur Ermittlung der **relativen Nachweisgrenze** sind pro Lebensmittelmatrix Verdünnungsreihen von mindestens drei verschiedenen Konzentrationen mit vier verschiedenen Stämmen des Zielorganismus anzusetzen.

Zusätzlich zu den in Tabelle 9 genannten Validierungskriterien soll außerdem die **Wiederholpräzision (repeatability, r)** berechnet werden. Diese beschreibt den Vergleich von Resultaten wiederholter Messungen derselben homogenisierten Probe unter gleichen Bedingungen (gleiche Personen, Laboratorien, Reagenzien, Umgebungsbedingungen). Sie wird mit Hilfe folgender Formel (Formel 1) berechnet, wobei x die Anzahl übereinstimmender Resultate unter Wiederholbarkeitsbedingungen und n die Anzahl der Messungen darstellt.

Formel 1: Wiederholpräzision

$$\text{Wiederholpräzision (r)} = x/n$$

Nicht in dem Leitfaden der Schweizerischen Akkreditierungsstelle (N.N. 2006a), wohl aber in den Anweisungen der Publikation „In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren“ von HÜBNER et al. (2002) aufgeführt, sind sowohl die Inklusivität und Exklusivität sowie die Vergleichbarkeit. Bei der **Inklusivität** sollen mindestens fünf inklusive Keime detektiert werden, während bei der **Exklusivität** mindestens zehn bis 20 exklusive Keime nicht detektiert werden dürfen. Die **Vergleichbarkeit (reproducibility, R)** beschreibt den Vergleich von Resultaten wiederholter Messungen derselben Probe unter wechselnden Bedingungen (verschiedene Personen, Laboratorien, Reagenzien, Umgebungsbedingungen). Die Berechnung erfolgt anhand folgender Formel (Formel 2), wobei y die Anzahl der Messungen mit übereinstimmenden Resultaten unter Vergleichbarkeitsbedingungen und n die Anzahl der Messungen darstellt.

Formel 2: Vergleichbarkeit

$$\text{Vergleichbarkeit (R)} = y/n$$

Um jedoch bei einem Verfahrensvergleich mit künstlich kontaminierten Proben die reelle Kontamination der Proben nachzuweisen, ist es möglich die Validierungskriterien in Bezug auf die inokulierten bzw. nicht-inokulierten Proben zu berechnen (Tabelle 11):

Tabelle 11: Definitionen und Berechnungen der Validierungskriterien in Bezug auf die inokulierten bzw. nicht-inokulierten Proben (nach DIN EN ISO 22118:2007; KNÖDL 2008)

Validierungskriterium	Formel	
	In Bezug auf die inokulierten bzw. nicht-inokulierten Proben	
Sensitivität	$\frac{\text{Anzahl positiver Ansätze des zu prüfenden Nachweises}}{\text{Anzahl inokulierter Proben}}$	x 100
Falsch-Negativ-Rate	$\frac{\text{Anzahl negativer Ansätze des zu prüfenden Nachweises}}{\text{Anzahl inokulierter Proben}}$	x 100
Spezifität	$\frac{\text{Anzahl negativer Ansätze des zu prüfenden Nachweises}}{\text{Anzahl nicht- inokulierter Proben}}$	x 100
Falsch-Positiv-Rate	$\frac{\text{Anzahl positiver Ansätze des zu prüfenden Nachweises}}{\text{Anzahl nicht- inokulierter Proben}}$	x 100

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

4 Allgemeiner Versuchsaufbau

Die ersten beiden Teile dieser Arbeit dienten zunächst der Optimierung der Real-Time PCR sowie der Kolonie-DNA-Hybridisierung. Für die Real-Time PCR mussten zunächst die optimalen Primer- und TaqMan-Sondenkonzentrationen sowie die Anlagerungs-Temperatur ermittelt werden. Um falsch-negative Ergebnisse der PCR auszuschließen, wurde zusätzlich eine IAC für die TaqMan PCR entwickelt. Die Kolonie-DNA-Hybridisierung erforderte die Herstellung der mit Digoxigenin markierten Hybridisierungssonde sowie die Ermittlung der idealen Anreicherung zur späteren Isolierung der pathogenen *Y. enterocolitica*. Im dritten Teil der Arbeit erfolgte zur näheren Charakterisierung und weiteren Optimierung eine In house-Validierung des Verfahrens. Anhand der Vorversuche zur Optimierung der Real-Time PCR sowie der Kolonie-DNA-Hybridisierung und der In house-Validierung konnte im vierten Teil dieser Arbeit ein Verfahrensdigramm erstellt werden. Auf der Grundlage dieses Verfahrensdigrammes erfolgte die Untersuchung der Schweinefleischproben im fünften Teil dieser Arbeit.

5 Probenmaterial und Bakterienstämme

Für die Vorversuche des ersten und zweiten Teiles sowie zur In house-Validierung wurde der pathogene *Y. enterocolitica* DSM Stamm 11502 verwendet.

Bei der In house-Validierung des Verfahrens wurde rohes Rinderhackfleisch eingesetzt, das bis zum Untersuchungsbeginn bei -20 °C tiefgefroren wurde. Die zur Durchführung der In house-Validierung eingesetzten 32 exklusiven Keime stammten von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), der Oxoid GmbH, dem Institut für Hygiene und Technologie tierischen Ursprungs der Ludwig-Maximilians-Universität München, dem Robert Koch Institut (RKI) Wernigerode und dem Landesuntersuchungsamt für Chemie, Hygiene und Veterinärmedizin Bremen (LUA). Ein laboreigener Stamm des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamtes Karlsruhe (CVUA KA) wurde ebenfalls für die Untersuchung verwendet ([Kapitel 6.3](#)).

Die im letzten Teil der Arbeit untersuchten 100 rohen Schweinefleischproben wurden in einem Zeitraum zwischen Januar und Juli 2008 am CVUA KA untersucht. Die Proben wurden von den unteren Lebensmittelüberwachungsbehörden des Regierungsbezirkes Karlsruhe erhoben und zur Untersuchung vorgelegt. Die untersuchten rohen Schweinefleischproben stammten von einem Schlachthof in Süddeutschland und wurden direkt im

Anschluss an die Schlachtung erhoben. Die Proben wurden sowohl als offene Ware (OW) (72 Proben) als auch als Fertigpackung (FP) (28 Proben) angeliefert. Das Probenkontingent gliederte sich dabei in 35 Proben rohen Hackfleisches, 32 Proben rohen Fleisches, 25 Proben Zungen und 8 Proben Innereien (Abbildung 2).

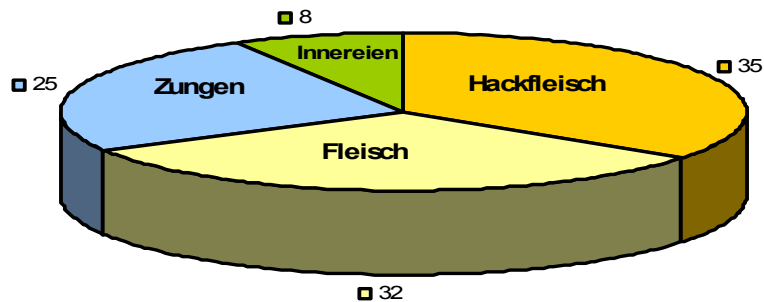


Abbildung 2: Verteilung der untersuchten rohen Schweinefleischproben

6 Methoden

6.1 Erster Teil: Vorversuche zur Real-Time PCR

6.1.1 Vorversuche mit SYBR Green

Die Entwicklung der Real-Time PCR erfolgte zunächst mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green als Detektionssystem. Die Spezifitätsprüfung erfolgte über die Schmelzkurvenanalyse. Die zum Einsatz kommenden Primer *RT-ail 1* und *RT-ail 2* (JOURDAN et al. 2000) amplifizieren ein 90 bp großes Fragment des *ail*-Gens (Tabelle 12).

Tabelle 12: Nukleotidsequenz der *RT-ail 1 + 2* Primer der Real-Time PCR

Primer	Sequenz 5' → 3'	Lokalisation auf dem <i>ail</i> -Gen	T _m (°C)
<i>RT-ail 1</i>	GGT CAT GGT GAT GTT GAT TAC TAT TCA	746-772	55,19
<i>RT-ail 2</i>	CGG CCC CCA GTA ATA CCA TA	818-836	53,78

T_m (°C) = Schmelztemperatur

Als Master Mix wurde der Power SYBR Green PCR Master Mix von APPLIED BIOSYSTEMS eingesetzt. Der *Y. enterocolitica* DSM Stamm 11502 diente als Template. Dafür wurde der DSM Stamm aus der Cryobank entnommen und unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitsbank auf Columbia-Blutagar ausgestrichen (3-Ösenausstrich). Die Bebrütung erfolgte bei +30 °C für 24-48 h. Es folgte die Entnahme von circa fünf Einzelkolonien mit Hilfe einer Impföse. Diese wurden in 100 µl nukleasefreiem Wasser in einem 2 ml Safe Lock Tube (EPPENDORF) gelöst und für 10 min bei +99 °C erhitzt. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 rpm für 3 min wurde der gewonnene Überstand in ein neues 2 ml Safe Lock Tube überführt. Das gewonnene Template wurde anschließend mit Hilfe einer dezimalen Verdünnungsreihe mit nukleasefreiem Wasser bis zur Verdünnungsstufe 10^{-3} verdünnt, so dass schließlich als Template in die PCR vier verschiedene Konzentrationen des DSM Stammes eingesetzt werden konnten. Das Pipettieren des PCR-Ansatzes erfolgte unter der Reinraumbank gemäß folgendem Schema (Tabelle 13):

Tabelle 13: Pipettierschema der SYBR Green PCR

Komponente	Konzentration	Menge in µl	Endkonzentration im 50 µl Ansatz
Power SYBR Green PCR Master Mix AmpliTaq Gold DNA Polymerase PCR Puffer SYBR Green I Dye dNTP's Passive Referenz	2 x	25 µl	1 x
nukleasefreies Wasser		10 µl	
Primer <i>RT-ail 1+2</i>	2 µM	je 5 µl	0,2 µM
Template: DSM 11502		5 µl	
Summe		50 µl	

Abweichend von diesem Schema wurde zusätzlich eine Primerkonzentration von 0,1 µM (je 2,5 µl im 50 µl Ansatz) verwendet, um so Hinweise auf die optimale Primerkonzentration zu erhalten. Um die optimale Anlagerungs-Temperatur zu ermitteln, wurden außerdem Versuche zum Temperatur-Zeit-Profil durchgeführt (Tabelle 14). Die Auswertung erfolgte anhand des Kurvenverlaufes, der C_t -Werte und der Kontrolle der Schmelzkurve.

Tabelle 14: Versuche zum Temperatur-Zeit-Profil der SYBR Green PCR

Initialer Aktivierungsschritt: 95 °C, 10 min			
Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Anlagerung	Elongation
40	95 °C, 15 s	50 °C, 30 s	72 °C, 30 s
"	"	50 °C, 45 s	"
"	"	50 °C, 60 s	"
"	"	52 °C, 30 s	"
"	"	52 °C, 45 s	"
"	"	52 °C, 60 s	"
"	"	54 °C, 30 s	"
"	"	54 °C, 45 s	"
"	"	54 °C, 60 s	"
"	"	56 °C, 30 s	"
"	"	56 °C, 45 s	"
"	"	56 °C, 60 s	"
"	"	58 °C, 30 s	"
"	"	58 °C, 45 s	"
"	"	58 °C, 60 s	"
"	"	60 °C, 30 s	"
"	"	60 °C, 45 s	"
"	"	60 °C, 60 s	"
Abschließend: Schmelzkurvenanalyse: 60 °C			→ 95 °C

6.1.2 Vorversuche mit der TaqMan Sonde

Aufgrund der in [Kapitel 2.2.1](#) genannten Nachteile des SYBR Greens erfolgte die Umstellung der Real-Time PCR auf eine TaqMan Sonde. Die zum Einsatz kommenden Primer sind identisch mit den bei der SYBR Green PCR verwendeten Primern (nach JOURDAN et al. 2000). Sie amplifizieren ein 90 bp großes Fragment des *ail*-Gens. Als Detektionssystem wurde eine TaqMan Sonde (nach JOURDAN et al. 2000) eingesetzt. Diese ist am 5'-Ende mit dem Reporter-Farbstoff FAM und am 3'-Ende mit dem Quencher-Farbstoff TAMRA markiert und besitzt die in [Tabelle 15](#) angegebene Sequenz.

Tabelle 15: Nukleotidsequenz der TaqMan Sonde

Sonde	Sequenz 5' → 3'	Lokalisation auf dem <i>ail</i> -Gen	T _m (°C)
RT- <i>ail</i> -Sonde	CCA TCT TTC CGC ATC AAC GAA TAT GTT AGC	785-814	64,78

T_m (°C) = Schmelztemperatur

Als Template diente erneut der *Y. enterocolitica* DSM Stamm 11502 in vier unterschiedlichen Konzentrationen ([Kapitel 6.1.1](#)). Die optimale Anlagerungs-Temperatur von +50 °C für die Primer sowie die Primerkonzentration von 0,2 µM wurden aus der SYBR Green PCR übernommen. Als Master Mix wurde zunächst der QuantiTect PCR Master Mix von QIAGEN verwendet. Um die optimale TaqMan Sondenkonzentration zu ermitteln, wurden unterschiedliche Konzentrationen der Sonde eingesetzt (0,05; 0,08; 0,1 µM) ([Tabelle 16](#)).

Tabelle 16: Pipettierschema der TaqMan PCR mit unterschiedlichen TaqMan Sondenkonzentrationen

Komponente	Konzentration	Menge in μl	Endkonzentration im 50 μl Ansatz
QuantiTect Probe PCR Master Mix	2 x	25 μl	1 x
HotStarTaq DNA Polymerase PCR Puffer MgCl_2 dNTP's Rox	8 mM		4 mM
nukleasefreies Wasser		8,75/8/7,5 μl	
Primer <i>RT-ail 1+2</i>	2 μM	je 5 μl	0,2 μM
<i>RT-ail</i> -Sonde	2 μM	1,25 μl	0,05 μM
		2 μl	0,08 μM
		2,5 μl	0,1 μM
Template: DSM 11502		5 μl	
Summe		50 μl	

Das Temperatur-Zeit-Profil setzte sich dabei wie folgt zusammen (Tabelle 17):

Tabelle 17: Temperatur-Zeit-Profil der TaqMan PCR

Initialer Aktivierungsschritt: 95 °C, 15 min		
Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Kombinierte Anlagerungs- und Elongationsphase
45	94 °C, 15 s	50 °C, 60 s

Abschließend folgten Untersuchungen zur Ermittlung des optimalen Master Mixes. Verschiedene kommerziell erhältliche Master Mixe wurden auf ihre Eignung hin überprüft (Tabelle 18). Das Temperatur-Zeit-Profil orientierte sich dabei stets an den Herstellerangaben, nur die kombinierte Anlagerungs- und Elongationsphase wurde konstant bei +50 °C ausgeführt.

Tabelle 18: TaqMan PCR mit unterschiedlichen Master Mixen

Master Mixe		Initialer Aktivierungsschritt	Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Kombinierte Anlagerungs- und Elongationsphase
QIAGEN	QuantiTect Probe PCR Master Mix	95 °C, 15 min	45	94 °C, 15 s	50 °C, 60 s
APPLIED BIOSYSTEMS	TaqMan Universal Master Mix	95 °C, 10 min	45	94 °C, 15 s	50 °C, 60 s
AB GENE	Absolute QPCR Rox Mix	95 °C, 15 min	45	94 °C, 15 s	50 °C, 60 s
QIAGEN	QuantiFast Probe PCR Kit	95 °C, 3 min	45	95 °C, 3 s	50 °C, 30 s

Die Auswertung erfolgte anhand des Kurvenverlaufes, der ermittelten C_T -Werte und anhand der Stärke des Fluoreszsignals des Reporter-Farbstoffes FAM.

6.1.3 Konstruktion einer IAC für die TaqMan PCR

Um eine mögliche Inhibition der PCR (Kapitel 2.2.1.1) zu erkennen, wurde für die TaqMan PCR eine IAC in Form einer **kompetitiven IAC** entwickelt. Diese wurde in Anlehnung an SACHADYN und KUR (1998) und ABDULMAWJOOD et al. (2002) entwickelt. Die Herstellung der IAC erfolgte über einen **konventionellen PCR-Schritt**, wobei das *pUC19*-Plasmid von *Escherichia coli* als Template diente. Die eingesetzten Primer stellten sogenannte zusammengesetzte Primer dar. Die überhängenden 5' Enden wiesen die gleiche Sequenz wie die bisher verwendeten *RT-ail* Primer auf, die 3' Enden hingegen wiesen komplementäre Sequenzen zum *pUC19*-Plasmid auf (Tabelle 19).

Tabelle 19: Nukleotidsequenz der zusammengesetzten Primer der konventionellen PCR zur Konstruktion der IAC

Primer	Sequenz 5' → 3'	Lokalisation <i>ail</i> -Gen	Lokalisation <i>pUC19</i> -Gen	T _m (°C)
<i>RT-ail-pUC19-1</i>	GGT CAT GGT GAT GTT GAT TAC TAT TCA <u>ACC ATA TGC GGT GTG AA</u>	746-772	181-197	71,3
<i>RT-ail-pUC19-2</i>	CGG CCC CCA GTA ATA CCA TAA <u>TTC ACT GGC CGT CGT T</u>	818-836	383-399	73,9

T_m (°C) = Schmelztemperatur

Die kursiv gedruckten Basen stellen die Sequenz der *RT-ail* Primer, die unterstrichenen Basen die Sequenz der *pUC19* Primer dar. Die Länge des zu amplifizierenden Fragmentes des *pUC19*-Plasmids beträgt somit 218 bp; die Größe der Ziel-DNA hingegen beträgt weiterhin 90 bp. Diese *pUC19* Primer wurden anhand den Empfehlungen von HOORFAR et al. (2004) (Kapitel 2.2.1.1) ausgewählt. Durch den Einsatz dieser zusammengesetzten Primer in die konventionelle PCR mit dem *pUC19* als Template entstand ein 218 bp großes Produkt des *pUC19*-Gens, das an den Enden die Sequenz der *RT-ail* Primer aufwies. Somit waren die *RT-ail* Primer der Real-Time PCR in der Lage, sowohl die Sequenz des *ail*-Gens von *Y. enterocolitica* als auch die Sequenz des *pUC19* als IAC gleichzeitig zu amplifizieren (Abbildung 3).

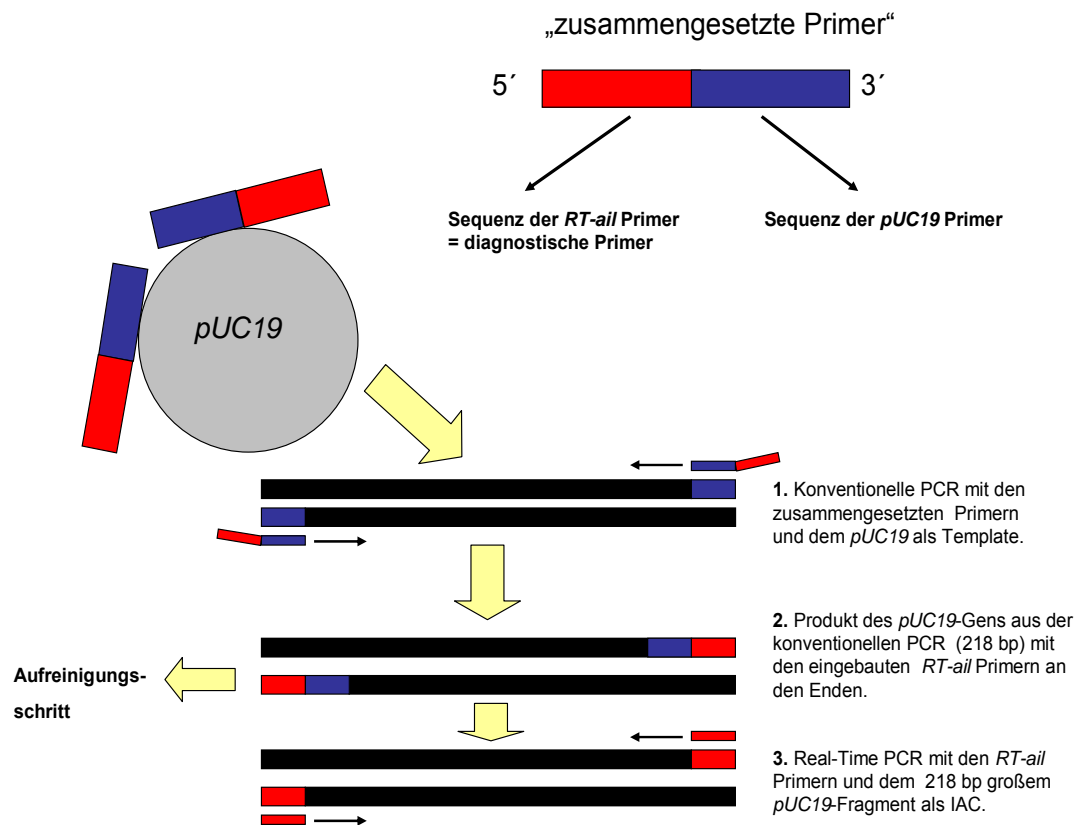


Abbildung 3: Schema der Konstruktion der IAC (nach SACHADYN und KUR 1998; ABDULMAWJOOD et al. 2002)

Für die konventionelle PCR mussten zunächst die optimalen Primer- und pUC19-Konzentrationen ermittelt werden. Verschiedene Konzentrationen wurden eingesetzt (Tabelle 20). Dabei erwies sich die pUC19-Konzentration von 10 000 pg/μl sowie die Primerkonzentration von 0,8 μM als optimal.

Tabelle 20: Eingesetzte pUC19- und Primerkonzentrationen zur Konstruktion der IAC

pUC19 Konzentrationen	Primerkonzentrationen
0,1 pg/μl	0,1 μM
1 pg/μl	0,2 μM
1 000 pg/μl	0,3 μM
10 000 pg/μl	0,8 μM
100 000 pg/μl	1 μM
1 000 000 pg/μl	

Nach der Optimierung erfolgte das Pipettieren der konventionellen PCR nach folgendem Schema (Tabelle 21):

Tabelle 21: Pipettierschema der konventionellen PCR zur Konstruktion der IAC

Komponente	Konzentration	Menge in μl	Endkonzentration im 50 μl Ansatz
HotStarTaq Master Mix	2 x	25 μl	1 x
HotStarTaq DNA Polymerase	5 U		2,5 U
PCR Puffer	2 x		1 x
MgCl ₂	3 mM		1,5 mM
dNTP's	je 400 μM		je 200 μM
nukleasefreies Wasser		15 μl	
Primer <i>RT-ait-pUC19-1+2</i>	10 μM	je 4 μl	0,8 μM
Template: <i>pUC19</i>	10 000 pg/ μl	2 μl	
Summe		50 μl	

Das Temperatur-Zeit-Profil wurde gemäß dem QIAGEN HotStarTaq PCR Handbook ausgeführt (Tabelle 22). Die Anlagerungs-Temperatur wurde erneut 5 °C unter der Schmelztemperatur der zusammengesetzten Primer gewählt.

Tabelle 22: Temperatur-Zeit-Profil der konventionellen PCR zur Konstruktion der IAC

Initialer Aktivierungsschritt: 95 °C, 15 min			
Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Anlagerung	Elongation
35	94 °C, 30 s	68 °C, 30 s	72 °C, 1 min
Finaler Verlängerungsschritt: 72 °C, 10 min			

Ein Teil des vervielfältigten IAC-Produktes wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung identifiziert, um sicher zu stellen, dass das Produkt die gewünschte Größe von 218 bp aufwies. Dafür wurden 2 g Agarose mit 100 ml 1 x Tris-Borat-EDTA (TBE) Fertigpuffer [100 ml 5x TBE + 400 ml Aqua destillata (Aqua dest.)] im Mikrowellenherd gelöst (2%iges Agarose-Gel). Nach kurzem Abkühlen erfolgte die Zugabe von 27 μl Ethidiumbromid (1mg/ml) mit anschließendem Übergießen des Gels in die Gelkammer. Nach Erstarren des Gels wurde dieses in die mit 1 x TBE Puffer gefüllte Laufkammer überführt. In einer Mikrotiterplatte erfolgte das Mischen von 2,5 μl Ladepuffer (Bromphenolblau und Glycerin) mit 10 μl des Amplifikates bzw. der Längenstandardmarker (50 und 100 bp). Circa 10 μl dieser Mischung wurden in die Geltaschen pipettiert und bei einer Spannung von 2,8 V/cm (95 V bei einem Elektrodenabstand von 34 cm) für 1,5 h aufgetrennt. In einem Videodokumentationssystem (BioDocII BIOMETRA) unter ultraviolettem Licht erfolgte die Sichtbarmachung und Dokumentation der DNA-Fragmente. Durch Vergleich mit den Längenstandardmarkern konnte für jedes DNA-Fragment die Länge bestimmt werden. Der restliche Teil des vervielfältigten IAC-Produktes wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN gemäß Herstelleranleitung aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Bestimmung

der Masse mittels Photometer. Daraus erfolgte die Berechnung der Kopienzahl pro μl mittels folgender Formel:

Formel 3: Berechnung der Kopienzahl pro μl

$$\text{Kopienzahl}/\mu\text{l} = \frac{m \times A_G}{y \times M_r}$$

m = Masse der Teilchen in $\text{g}/\mu\text{l}$

A_G = Avogadro'sche Zahl = $6 \times 10^{23} (\text{mol}^{-1})$

y = Anzahl der Basenpaare = 218 bp

M_r = Mittel des relativen Molekulargewichts eines Nukleotids, bei dsDNA 660 g/mol

Durch den Einsatz der kompetitiven IAC musste nur ein Primerpaar in die **Real-Time PCR** eingesetzt werden. Allerdings ergab sich dadurch eine Konkurrenz zwischen Ziel-DNA und IAC um das gleiche Primerpaar (Kapitel 2.2.1.1). Daher musste mittels einer dezimalen Verdünnungsreihe die niedrigste Konzentration an IAC, die gerade noch in der Lage war ein positives Signal zu erzielen ohne dabei die Amplifikation der Ziel-DNA (*ail*-Gen von *Y. enterocolitica*) zu hemmen, in der Real-Time PCR ermittelt werden. Für das Pipettierschema (Tabelle 23) und das Temperatur-Zeit-Profil (Tabelle 24) wurden die Ergebnisse der SYBR Green und TaqMan PCR Vorversuche berücksichtigt. Als Template diente, wie in der SYBR Green und TaqMan PCR ohne IAC, der *Y. enterocolitica* DSM Stamm 11502 in vier unterschiedlichen Konzentrationen (Kapitel 6.1.1). Als Master Mix wurde der QuantiFast Probe PCR Kit von QIAGEN eingesetzt.

Tabelle 23: Pipettierschema der TaqMan PCR mit IAC

Komponente	Konzentration	Menge in μl	Endkonzentration im 25 μl Ansatz
QuantiFast Probe PCR Kit HotStarTaq Plus DNA Polymerase PCR Puffer mit Q-Bond dNTP's Rox	2 x	12,5 μl	1 x
nukleasefreies Wasser		1 μl	
Primer <i>RT-ail</i> 1+2	2 μM	je 2,5 μl	0,2 μM
<i>RT-ail</i> -Sonde	2 μM	1 μl	0,08 μM
<i>pUC19</i> -Sonde	2 μM	1 μl	0,08 μM
Template: DSM 11502		2,5 μl	
IAC		2 μl	
Summe		25 μl	

Tabelle 24: Temperatur-Zeit-Profil der TaqMan PCR mit IAC

Initialer Aktivierungsschritt: 95 °C, 3 min		
Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Kombinierte Anlagerungs- und Elongationsphase
45	95 °C, 3 s	50 °C, 30 s

Als Detektionssystem für die IAC wurde ebenfalls eine TaqMan Sonde verwendet. Diese ist am 5'-Ende mit dem Reporter-Farbstoff JOE und am 3'-Ende mit dem Quencher-Farbstoff TAMRA markiert und besitzt die in Tabelle 25 angegebene Sequenz.

Tabelle 25: Nukleotidsequenz der *pUC19*-Sonde der TaqMan PCR mit IAC

Sonde	Sequenz 5' → 3'	Lokalisation auf dem <i>pUC19</i> -Gen	T _m (°C)
<i>pUC19</i> -Sonde	GGA TGT GCT GCA AGG CGA TTA AGT TGG GTA ACG	321-353	70,7

T_m (°C) = Schmelztemperatur

Die Auswertung erfolgte anhand des Kurvenverlaufes, der ermittelten C_T-Werte und anhand der Stärke des Fluoreszsignals der Reporter-Farbstoffe FAM und JOE.

6.2 Zweiter Teil: Vorversuche zur Kolonie-DNA-Hybridisierung

6.2.1 Herstellung der mit Digoxigenin markierten Hybridisierungssonde

Die Primer für die Herstellung der Hybridisierungssonde der Kolonie-DNA-Hybridisierung entstammen der Methode Nr. 163 A des Nordic Committee on Food Analysis „Pathogenic *Y. enterocolitica*. PCR methods for detection in foods“ (NMKL 1998). Diese amplifizieren ein 454 bp großes Fragment des *ail*-Gens (Tabelle 26).

Tabelle 26: Nukleotidsequenz der *ail 1 + 2* Primer zur Herstellung der Hybridisierungssonde

Primer	Sequenz 5' → 3'	Lokalisation auf dem <i>ail</i> -Gen	T _m (°C)
<i>ail 1</i>	GTT TAT CAA TTG CGT CTG TTA ATG TGT ACG	524-554	59,13
<i>ail 2</i>	CTA TCG AGT TTG GAG TAT TCA TAT GAA GCG	949-978	59,64

T_m (°C) = Schmelztemperatur

Die Herstellung der Hybridisierungssonde erfolgte mit Hilfe von zwei konventionellen verschachtelten PCR-Schritten (nested PCR). Dabei wurde das Produkt der ersten PCR als Template in die zweite PCR eingesetzt. Für den ersten PCR-Schritt erfolgte zunächst die Entnahme des *Y. enterocolitica* DSM Stammes 11502 aus der Cryobank. Dieser wurde unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitsbank auf Columbia-Blutagar mittels eines 3-Ösenausstriches aufgetragen und bei +30 °C für 24-48 h bebrütet. Anschließend wurden

circa fünf Einzelkolonien mit Hilfe einer Impföse entnommen. Diese mussten zunächst in 100 µl nukleasefreiem Wasser in einem 2 ml Safe Lock Tube (EPPENDORF) gelöst werden. Nach einer Erhitzungsphase von 10 min bei +99 °C erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 3 min. Der Überstand wurde in ein neues Safe Lock Tube überführt und diente in diesem ersten PCR-Schritt als Template unter Verwendung der Primer *ail 1 + 2*. Das Pipettierschema sowie das Temperatur-Zeit-Profil setzten sich dabei wie folgt zusammen (Tabelle 27 und Tabelle 28):

Tabelle 27: Pipettierschema des ersten konventionellen PCR-Schrittes

Komponente	Konzentration	Menge in µl	Endkonzentration im 25 µl Ansatz
HotStarTaq Master Mix	2 x	12,5 µl	1 x
HotStarTaq DNA Polymerase	5 U		2,5 U
PCR Puffer	2 x		1 x
MgCL ₂	3 mM		1,5 mM
dNTP's	je 400 µM		je 200 µM
nukleasefreies Wasser		9 µl	
Primer <i>ail 1+2</i>	2 µM	je 1,25 µl	0,1 µM
Template: DSM 11502		1 µl	
Summe		25 µl	

Tabelle 28: Temperatur-Zeit-Profil des ersten PCR-Schrittes (nach NMKL 1998)

Initialer Aktivierungsschritt: 95 °C, 15 min			
Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Anlagerung	Elongation
1	92 °C, 30 s	54 °C, 1 min	72 °C, 1 min
1	92 °C, 30 s	53 °C, 1 min	72 °C, 1 min
1	92 °C, 30 s	52 °C, 1 min	72 °C, 1 min
1	92 °C, 30 s	51 °C, 1 min	72 °C, 1 min
30	92 °C, 30 s	50 °C, 1 min	72 °C, 1 min
1			72 °C, 7 min

Ein Teil des amplifizierten PCR-Produktes wurde gemäß Kapitel 6.1.3 mittels Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung identifiziert. Das restliche PCR-Produkt wurde einem erneuten PCR-Schritt als Template zugeführt. Zur Markierung der Hybridisierungsprobe wurde das nicht radioaktive Digoxigenin-dUTP (ROCHE) gewählt, welches 35% des dTTP's ersetzt. Dafür mussten die dNTP's einzeln pipettiert werden, um den Anteil des dTTP's im 25 µl Ansatz auf 130 µM zu senken (Tabelle 29). Das Temperatur-Zeit-Profil wurde hierbei wie für den ersten PCR-Schritt gemäß Tabelle 28 ausgeführt.

Tabelle 29: Pipettierschema des zweiten konventionellen PCR-Schrittes

Komponente	Konzentration	Menge in μl	Endkonzentration im 25 μl Ansatz
DNA-Polymerase		0,125 μl	2,5 U
MgCL ₂	25 mM	2 μl	2 mM
dNTP Mix		0,5 μl	
dATP	10 mM		200 μM
dGTP	10 mM		200 μM
dCTP	10 mM		200 μM
dTTP	6,5 mM		130 μM
Digoxigenin-dUTP	1000 μM	1,75 μl	70 μM
PCR Puffer	10 x	2,5 μl	1 x (mit 1,5 mM MgCL ₂)
nukleasefreies Wasser		13,125 μl	
Primer <i>ail 1+2</i>	2 μM	je 1,25 μl	0,1 μM
Template: DSM 11502 aus dem 1. PCR-Lauf		2,5 μl	
Summe		25 μl	

dNTP = Desoxynukleotidtriphosphat
dATP = Desoxyadenosintriphosphat
dGTP = Desoxyguanosintriphosphat
dCTP = Desoxycytidintriphosphat
dTTP = Desoxythymidintriphosphat
dUTP = Desoxyuridintriphosphat

Durch den Einbau des Digoxigenin-dUTP wird die elektrophoretische Motilität des Amplifikates vermindert. Zur Überprüfung der verminderten Motilität war es notwendig, einen Teil des amplifizierten mit Digoxigenin-dUTP markierten Produktes aus diesem zweiten PCR-Schritt erneut gemäß Kapitel 6.1.3 mittels Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung, zu identifizieren. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde eine nicht-markierte Sonde mitgeführt, die ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde. Das restliche PCR-Produkt musste anschließend mittels des QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), gemäß den Herstellerangaben, aufgereinigt werden. Danach erfolgte die Messung der dsDNA-Konzentration mit Hilfe eines Photometers. Um die Hybridisierungssonde zu denaturieren, musste diese für 5 min bei +99 °C erhitzt werden. Abschließend wurde die Hybridisierungssonde mit DIG Easy Hyb Hybridisierungslösung (ROCHE) auf eine Konzentration von 100 ng/ml verdünnt (Sonde/DIG Easy Hyb-Gemisch) und als einzelsträngige DNA bei -20 °C tiefgefroren. Bei dieser Temperatur besteht die Möglichkeit einer Lagerung von bis zu einem Jahr (ROCHE 2000, 2003, 2004).

6.2.2 Ermittlung des optimalen Anreicherungsmediums

Als Grundlage für die Anreicherung diente das dreistufige Anreicherungsverfahren nach KNÖDL (2008). Dieses beinhaltet neben einem Direktausstrich aus der Ersteinwaage auf CIN-Agar eine nicht-selektive Anreicherung in CASO-Bouillon sowie eine selektive Anreicherung in ITC. Die zwei Anreicherungen werden ebenso wie der Direktausstrich auf CIN-Agar ausgestrichen (KNÖDL 2008). Im Gegensatz zu dem Verfahren nach KNÖDL (2008) wurden für die Kolonie-DNA-Hybridisierung der Direktausstrich sowie die zwei

Anreicherungen nicht mittels eines 3-Ösenausstriches aufgetragen, sondern es erfolgte das Ausspateln von jeweils 100 µl auf CIN-Agar. Außerdem wurde auf die Laugenbehandlung nach der Über-Nacht-Anreicherung in CASO-Bouillon verzichtet.

Zur Ermittlung des optimalen Anreicherungsmediums für die Kolonie-DNA-Hybridisierung wurde Rinderhackfleisch, gemäß dem Verfahren nach KNÖDL (2008), in einem Stomacherbeutel mit Filtereinsatz eingewogen. Dafür erfolgte die Erstverdünnung und Homogenisierung von 10 g Hackfleisch mit 90 ml CASO-Bouillon. Nach einer zweistündigen Wiederbelebenszeit bei Raumtemperatur wurden 100 µl dieser Erstverdünnung auf CIN-Agar ausgespatelt (= Direktausspatelung). Die Bebrütung erfolgte bei +30 °C für 20 h. Anschließend wurde für die selektive Anreicherung in ITC zu 10 ml ITC-Basis jeweils 10 µl der Supplemente Irgasan (0,1%) und Ticarcillin (0,1%) zugegeben. 1 ml des Erstanatzes wurde in 10 ml ITC überführt. Die Bebrütung erfolgte bei +25 °C für 48 h. Für die nicht-selektive Anreicherung in CASO-Bouillon wurde die Erstverdünnung im Stomacherbeutel mit Filtereinsatz und Clip-Verschluss über Nacht (16-20 h) bei +25 °C bebrütet.

Nach der Bebrütung erfolgte das Anlegen einer dezimalen Verdünnungsreihe für beide Anreicherungen. Hierfür wurde aus den bebrüteten Anreicherungen je 1 ml in 9 ml Verdünnungslösung gegeben und durchmischt. Von diesen Verdünnungen wurden erneut je 1 ml in 9 ml Verdünnungslösung gegeben und ebenfalls gemischt. Dieses Schema wurde für beide Anreicherungen bis zur Verdünnungsstufe 10^{-5} fortgeführt (Abbildung 4).

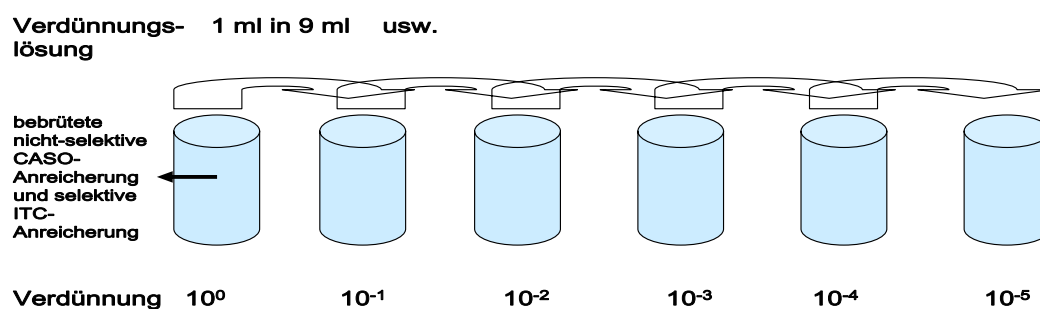


Abbildung 4: Dezimale Verdünnungsreihe der CASO- und ITC-Anreicherung

Von den bebrüteten Anreicherungen (Verdünnung 10^0) und den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-5} wurden je 100 µl auf CIN-Agar ausgespatelt. Die Bebrütung der Nährböden erfolgte bei +30 °C für 20 h. Die Beurteilung der bebrüteten Nährböden der beiden Anreicherungen sowie der Direktausspatelung erfolgte rein adspektorisch anhand des Koloniewachstums.

6.3 Dritter Teil: In house-Validierung des Verfahrens

Um die Real-Time PCR und die Kolonie-DNA-Hybridisierung unter den Bedingungen im Anwenderlabor zu bewerten, wurde eine In house-Validierung durchgeführt. Darüber hinaus sollte die Eignung der Real-Time PCR als Screening-Methode sowie der Kolonie-DNA-Hybridisierung als Isolierungs-Methode ermittelt werden. Die In house-Validierung schloss die Überprüfung der Inklusivität (Nachweis des Zielorganismus), der Exklusivität (kein Nachweis von Nicht-Zielorganismen) und der Nachweisgrenze ein. Die Nachweisgrenze wurde definiert als die kleinste Anzahl anzüchtbarer Mikroorganismen, die mit einer 50%igen Treffsicherheit in der Probe nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.1).

Die Ermittlung der Inklusivität und Exklusivität der Real-Time PCR sowie der Kolonie-DNA-Hybridisierung erfolgte für jede Methode getrennt, mit Hilfe von Reinkulturen. Die Ermittlung der Nachweisgrenzen beider Methoden wurde anhand einer Verfahrenvergleichsuntersuchung durchgeführt. Als Referenzmethode wurde das kulturelle Verfahren nach KNÖDL (2008) ausgewählt, welches das bereits etablierte kulturelle Verfahren des Labors darstellt.

6.3.1 Inklusivität und Exklusivität der Real-Time PCR

Inklusivität:

Die Überprüfung der Inklusivität auf das *ail*-Gen von *Y. enterocolitica* erfolgte über den Nachweis von Reinkulturen des *Y. enterocolitica* DSM Stammes 11502. Dieser wurde zur Anzucht aus der Cryobank entnommen und unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitsbank auf Columbia-Blutagar ausgestrichen (3-Ösenausstrich). Die Bebrütung erfolgte bei +30 °C für 24-48 h. Es folgte die Entnahme von circa zehn Einzelkolonien, welche in 10 ml CASO-Bouillon (= Ausgangsbouillon) suspendiert wurden. Die beimpfte CASO-Bouillon wurde über Nacht bei +30 °C bebrütet. Am folgenden Tag erfolgte das Anlegen einer dezimalen Verdünnungsreihe aus der Ausgangsbouillon in CASO-Bouillon bis zur Verdünnungsstufe 10^{-7} . Zur Ermittlung der Keimzahl/ml der Ausgangsbouillon wurden je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-6} und 10^{-7} im Doppelansatz auf je zwei CIN-Platten im Spatelverfahren ausgespatelt. Die beimpften Nährböden wurden für 20 h bei +30 °C bebrütet. Die Keimzahl pro ml wurde durch Berechnung aus den Koloniezahlen der niedrigsten und der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe mittels folgender Formel errechnet:

Formel 4: Gewogenes arithmetisches Mittel

$$\bar{c} = \frac{\Sigma c}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1} \times d$$

\bar{c} = gewogenes arithmetisches Mittel der Koloniezahlen

Σc = Summe der Kolonien aller Platten, die zur Berechnung herangezogen wurden (niedrigste und nächsthöhere auswertbare Verdünnungsstufe)

n_1 = Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe

n_2 = Anzahl der Platten der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe

d = Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe (n_1)

Es wurden zur Berechnung nur Platten herangezogen auf denen zwischen 15 und 300 Kolonien vorlagen. Die Keimzahl je g oder ml ergab sich durch Multiplikation des \bar{c} -Wertes mit dem Verdünnungsfaktor d (niedrigste auswertbare Verdünnungsstufe). Anhand der berechneten Keimzahl konnte die Keimzahl der Ausgangsbouillon ermittelt werden.

Von den Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-7} wurden jeweils 1 ml entnommen und in ein 2 ml Safe Lock Tube (EPPENDORF) überführt. Ab diesem Schritt führten zwei Personen (1 und 2) jeweils im Doppelansatz (A und B) die Untersuchungen durch. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN) unter Einsatz des QIAcube-Aufreinigungsautomaten (QIAGEN). Dafür wurden die entnommenen Verdünnungsstufen bei 7500 rpm für 10 min zentrifugiert und der gewonnene Überstand wurde verworfen. Um die Lyse der Zellen zu erreichen, wurde das Sediment mit 180 μ l ATL Puffer resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 20 μ l Proteinase K (40 mAU/mg). Das Gemisch wurde kurz gevortext und für 1-3 h bei +56 °C auf dem Thermomixer (EPPENDORF) inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung des QIAcube-Automates. Hierfür wurden die mitgelieferten Gefäße gemäß den Herstellerangaben mit den entsprechenden Puffern und Lösungen gefüllt und an die vorgeschriebenen Positionen gesetzt. Anschließend erfolgte das Befüllen der Adaptoren der Zentrifuge mit jeweils einem DNeasy Mini spin column (QIAGEN) und mit einem 1,5 ml Biosphere Micro Tube (SARSTEDT). Die befüllten Adaptoren wurden dann in die Zentrifuge eingesetzt. Nach abgelaufener Inkubationszeit im Thermomixer wurden die Safe Lock Tubes (EPPENDORF) kurz durchgemischt und in den Schüttler des QIAcubes mit geöffnetem Deckel eingerastet. Der QIAcube (QIAGEN) fasst pro Durchgang zwölf Proben. Bei weniger als zwölf Proben musste die Belegung der Positionen gemäß den Herstellerangaben berücksichtigt werden. Nach dem Schließen der Tür wurde an der Displayeinstellung das Programm des DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN) ausgewählt und gestartet. Folgende Schritte wurden dabei von dem QIAcube (QIAGEN) automatisch durchgeführt (Tabelle 30):

Tabelle 30: Arbeitsschritte des QIAcubes (QIAGEN)

1) Zugabe von 200 µl AL Puffer, vortexen
2) Zugabe von 200 µl Ethanol, vortexen
3) Gemisch auf das DNeasy Mini spin column mit Collection tube pipettieren
4) 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren, Collection tube mit Inhalt verwerfen
5) DNeasy Mini spin column in neues Collection tube geben
6) Zugabe von 500 µl AW1 Puffer
7) 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren, Collection tube mit Inhalt verwerfen
8) DNeasy Mini spin column in neues Collection tube geben
9) Zugabe von 500 µl AW2 Puffer
10) 3 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Collection tube mit Inhalt verwerfen
11) DNeasy Mini spin column in neues Safe Look Tube (EPPENDORF) geben
12) Zugabe von 100 µl AE Puffer
13) 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
14) 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren, Inhalt nicht verwerfen
15) Zugabe von 100 µl AE Puffer
16) 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
17) 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren, Inhalt = Eluat

Das Prinzip des DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN) beruht darauf, dass die DNA an die Silikamembran des DNeasy Mini spin column gebunden wird. Mit Hilfe der zwei Waschschrte (Puffer AW1 und AW2) werden Verunreinigungen entfernt. Die Gewinnung des Eluats erfolgt durch zweimalige Zugabe des AE-Puffers. Das mit Hilfe des QIAcubes (QIAGEN) gewonnenen Eluats wurde als Template in die Real Time PCR eingesetzt. Folgendes Pipettierschema (Tabelle 31) und Temperatur-Zeit-Profil (Tabelle 32) wurden hierbei verwendet:

Tabelle 31: Pipettierschema der Real-Time PCR

Komponente	Konzentration	Menge in µl	Endkonzentration im 25 µl Ansatz
QuantiFast Probe PCR Kit	2 x	12,5 µl	1 x
HotStarTaq Plus DNA Polymerase			
PCR Puffer mit Q-Bond			
dNTP's			
Rox			
nukleasefreies Wasser		1 µl	
Primer <i>RT-all 1+2</i>	2 µM	je 2,5 µl	0,2 µM
<i>RT-all</i> -Sonde	2 µM	1 µl	0,08 µM
<i>pUC19</i> -Sonde	2 µM	1 µl	0,08 µM
Template		2,5 µl	
IAC 10 ⁻¹⁰		2 µl	13,4 Kopien
Summe		25 µl	

Tabelle 32: Temperatur-Zeit-Profil der Real-Time PCR

Initialer Aktivierungsschritt: 95 °C, 3 min		
Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Kombinierte Anlagerungs- und Elongationsphase
40	95 °C, 3 s	50 °C, 30 s

Die Auswertung erfolgte anhand des Kurvenverlaufes, der ermittelten C_T-Werte und anhand der Stärke des Fluoreszsignals der Reporter-Farbstoffe FAM und JOE.

Exklusivität:

Die Überprüfung der Exklusivität der Real-Time PCR auf das *ail*-Gen von *Y. enterocolitica* erfolgte über die Untersuchung von 32 Nicht-Zielorganismen mittels Reinkulturen. Hierfür wurden die Stämme aus der Cryobank entnommen und unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitsbank auf Columbia-Blutagar ausgestrichen (3-Ösenausstrich) und gemäß Tabelle 33 bebrütet. Anschließend folgte von jedem Nicht-Zielorganismus die Entnahme von circa zehn Einzelkolonien von der Columbia-Blutagarplatte, die in je 10 ml CASO-Bouillon suspendiert wurden. Die CASO-Bouillons wurden erneut gemäß Tabelle 33 bebrütet.

Tabelle 33: Bebrütungsmodalitäten der Mikroorganismen für die Exklusivität

Nr.	Stämme	Herkunft	Anzuchsbedingungen			
			Nährbouillon	Bebrütung	Bebrütungs- dauer in h	Nährboden
1	<i>Bacillus cereus</i>	DSM 345	CASO-Bouillon	+ 30 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
2	<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 347	CASO-Bouillon	+ 30 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
3	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291	CASO-Bouillon	+ 41,5 °C, mikroaerob	20-24	CASO-Agar
4	<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
5	<i>Citrobacter koseri</i>	DSM 4596	CASO-Bouillon	+ 30 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
6	<i>Clostridium perfringens</i>	DSM 756	CASO-Bouillon	+ 37 °C, anaerob	20-24	Columbia-Blutagar
7	<i>Enterobacter cloacae subs. cloacae</i>	DSM 30054	CASO-Bouillon	+ 30 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
8	<i>Enterobacter pyrinus</i>	DSM 12410	CASO-Bouillon	+ 30 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
9	<i>Enterobacter sakazakii</i>	DSM 4485	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
10	<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 20409	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
11	<i>Escherichia coli</i>	DSM 30083	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
12	<i>Escherichia coli</i>	DSM 1103	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
13	<i>Escherichia coli</i>	NCTC 12900	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
14	<i>Escherichia coli</i>	RKI C600	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
15	<i>Escherichia coli</i>	RKI 01435	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
16	<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 1268	CASO-Bouillon	+ 25 °C, anaerob	72	Columbia-Blutagar
17	<i>Listeria monocytogenes</i>	DSM 12464	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
18	<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 348	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
19	<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 30118	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1117	CASO-Bouillon	+ 25 °C, aerob	20-24	PC-Agar
21	<i>Salmonella choleraesuis</i>	DSM 5569	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
22	<i>Salmonella Saint Paul</i>	CVUA KA	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
23	<i>Shigella sonnei</i>	DSM 5570	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
24	<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 1104	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
25	<i>Vibrio cholerae</i>	LUA 101345	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
26	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	LUA 101349	CASO-Bouillon	+ 37 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
27	<i>Yersinia enterocolitica Biotyp 1A</i>	LMU 1M32	CASO-Bouillon	+ 30 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
28	<i>Yersinia frederiksenii</i>	LMU 5M30	CASO-Bouillon	+ 30 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
29	<i>Yersinia intermedia</i>	LMU 5M25	CASO-Bouillon	+ 30 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
30	<i>Yersinia kristensenii</i>	LMU 2M25	CASO-Bouillon	+ 30 °C, aerob	20-24	CASO-Agar
31	<i>Candida albicans</i>	DSM 1386	CASO-Bouillon	+ 25 °C, aerob	20-24	YGC-Agar
32	<i>Geotrichum candidum</i>	DSM 1240	CASO-Bouillon	+ 25 °C, aerob	20-24	YGC-Agar

CASO = Caseinpepton-Sojamehlpepton, YGC = Yeast Glucose Chloramphenicol, PC = Plate Count

ATCC = American Type Culture Collection, DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

CVUA KA = Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe, LUA = Landesuntersuchungsamt für Chemie, Hygiene und Vetreinärmedizin

LMU = Ludwig-Maximilians-Universität München, NCTC = National Collection of Type Cultures, RKI = Robert Koch Institut

Nach der Bebrütung in der Nährbouillon erfolgte je Stamm das Anlegen einer dezimalen Verdünnungsreihe in CASO-Bouillon bis zur Verdünnungsstufe 10^{-7} . Zur Ermittlung der Keimzahl pro ml der Ausgangsbouillons wurden je 100 μl der Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-7} im Doppelansatz auf die entsprechenden Nährböden gemäß Tabelle 33 ausgespatelt und bebrütet. Die Berechnung der Keimzahl pro ml der Ausgangsbouillons erfolgte mit Hilfe der zuvor beschriebenen Formel nach dem gewogenen arithmetischen Mittel (Formel 4). Von den Verdünnungsstufen 10^{-2} wurden jeweils 1 ml entnommen und in ein 2 ml Safe Lock Tube (EPPENDORF) überführt. Lediglich bei einem Keim (*Lactobacillus brevis*) musste die Verdünnungsstufe 10^{-1} entnommen werden, da dieser Keim in Vorversuchen ein schlechtes Wachstum gezeigt hatte. Die Durchführung der Untersuchung erfolgte ab diesem Schritt von zwei Personen (1 und 2) jeweils im Doppelansatz (A und B). Zur DNA-Extraktion wurde der InstaGene™ Matrix von BIORAD eingesetzt. Dieser beruht auf dem Prinzip des Anionenaustauschers mit anschließender Zellyse bei $+99\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zunächst erfolgte die Zentrifugation der entnommenen Verdünnungsstufen bei 13000 rpm für 1 min. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde in 200 μl InstaGene™ Matrix resuspendiert. Das Gemisch wurde für 30 min bei $+56\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Thermomixer (EPPENDORF) inkubiert. Anschließend erfolgte das Vortexen des Gemisches und eine weitere Inkubation für 8 min bei $+99\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nach erneutem kurzem Mischen wurden die Verdünnungsstufen für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues 2 ml Safe Lock Tube (EPPENDORF) überführt. Dieser kam als Template gemäß Tabelle 31 und Tabelle 32 in die Real-Time PCR zum Einsatz. Die Auswertung erfolgte anhand des Kurvenverlaufes, der ermittelten C_T -Werte und anhand der Stärke des Fluoreszsignals der Reporter-Farbstoffe FAM und JOE.

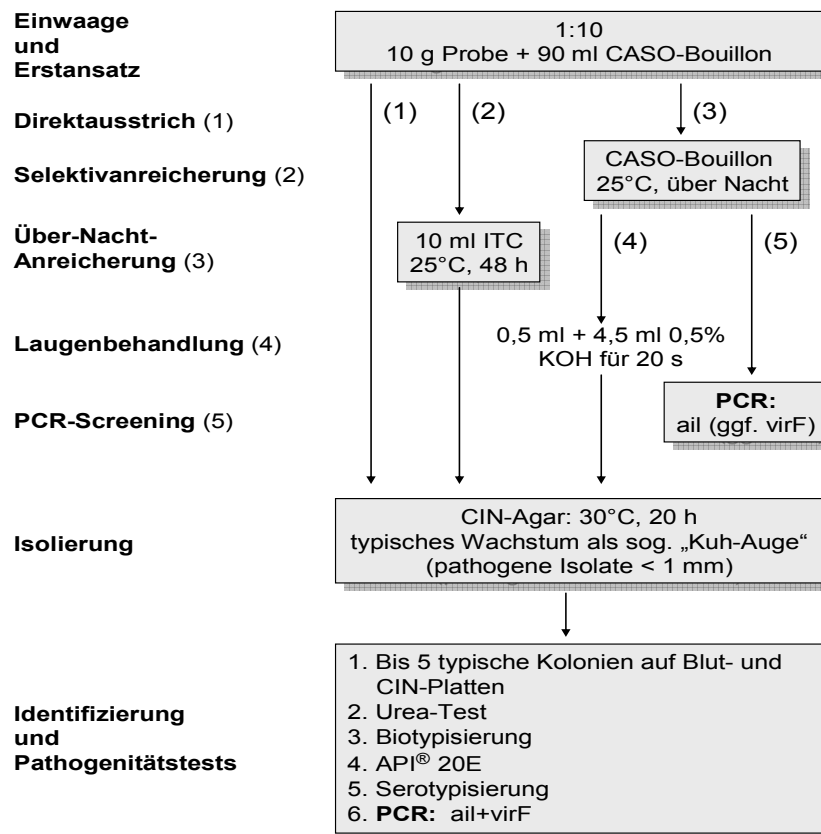
6.3.2 Inklusivität und Exklusivität der Kolonie-DNA-Hybridisierung

Für die Überprüfung der Inklusivität und Exklusivität der Kolonie-DNA-Hybridisierung wurden die gleichen Mikroorganismen, wie bereits für die Inklusivität und Exklusivität der Real-Time PCR beschrieben (Kapitel 6.3.1), eingesetzt. Die Entnahme aus der Cryobank und die Bebrütung fanden, wie oben erläutert, statt. Die Kolonie-DNA-Hybridisierung wurde wie in Kapitel 10 beschrieben durchgeführt, allerdings mit der Ausnahme, dass alle Mikroorganismen gemäß einer Positivkontrolle direkt mittels einer sterilen Öse auf die Nylonmembran aufgetragen wurden. Pro Keim wurden mehrere Kolonien aufgetragen, so dass demzufolge keine Mutterplatten zum Einsatz kamen. Um die Beschriftung der Nylonmembranen zu erleichtern, wurde für jeden Exklusivitätskeim eine fortlaufende Nummer vergeben. Die Nylonmembranen wurden mehrfach geteilt, damit pro Nylonmembran circa zehn bis zwölf Keime aufgetragen werden konnten. Der

Y. enterocolitica Zielkeim DSM 11502 wurde als Inklusivitätskeim mit einem + markiert und auf jede Nylonmembran aufgetragen. Die Durchführung der Kolonie-DNA-Hybridisierung erfolgte von zwei Personen (1 und 2) jeweils im Doppelansatz (A und B). Die Auswertung wurde anhand des gebildeten Hybridisierungssignals durchgeführt.

6.3.3 Bestimmung der Nachweisgrenzen und Verfahrensvergleich

Die Überprüfung der Nachweisgrenzen der Real-Time PCR sowie der Kolonie-DNA-Hybridisierung erfolgte in Kombination mit einer Verfahrensvergleichsuntersuchung. Als Referenzmethode diente das kulturelle Verfahren nach KNÖDL (2008), welches das etablierte Verfahren des Labors darstellt (Abbildung 5).



CASO = Caseinpepton-Sojamehlpepton, CIN = Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
ITC = Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat, KOH = Kaliumhydroxid

Abbildung 5: Verfahrensdigramm aus KNÖDL (2008)

6.3.3.1 Einwaage und Erstansatz mit Beimpfung

Die Überprüfung erfolgte über die Untersuchung von beimpftem Rinderhackfleisch mit dem *Y. enterocolitica* DSM Stamm 11502 als Zielkeim. Die Anzucht des Zielkeimes, die Erstellung der Verdünnungsreihe sowie die Ermittlung der Keimzahl pro ml erfolgte wie unter [Kapitel 6.3.1](#) für die Inklusivität beschrieben, wobei die Verdünnungsreihe allerdings bis zur Verdünnungsstufe 10^{-8} angelegt wurde. Anhand der ermittelten Keimzahl pro ml konnte die Keimzahl für die beimpften Hackfleischproben als KbE/10 g errechnet werden.

Für beide Verfahren (kulturelles Verfahren nach KNÖDL 2008 und eigenes Verfahren) erfolgte das Ansetzen einer gemeinsamen Einwaage. Zur künstliche Kontamination wurden jeweils 1 ml der Verdünnungsstufen 10^{-5} bis 10^{-8} des *Y. enterocolitica* DSM Stammes in einem Stomacherbeutel mit Filtereinsatz auf 10 g Rinderhackfleisch verbracht und für 2 min im Bag Mixer (INTERSCIENCE) homogenisiert. Anschließend wurde je Probe 90 ml CASO-Bouillon zugegeben und erneut im Bag Mixer für 2 min homogenisiert. Zusätzlich erfolgte das Mitführen einer unbeimpften Probe, bei welcher auf die Kontamination der Erstverdünnung verzichtet wurde. Von dieser unbeimpften Erstverdünnung wurde zur Bestimmung der produktspezifischen Begleitflora die Gesamtkeimzahl des Hackfleisches mittels Spatelverfahren bestimmt. Dafür erfolgte das Anlegen einer dezimalen Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe 10^{-3} . Von den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-3} wurden im Doppelansatz jeweils 100 µl auf Plate Count-Agar (PC) ausgespatelt, um die Gesamtkeimzahl pro g Lebensmittel gemäß dem gewogenen arithmetischen Mittel ([Formel 4](#)) bestimmen zu können. Die Bebrütung der Platten erfolgte bei $+30\text{ °C}$ für 72 h.

6.3.3.2 Nachweisgrenze der Real-Time PCR

Die Überprüfung der Nachweisgrenze der Real-Time PCR erfolgte sowohl aus der nicht-selektiven CASO- als auch aus der selektiven ITC-Anreicherung. Damit sollte das optimale Anreicherungsmedium zur Durchführung der Real-Time PCR ermittelt werden. Für die selektive Anreicherung in ITC wurden daher zu je 10 ml ITC-Basis jeweils 10 µl der Supplemente Irgasan (0,1%) und Ticarcillin (0,1%) zugegeben. Nach einer Wiederbelebungszeit von circa 4 h bei Raumtemperatur wurden je 1 ml des Erstansatzes (CASO-Bouillon) in 10 ml ITC überführt. Die Bebrütung erfolgte bei $+25\text{ °C}$ für 48 h. Die CASO-Bouillon wurde über Nacht (16-20 h) im Stomacherbeutel mit Filtereinsatz und Clip-Verschluss bei $+25\text{ °C}$ bebrütet. Im Anschluss an die Bebrütungsphase wurden die Anreicherungen für 10 s gründlich gemischt. Es folgte die Entnahme von je 1 ml von zwei Personen (1 und 2) jeweils im Doppelansatz (A und B) von jeder Probe (beimpft und unbeimpft) aus beiden Anreicherungen. Die DNA-Extraktion wurde mit dem DNeasy® Blood

& Tissue Kit (QIAGEN) unter Einsatz des QIAcubes (QIAGEN) wie in [Kapitel 6.3.1](#) beschrieben, durchgeführt. Das daraus entstandene Eluat wurde als Template, gemäß [Tabelle 31](#) und [Tabelle 32](#), in die Real-Time PCR eingesetzt. Die Auswertung erfolgte anhand des Kurvenverlaufes, der ermittelten C_t -Werte und anhand der Stärke des Fluoreszsignals von FAM und JOE.

6.3.3.3 Nachweisgrenze der Kolonie-DNA-Hybridisierung

Die Überprüfung der Nachweisgrenze der Kolonie-DNA-Hybridisierung erfolgte gemäß den Vorversuchen hinsichtlich des optimalen Anreicherungsmediums ([Kapitel 8.2](#)) lediglich aus den Direktausspatelungen. Dafür wurden von jeder beimpften Probe 100 µl des Erstansatzes von zwei Personen (1 und 2) jeweils im Doppelansatz (A und B) auf CIN-Agar ausgespatelt. Zur Beurteilung der optimalen Wiederbelebenszeit des Erstansatzes bei Raumtemperatur erfolgte das Ausspateln nach jeweils 2, 4 und 6 h. Die Platten wurden für 20 h bei +30 °C bebrütet. Am folgenden Tag erfolgte die Durchführung der Kolonie-DNA-Hybridisierung gemäß [Kapitel 10](#). Die Auswertung erfolgte anhand des gebildeten Hybridisierungssignals und weiteren Bestätigungsreaktionen. Bei einem positiven Hybridisierungssignal wurden die Nylonmembranen gemäß den Markierungen auf die entsprechenden Mutterplatten gelegt. Die entsprechenden Kolonien der positiven Hybridisierungssignale wurden mit einer sterilen Öse von den Mutterplatten entnommen und mittels eines 3-Ösenausstriches auf CIN-Agar aufgebracht. Die beimpften Nährböden wurden bei +30 °C für 20 ± 2 h bebrütet. Am folgenden Tag erfolgte die Überprüfung der Kolonien auf Morphologie und Reinheit. Nach 20 h Bebrütung (± 2 h) bei +30 °C bildet *Y. enterocolitica* auf CIN-Agar Kolonien mit himbeerrotem Zentrum, die eine klare Randzone (sog. „Kuh-Augen“) aufweisen. Der Durchmesser dieser Kolonien liegt bei < 1 mm. Falls Mischkulturen vorlagen, wurden Reinigungsausstriche angefertigt. Sobald die Kolonien rein auf CIN-Agar vorlagen, wurden diese für weitere Bestätigungsreaktionen auf Columbia-Blutagar ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte für 20 ± 2 h bei +30 °C. Zur Bestätigung der isolierten Kolonien wurden die Bestätigungsreaktionen nach [Kapitel 10](#) durchgeführt. Ab der Biotypisierung wurden die Reaktionen allerdings nur noch mit einer isolierten Kolonie pro Beimpfungsstufe, Person und Doppelansatz durchgeführt.

6.3.3.4 Nachweisgrenze des kulturellen Verfahrens nach KNÖDL (2008)

Das kulturelle Verfahren nach KNÖDL wurde wie dort beschrieben (KNÖDL 2008), von zwei Personen (1 und 2) im Doppelansatz (A und B) durchgeführt.

6.4 Vierter Teil: Verfahrensdiagramm

Als Grundlage zur Erstellung des Verfahrensdiagrammes wurden die Ergebnisse der Vorversuche und der In house-Validierung herangezogen. Folgende Parameter mussten vor der Erstellung des Verfahrensdiagrammes in den ersten drei Teilen dieser Arbeit zunächst ermittelt werden:

- **Aus den Vorversuchen der Real-Time PCR:**
 - optimale Primerkonzentration ([Kapitel 7.1](#))
 - optimale Anlagerungs-Temperatur ([Kapitel 7.1](#))
 - optimale Konzentration der TaqMan Sonde ([Kapitel 7.2](#))
 - optimaler Master Mix ([Kapitel 7.2](#))
 - optimale Kopienzahl/ μ l der IAC ([Kapitel 7.3](#))
- **Aus den Vorversuchen der Kolonie-DNA-Hybridisierung:**
 - optimales Anreicherungsmedium ([Kapitel 8.2](#))
- **Aus der In house-Validierung:**
 - optimales Anreicherungsmedium für die Real-Time PCR ([Kapitel 9.3.1](#))
 - Ermittlung der optimalen Wiederbelebenszeit für das Verfahren der Direktausspatelung der Kolonie-DNA-Hybridisierung ([Kapitel 9.3.2](#))
 - Überprüfung der Anwendbarkeit der Real-Time PCR als Screening-Methode ([Kapitel 9.3 und 9.4](#))
 - Überprüfung der Eignung der Kolonie-DNA-Hybridisierung als eine alternative Isolierungs-Methode ([Kapitel 9.3 und 9.4](#))

6.5 Fünfter Teil: Untersuchung der Schweinefleischproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 100 rohe Schweinefleischproben in der Zeit von Januar bis Juli 2008 mittels des in [Kapitel 10](#) beschriebenen Verfahrens auf das Vorkommen von pathogenen *Y. enterocolitica* untersucht. Bei Eingang der Proben wurden diese bis zum Untersuchungsbeginn bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Am Tag der Untersuchung erfolgte das Auftauen bei Raumtemperatur. Lediglich die Untersuchung der schlachtfrischen Zungen wurde unmittelbar nach Probeneingang durchgeführt. Für die Ersteinwaage erfolgte eine 1:10 Verdünnung von 10 g Probenmaterial mit 90 ml CASO-Bouillon. Nach einer 4-6-stündigen Wiederbelebenszeit wurden 100 μ l zur Durchführung der Kolonie-DNA-Hybridisierung auf Nährböden ausgespatelt. Gleichzeitig erfolgte das Überführen von 1 ml dieser Ersteinwaage in 10 ml ITC-Bouillon, welche als Grundlage für die Real-Time PCR diente ([Kapitel 10](#)).

ERGEBNISSE

7 Erster Teil: Vorversuche zur Real-Time PCR

7.1 Vorversuche mit SYBR Green

Bei den Versuchen zur Primerkonzentration von 0,1 µM und 0,2 µM wurde mit der Primerkonzentration von 0,2 µM deutlich bessere Ergebnisse erzielt (Tabelle 34).

Tabelle 34: Ergebnisse zur idealen Primerkonzentration der SYBR Green PCR

Primerkonzentration	C _t -Werte für DSM Stamm 11502, bei einer Anlagerungs-Temperatur von 54 °C, 30 s			
	Verdünnung	Verdünnung	Verdünnung	Verdünnung
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
0,1 µM	29,6	31,21	36,53	n.m.
0,2 µM	27,42	28,62	33,63	n.m.

C_t-Wert = Treshold Cycle
n.m. = nicht messbar

Die Versuche zum Temperatur-Zeit-Profil ergaben eine optimale Anlagerungs-Temperatur bei +50 °C für 60 s (Tabelle 35 und Abbildung 6).

Tabelle 35: Ergebnisse zum Temperatur-Zeit-Profil der SYBR Green PCR

Initialer Aktivierungsschritt: 95 °C, 10 min				C _t -Werte für DSM Stamm 11502			
Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Anlagerung	Elongation	Verdünnung	Verdünnung	Verdünnung	Verdünnung
				10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
40	95 °C, 15 s	50 °C, 30 s	72 °C, 30 s	26,68	32,81	n.m.	n.m.
"	"	50 °C, 45 s	"	25,59	30,52	35,92	n.m.
"	"	50 °C, 60 s	"	23,15	24,19	29,09	32,87
"	"	52 °C, 30 s	"	25,92	32,89	n.m.	n.m.
"	"	52 °C, 45 s	"	25,22	26,68	33,64	n.m.
"	"	52 °C, 60 s	"	26,05	30,3	35,45	n.m.
"	"	54 °C, 30 s	"	29,32	32,92	38	n.m.
"	"	54 °C, 45 s	"	26,81	30,22	34,92	n.m.
"	"	54 °C, 60 s	"	26,58	30,29	35,15	n.m.
"	"	56 °C, 30 s	"	29,08	31,75	n.m.	n.m.
"	"	56 °C, 45 s	"	28,16	32,76	n.m.	n.m.
"	"	56 °C, 60 s	"	29,21	32,92	n.m.	n.m.
"	"	58 °C, 30 s	"	31,33	38	n.m.	n.m.
"	"	58 °C, 45 s	"	30,17	n.m.	n.m.	n.m.
"	"	58 °C, 60 s	"	29,09	33,42	n.m.	n.m.
"	"	60 °C, 30 s	"	35,03	38	n.m.	n.m.
"	"	60 °C, 45 s	"	38	n.m.	n.m.	n.m.
"	"	60 °C, 60 s	"	32,69	n.m.	n.m.	n.m.

Abschließend: Schmelzkurvenanalyse: 60 °C → 95 °C

C_t-Wert = Treshold Cycle
n.m. = nicht messbar

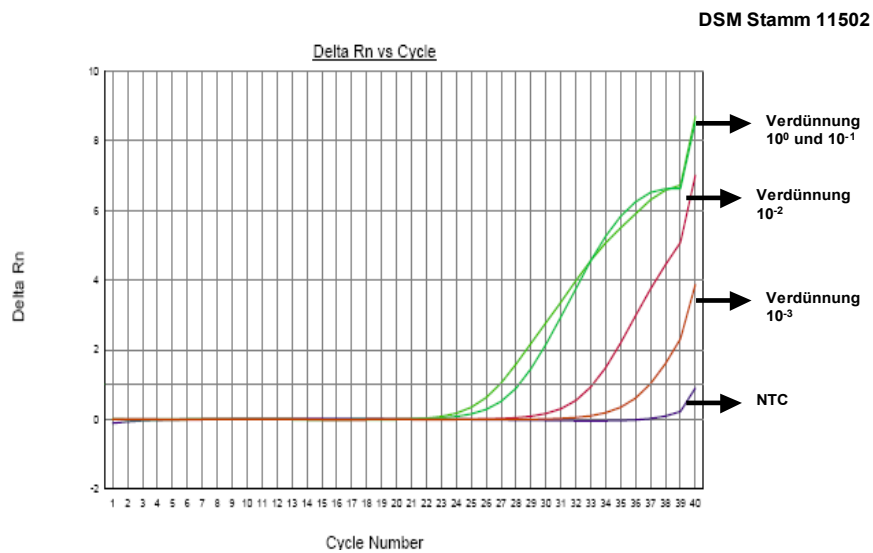


Abbildung 6: Lineare Darstellung des DSM Stammes 11502 in der SYBR Green PCR

Die Schmelzkurve des 90 bp großen Fragmentes des *ail*-Gens konnte bei 75,7 °C ermittelt werden (Abbildung 7).

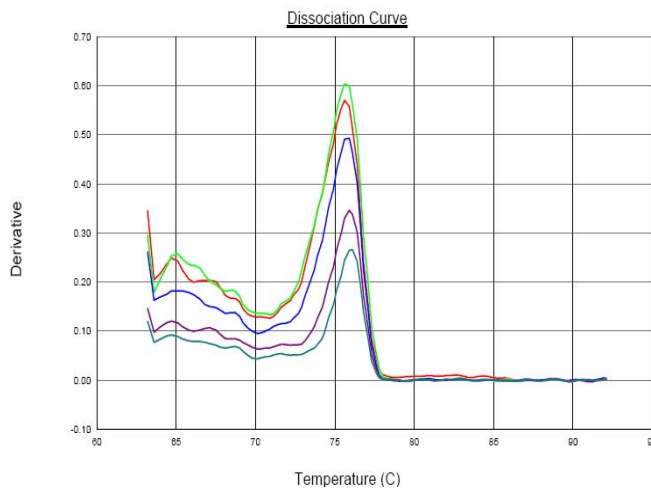


Abbildung 7: Schmelzkurve des *ail*-Fragmentes der SYBR Green PCR bei +75,7 °C

7.2 Vorversuche mit der TaqMan Sonde

Bei den Versuchen zur Ermittlung der optimalen TaqMan Sondenkonzentration (0,05 µM, 0,08 µM und 0,1 µM) konnte mit der Sondenkonzentration von 0,08 µM das beste Ergebnis erzielt werden (Tabelle 36).

Tabelle 36: Ergebnisse der idealen TaqMan Sondenkonzentration

Sondenkonzentration	C _t -Werte für DSM Stamm 11502			
	Verdünnung 10 ⁰	Verdünnung 10 ⁻¹	Verdünnung 10 ⁻²	Verdünnung 10 ⁻³
	0,05 µM	27,56	30,41	34,11
0,08 µM	27,47	30	33,75	37,74
0,1 µM	28	30,81	34,95	39,65

C_t-Wert = Threshold Cycle

Bei den Versuchen zur Ermittlung des idealen Master Mixes erwies sich der QuantiFast Probe PCR Kit von QIAGEN als optimal (Tabelle 37 und Abbildung 8).

Tabelle 37: Ergebnisse der TaqMan PCR mit unterschiedlichen Master Mixen

Master Mixe		C _t -Werte für DSM Stamm 11502			
		Verdünnung 10 ⁰	Verdünnung 10 ⁻¹	Verdünnung 10 ⁻²	Verdünnung 10 ⁻³
		QIAGEN	QuantiTect Probe PCR Master Mix	27,47	30
APPLIED BIOSYSTEMS	TaqMan Universal Master Mix	32,21	34,54	40	n.m.
AB GENE	Absolute QPCR Rox Mix	25,89	29,7	34,33	38,22
QIAGEN	QuantiFast Probe PCR Kit	21,73	25,32	30,37	35,18

C_t-Wert = Threshold Cycle
n.m. = nicht messbar

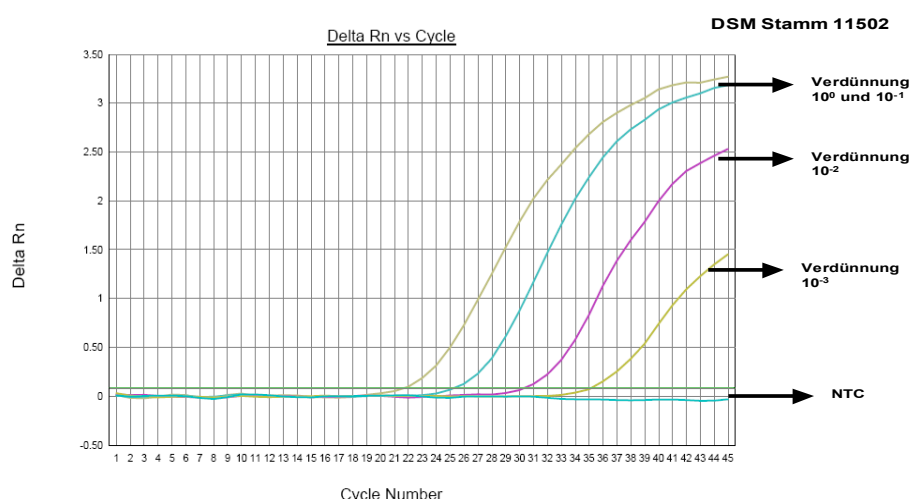


Abbildung 8: Lineare Darstellung des DSM Stammes 11502 in der TaqMan PCR

7.3 Konstruktion einer IAC für die TaqMan PCR

Die Größe der über konventionelle PCR hergestellten IAC, konnte mit Hilfe der Gelelektrophorese und durch Vergleich mit den Längensstandardmarkern bei 218 bp ermittelt werden (Abbildung 9).

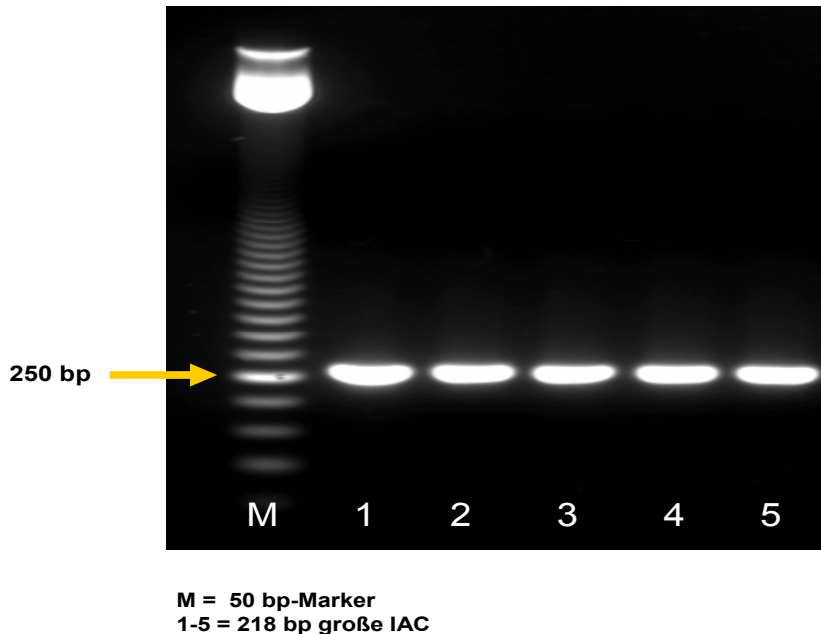


Abbildung 9: Konventionelle PCR der 218 bp großen IAC

Nach dem Aufreinigungsschritt betrug die Masse der hergestellten IAC mittels Photometermessung 16 ng/µl. Hieraus wurde mittels der Formel (Formel 3) eine Kopienzahl von $6,7 \times 10^{10}$ Kopien pro µl errechnet. Diese Ursprungskopienzahl wurde für den Einsatz in die Real-Time PCR mit Hilfe einer dezimalen Verdünnungsreihe verdünnt (Tabelle 38). Hiermit sollte die niedrigste Konzentration an IAC, die gerade noch in der Lage war ein positives Signal zu erzielen, ohne dabei die Amplifikation der Ziel-DNA (*ail*-Gen von *Y. enterocolitica*) zu hemmen, ermittelt werden.

Tabelle 38: Eingesetzte Verdünnungsstufen der IAC in die TaqMan PCR

Masse	Kopienzahl	Verdünnungsstufe
16 ng/µl	$6,7 \times 10^{10} / \mu\text{l}$	10^0
1,6 ng/µl	$6,7 \times 10^9 / \mu\text{l}$	10^{-1}
0,16 ng/µl	$6,7 \times 10^8 / \mu\text{l}$	10^{-2}
$1,6 \times 10^{-2}$ ng/µl	$6,7 \times 10^7 / \mu\text{l}$	10^{-3}
$1,6 \times 10^{-3}$ ng/µl	$6,7 \times 10^6 / \mu\text{l}$	10^{-4}
$1,6 \times 10^{-4}$ ng/µl	$6,7 \times 10^5 / \mu\text{l}$	10^{-5}
$1,6 \times 10^{-5}$ ng/µl	$6,7 \times 10^4 / \mu\text{l}$	10^{-6}
$1,6 \times 10^{-6}$ ng/µl	$6,7 \times 10^3 / \mu\text{l}$	10^{-7}
$1,6 \times 10^{-7}$ ng/µl	$6,7 \times 10^2 / \mu\text{l}$	10^{-8}
$1,6 \times 10^{-8}$ ng/µl	67 / µl	10^{-9}
$1,6 \times 10^{-9}$ ng/µl	6,7 / µl	10^{-10}

Es zeigte sich, dass die Verdünnungsstufen 10^{-8} , 10^{-9} und 10^{-10} die Amplifikation der pathogenen *Y. enterocolitica* am wenigsten beeinflussten (Tabelle 39).

Tabelle 39: Optimale Verdünnungsstufen der IAC für den Einsatz in die TaqMan PCR

Verdünnungsstufe der IAC	C _t -Werte für DSM Stamm 11502			
	Verdünnung 10 ⁰	Verdünnung 10 ⁻¹	Verdünnung 10 ⁻²	Verdünnung 10 ⁻³
IAC 10 ⁻⁸	25,83	29,37	34,65	41,34
IAC 10 ⁻⁹	26,18	29,63	34,61	40,19
IAC 10 ⁻¹⁰	25,16	28,62	34,25	40,13

C_t-Wert = Treshold Cycle

Die besten C_t-Werte des DSM Stammes 11502 konnten mit der Verdünnungsstufe 10⁻¹⁰ der IAC (Kopienzahl 6,7/μl) erzielt werden (Abbildung 10). Letztere wurde daher für alle folgenden Untersuchungen eingesetzt.

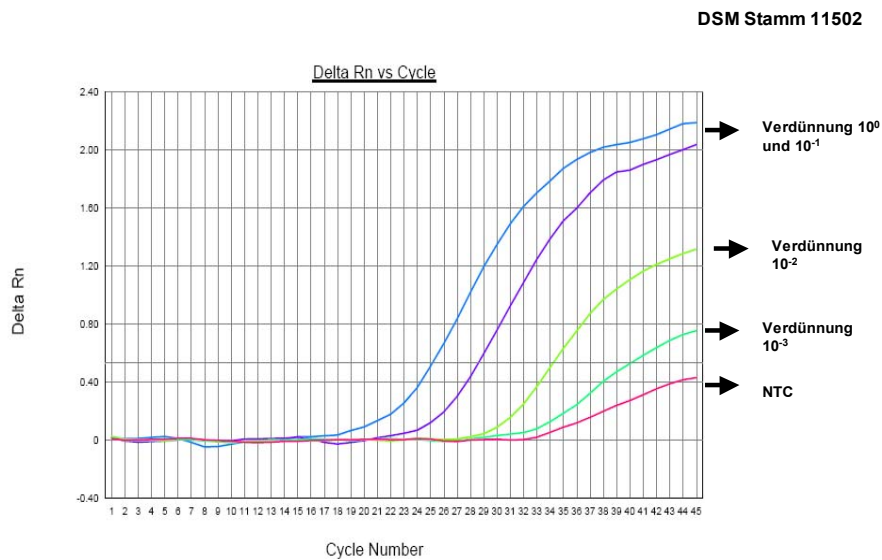


Abbildung 10: Lineare Darstellung des DSM Stammes 11502 in der TaqMan PCR mit der IAC 10⁻¹⁰

Um unspezifische Fluoreszenzsignale während der letzten Zyklen zu minimieren, wurde abschließend die Anzahl der Gesamtzyklen von 45 auf 40 reduziert (Tabelle 40).

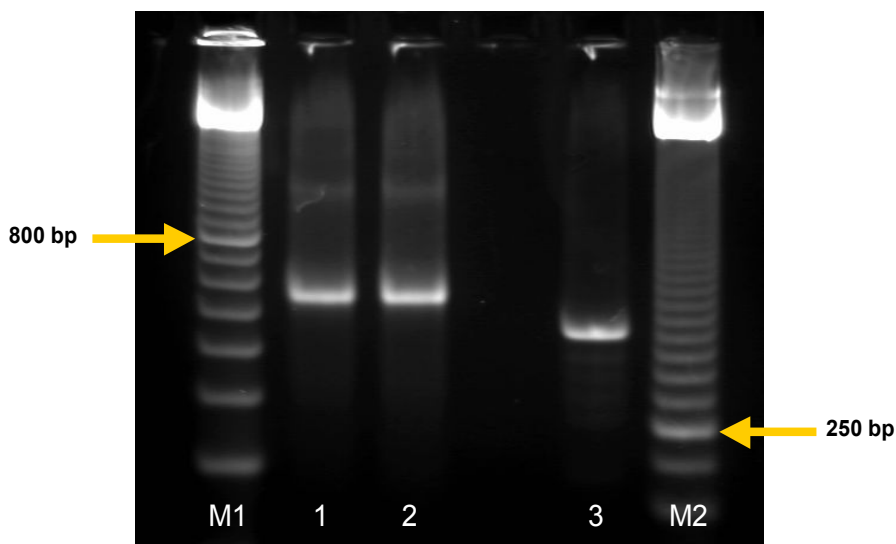
Tabelle 40: Temperatur-Zeit-Profil der TaqMan PCR mit IAC

Initialer Aktivierungsschritt: 95 °C, 3 min		
Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Kombinierte Anlagerungs- und Elongationsphase
40	95 °C, 3 s	50 °C, 30 s

8 Zweiter Teil: Vorversuche zur Kolonie-DNA-Hybridisierung

8.1 Herstellung der mit Digoxigenin markierten Hybridisierungssonde

Bei der Überprüfung des PCR-Produktes aus dem ersten PCR-Schritt konnte das 454 bp große Produkt des *ail*-Gens mit Hilfe der Längenstandardmarker identifiziert werden. Durch den Einbau des Digoxigenin-dUTP beim zweiten PCR-Schritt ergab sich eine Verminderung der elektrophoretischen Motilität von 454 bp auf circa 500 bp. Die nicht markierte Hybridisierungssonde wurde durch die schnellere Wanderungsgeschwindigkeit weiterhin bei einer Größe von 454 bp identifiziert (Abbildung 11).



M1 = 100 bp-Marker
M2 = 50 bp-Marker
1+2 = markierte Sonde (circa 500 bp)
3 = nicht markierte Sonde (454 bp)

Abbildung 11: Konventionelle PCR der markierten und nicht markierten Hybridisierungssonde

Die Messung der dsDNA Konzentration der Hybridisierungssonde mit Hilfe des Photometers ergab eine Konzentration von 228 ng/µl. Insgesamt konnten 400 µl der Sonde hergestellt werden, was einer Konzentration von 91200 ng/400 µl entsprach. Um eine Konzentration von 100 ng/ml zu erhalten, wurden die 400 µl mit 2280 ml der DIG Easy Hyb Hybridisierungslösung (ROCHE) verdünnt und anschließend als Gemisch bei -20 °C tiefgefroren.

8.2 Ermittlung des optimalen Anreicherungsmediums

Nach der Bebrütung konnten, aufgrund des starken Koloniewachstums, lediglich die Nährböden der Direktausspatelung ohne eine weitere Verdünnung in die Kolonie-DNA-Hybridisierung eingesetzt werden. Sowohl die nicht-selektive CASO-Anreicherung als auch die selektive ITC-Anreicherung waren, aufgrund der starken Vermehrung der Begleitflora, vollständig überwachsen. Somit konnten bei der CASO- bzw. ITC-Anreicherung lediglich die Nährböden der Verdünnungsstufe 10^{-3} bzw. 10^{-4} für die Kolonie-DNA-Hybridisierung eingesetzt werden (Tabelle 41).

Tabelle 41: Verdünnungsstufen für den Einsatz in die Kolonie-DNA-Hybridisierung

Wiederbelebung bzw. Anreicherung	In Frage kommende Verdünnungsstufen für die Hybridisierung
Direktausspatelung	10^0
nicht-selektive CASO-Anreicherung	10^{-3} und 10^{-4}
selektive ITC-Anreicherung	10^{-4} und 10^{-5}

9 Dritter Teil: In house-Validierung des Verfahrens

9.1 Inklusivität und Exklusivität der Real-Time PCR

Inklusivität:

Bei der Anzucht des eingesetzten Referenzstammes *Y. enterocolitica* DSM 11502 wurde in der über Nacht bebrüteten Keimsuspension eine Keimzahl von $2,3 \times 10^8$ KbE/ml ermittelt.

Bei der Überprüfung der Inklusivität der Real-Time PCR mit Reinkulturen des *Y. enterocolitica* Zielkeimes DSM 11502 gelang der Nachweis des *ail*-Gens in allen 4 Ansätzen ab der Verdünnungsstufe 10^{-5} , was einem Keimgehalt von circa 10^3 KbE/ml entsprach. Die Eignung der Real-Time PCR den Zielkeim nachzuweisen, konnte somit bestätigt werden (Tabelle 42).

Tabelle 42: Ergebnisse der Inklusivität der Real-Time PCR

Zielkeim	Errechnete Keimzahl nach Über-Nacht Bebrütung (KbE/ml)	In PCR eingesetzte Verdünnungsstufen	In PCR eingesetzte Keimgehalte (KbE/ml)	Ergebnis Ansätze			
				1/A	1/B	2/A	2/B
<i>Y. enterocolitica</i> DSM 11502	$2,3 \times 10^8$	10^{-3}	10^5			positiv	
		10^{-4}	10^4			positiv	
		10^{-5}	10^3			positiv	
		10^{-6}	10^2			negativ	
		10^{-7}	10^1			negativ	

Exklusivität:

Bei den zur Überprüfung der Exklusivität der Real-Time PCR eingesetzten und über Nacht bebrüteten Keimsuspensionen der Mikroorganismen konnten die in Tabelle 43 angegebenen Keimgehalte ermittelt werden. Bei keinem der 32 taxonomisch eng, wie auch weniger eng verwandten Mikroorganismen, gelang der Nachweis des Zielgens in den 4 Ansätzen der Reinkulturen (Tabelle 43). Somit konnte das Nichtvorhandensein von störenden Einflüssen durch den Einsatz von Nicht-Zielkeimen in der Real-Time PCR bestätigt werden.

Tabelle 43: Ergebnisse der Exklusivität der Real-Time PCR

Nr.	Zielkeim	Herkunft	Errechnete Keimzahl nach Über-Nacht-Bebrütung (KbE/ml)	In PCR eingesetzte Verdünnungsstufen	In PCR eingesetzte Keimgehalte (KbE/ml)	Ergebnis Ansätze			
						1/A	1/B	2/A	2/B
1	<i>Bacillus cereus</i>	DSM 345	6,8 x 10 ⁷	10 ⁻²	6,8 x 10 ⁵			negativ	
2	<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 347	2,0 x 10 ⁷	10 ⁻²	2,0 x 10 ⁵			negativ	
3	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291	3,2 x 10 ⁷	10 ⁻²	3,2 x 10 ⁵			negativ	
4	<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039	4,9 x 10 ⁸	10 ⁻²	4,9 x 10 ⁶			negativ	
5	<i>Citrobacter koseri</i>	DSM 4596	1,3 x 10 ⁹	10 ⁻²	1,3 x 10 ⁷			negativ	
6	<i>Clostridium perfringens</i>	DSM 756	2,3 x 10 ⁸	10 ⁻²	2,3 x 10 ⁶			negativ	
7	<i>Enterobacter cloacae subs. cloacae</i>	DSM 30054	4,3 x 10 ⁹	10 ⁻²	4,3 x 10 ⁷			negativ	
8	<i>Enterobacter pyrinus</i>	DSM 12410	1,6 x 10 ⁹	10 ⁻²	1,6 x 10 ⁷			negativ	
9	<i>Enterobacter sakazakii</i>	DSM 4485	5,1 x 10 ⁸	10 ⁻²	5,1 x 10 ⁶			negativ	
10	<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 20409	1,7 x 10 ¹⁰	10 ⁻²	1,7 x 10 ⁸			negativ	
11	<i>Escherichia coli</i>	DSM 30083	5,1 x 10 ⁹	10 ⁻²	5,1 x 10 ⁷			negativ	
12	<i>Escherichia coli</i>	DSM 1103	2,2 x 10 ⁹	10 ⁻²	2,2 x 10 ⁷			negativ	
13	<i>Escherichia coli</i>	NCTC 22900	4,0 x 10 ⁹	10 ⁻²	4,0 x 10 ⁷			negativ	
14	<i>Escherichia coli</i>	RKI C600	2,1 x 10 ⁹	10 ⁻²	2,1 x 10 ⁷			negativ	
15	<i>Escherichia coli</i>	RKI 01435	4,3 x 10 ⁹	10 ⁻²	4,3 x 10 ⁷			negativ	
16	<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 1268	6,7 x 10 ⁶	10 ⁻¹	6,7 x 10 ⁵			negativ	
17	<i>Listeria monocytogenes</i>	DSM 12464	5,0 x 10 ⁹	10 ⁻²	5,0 x 10 ⁷			negativ	
18	<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 348	5,4 x 10 ⁸	10 ⁻²	5,4 x 10 ⁶			negativ	
19	<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 30118	1,1 x 10 ⁷	10 ⁻²	1,1 x 10 ⁵			negativ	
20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1117	1,9 x 10 ⁸	10 ⁻²	1,9 x 10 ⁶			negativ	
21	<i>Salmonella choleraesuis</i>	DSM 5569	3,9 x 10 ⁹	10 ⁻²	3,9 x 10 ⁷			negativ	
22	<i>Salmonella Saint Paul</i>	CVUA KA	3,1 x 10 ⁹	10 ⁻²	3,1 x 10 ⁷			negativ	
23	<i>Shigella sonnei</i>	DSM 5570	1,3 x 10 ⁹	10 ⁻²	1,3 x 10 ⁷			negativ	
24	<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 1104	1,2 x 10 ⁹	10 ⁻²	1,2 x 10 ⁷			negativ	
25	<i>Vibrio cholerae</i>	LUA 101345	5,8 x 10 ⁸	10 ⁻²	5,8 x 10 ⁶			negativ	
26	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	LUA 101349	4,6 x 10 ⁸	10 ⁻²	4,6 x 10 ⁶			negativ	
27	<i>Y. enterocolitica Biotyp 1A</i>	LMU 1M32	1,3 x 10 ⁹	10 ⁻²	1,3 x 10 ⁷			negativ	
28	<i>Y. frederiksenii</i>	LMU 5M30	3,1 x 10 ⁸	10 ⁻²	3,1 x 10 ⁶			negativ	
29	<i>Y. intermedia</i>	LMU 5M25	6,6 x 10 ⁸	10 ⁻²	6,6 x 10 ⁶			negativ	
30	<i>Y. kristensenii</i>	LMU 2M25	1,3 x 10 ⁹	10 ⁻²	1,3 x 10 ⁷			negativ	
31	<i>Candida albicans</i>	DSM 1386	4,8 x 10 ⁷	10 ⁻²	4,8 x 10 ⁵			negativ	
32	<i>Geotrichum candidum</i>	DSM 1240	1,2 x 10 ⁷	10 ⁻²	1,2 x 10 ⁵			negativ	

ATCC = American Type Culture Collection, DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

CVUA KA = Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe, LUA = Landesuntersuchungsamt für Chemie, Hygiene und Vetreinärmedizin

LMU = Ludwig-Maximilians-Universität München, NCTC = National Collection of Type Cultures, RKI = Robert Koch Institut

9.2 Inklusivität und Exklusivität der Kolonie-DNA-Hybridisierung

Das *ail*-Gen des *Y. enterocolitica* Zielkeims konnte auf allen Nylonmembranen in allen vier Ansätzen mit Hilfe des blauen Farbniederschlags deutlich detektiert werden. Bei keinem der vier Ansätze der exklusiven Keime hingegen gelang der Nachweis des Hybridisierungssignals (Abbildung 12). Somit konnte die Eignung der Kolonie-DNA-Hybridisierung, das *ail*-Gen spezifisch nachzuweisen, bestätigt werden.

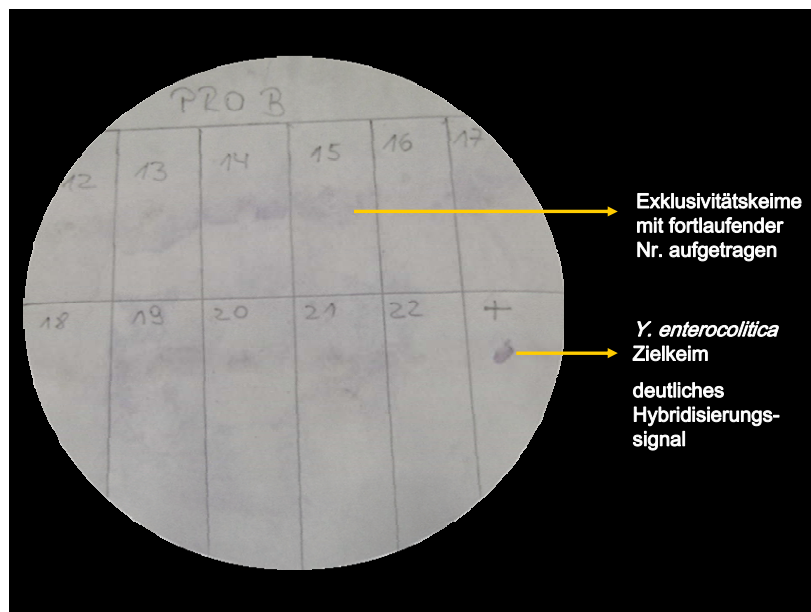


Abbildung 12: Ergebnisse der Inklusivität und Exklusivität der Kolonie-DNA-Hybridisierung

9.3 Ergebnis der Nachweisgrenzen

Bei der Ermittlung der produktspezifischen Begleitflora des eingesetzten Rinderhackfleisches konnte eine Gesamtkeimzahl von $9,0 \times 10^4$ KbE/g ermittelt werden. Bei der zur Inokulation des Rinderhackfleisches eingesetzten Zielkeimes *Y. enterocolitica* DSM 11502 konnte in der über Nacht bebrüteten Keimsuspension eine Keimzahl von $1,0 \times 10^9$ KbE/ml ermittelt werden.

9.3.1 Nachweisgrenze der Real-Time PCR



Die Nachweisgrenze wurde gemäß DIN EN ISO 16140:2003 als die kleinste Anzahl anzüchtbarer Mikroorganismen definiert, die mit einer 50%igen Treffsicherheit in der Probe nachgewiesen werden konnte (Tabelle 5).

Aus der nicht-selektiven CASO-Anreicherung (Bebrütung über Nacht bei +25 °C) konnte die Real-Time PCR nur bei den zwei höchsten eingesetzten Beimpfungsstufen von 10⁴ KbE/10 g und 10³ KbE/10 g (Verdünnungsstufen 10⁻⁵ und 10⁻⁶) in allen vier Ansätzen die pathogenen *Y. enterocolitica* mit Hilfe des *ail*-Gens nachweisen. Bei allen weiteren eingesetzten Beimpfungsstufen ergab die Detektion des *ail*-Gens in allen vier Ansätzen ein negatives Ergebnis (Tabelle 44). Somit konnte die Nachweisgrenze für die nicht-selektive CASO-Anreicherung für Hackfleisch bei einer Impfmenge von 10³ KbE/10 g ermittelt werden.

Aus der selektiven ITC-Anreicherung (Bebrütung für 48 h bei +25 °C) konnte die Real-Time PCR bei allen eingesetzten Beimpfungsstufen von 10⁴-10¹ KbE/10 g (Verdünnungsstufen 10⁻⁵-10⁻⁸) in allen vier Ansätzen das *ail*-Gen detektieren (Tabelle 44). Die Nachweisgrenze aus der selektiven ITC-Anreicherung konnte somit für Hackfleisch bei 10¹ KbE/10 g ermittelt werden. Bei den unbeimpften Ansätzen gelang der Nachweis des *ail*-Gens bei keiner der beiden Anreicherungen.

Tabelle 44: Ergebnis der Nachweisgrenze der Real-Time PCR

Zielkeim	Errechnete Keimzahl nach Über-Nacht-Bebrütung (KbE/ml)	In PCR eingesetzte Verdünnungsstufen	In PCR eingesetzte Keimgehalte (KbE/ml bzw. 10 g)	CASO-Anreicherung				ITC-Anreicherung			
				Ergebnis		Ansätze		Ergebnis		Ansätze	
				1/A	1/B	2/A	2/B	1/A	1/B	2/A	2/B
<i>Y. enterocolitica</i> DSM 11502	1,0 x 10 ⁹	10 ⁻⁵	10 ⁴	+				+			
		10 ⁻⁶	10 ³	+				+			
		10 ⁻⁷	10 ²	-				+			
		10 ⁻⁸	10 ¹	-				+			
		Unbeimpft		-				-			

 positives Ergebnis
 negatives Ergebnis

9.3.2 Nachweisgrenze der Kolonie-DNA-Hybridisierung

Bei der Ermittlung der Nachweisgrenze der Kolonie-DNA-Hybridisierung auf das *ail*-Gen von *Y. enterocolitica* und der anschließenden Isolierung der pathogenen Keime ergaben sich Unterschiede der Direktausspatelung nach verschiedenen Wiederbelebenszeiten. Die Beurteilung erfolgte hinsichtlich eines positiven Hybridisierungssignals in Kombination mit der erfolgreichen Isolierung und den sich anschließenden Bestätigungsreaktionen.



Nach **2 h Wiederbelebenszeit** bei Raumtemperatur konnten die pathogenen *Y. enterocolitica* aus allen vier Ansätzen mit Hilfe der Kolonie-DNA-Hybridisierung nur bei der höchsten eingesetzten Beimpfungsstufe von 10^4 KbE/10 g (Verdünnungsstufe 10^{-5}) isoliert werden. Bei der Beimpfungsstufe von 10^3 KbE/10 g (Verdünnungsstufe 10^{-6}) gelang der kulturelle Nachweis der pathogenen Keime nur in zwei von vier Ansätzen. Bei der Beimpfungsstufe von 10^2 KbE/10 g (Verdünnungsstufe 10^{-7}) hingegen war eine Isolierung aus allen vier Ansätzen nicht möglich (Tabelle 45). Somit betrug die Nachweisgrenze, gemäß der oben beschriebenen Definition (DIN EN ISO 16140:2003), nach der Wiederbelebenszeit von 2 h 10^3 KbE/10 g.

Nach **4 h Wiederbelebenszeit** bei Raumtemperatur gelang die Isolierung der pathogenen Keime aus allen vier Ansätzen bei den eingesetzten Beimpfungsstufen von 10^4 KbE/10 g und 10^3 KbE/10 g (Verdünnungsstufen 10^{-5} und 10^{-6}). Bei der Beimpfungsstufe von 10^2 KbE/10 g (Verdünnungsstufe 10^{-7}) war der kulturelle Nachweis nur in zwei von vier Ansätzen möglich, während bei der Beimpfungsstufe von 10^1 KbE/10 g (Verdünnungsstufe 10^{-8}) die Zielkeime lediglich aus einem der vier Ansätze isoliert werden konnten (Tabelle 45). Die Nachweisgrenze betrug demzufolge nach der Wiederbelebenszeit von 4 h 10^2 KbE/10 g.

Nach **6 h Wiederbelebenszeit** bei Raumtemperatur konnten die pathogenen Zielkeime aus allen vier Ansätzen bei den eingesetzten Beimpfungsstufen von 10^4 KbE/10 g und 10^3 KbE/10 g (Verdünnungsstufen 10^{-5} und 10^{-6}) isoliert werden. Bei der Beimpfungsstufe von 10^2 KbE/10 g (Verdünnungsstufe 10^{-7}) gelang der kulturelle Nachweis der Keime in zwei von vier Ansätzen, während die Isolierung bei der Beimpfungsstufe von 10^1 KbE/10 g (Verdünnungsstufe 10^{-8}) aus allen vier Ansätzen ein negatives Ergebnis erzielte (Tabelle 45). Wie bei der 4 h Wiederbelebenszeit konnte die Nachweisgrenze hier ebenfalls bei 10^2 KbE/10 g ermittelt werden. Die unbeimpften Ansätze ergaben bei allen Wiederbelebenszeiten ein negatives Ergebnis (Tabelle 45).

Tabelle 45: Ergebnis der Nachweisgrenze der Kolonie-DNA-Hybridisierung

Zielkeim	Errechnete Keimzahl nach Über-Nacht-Bebrütung (KbE/ml)	In Hybridisierung eingesetzte Verdünnungsstufen	In Hybridisierung eingesetzte Keimgehalte (KbE/ml bzw. 10 g)	2 h Wiederbelebenszeit				4 h Wiederbelebenszeit				6 h Wiederbelebenszeit									
				Ergebnis Ansätze				Ergebnis Ansätze				Ergebnis Ansätze									
				1/A	1/B	2/A	2/B	1/A	1/B	2/A	2/B	1/A	1/B	2/A	2/B						
<i>Y. enterocolitica</i> DSM 11502	$1,0 \times 10^9$	10^{-5}	10^4			+															
		10^{-6}	10^3	+	-	-	+														
		10^{-7}	10^2			-		+	-	+	-	-	+	-	+						
		10^{-8}	10^1			-		-	+	-	-										
			Unbeimpft					-													

 positives Ergebnis
 negatives Ergebnis

9.3.3 Nachweisgrenze des kulturellen Verfahrens nach KNÖDL (2008)

Das kulturelle Verfahren nach KNÖDL (2008) konnte aus allen vier Ansätzen bei den eingesetzten Beimpfungsstufen von 10^4 KbE/10 g und 10^3 KbE/10 g (Verdünnungsstufen 10^{-5} und 10^{-6}) die pathogenen *Y. enterocolitica* isolieren. Bei der Beimpfungsstufe von 10^2 KbE/10 g (Verdünnungsstufe 10^{-7}) gelang der kulturelle Nachweise der Zielkeime in drei von vier Ansätzen, wohingegen die Beimpfungsstufe von 10^1 KbE/10 g (Verdünnungsstufe 10^{-8}) in allen vier Ansätzen ein negatives Ergebnis erzielte (Tabelle 46). Die Nachweisgrenze konnte somit für Hackfleisch bei 10^2 KbE/10 g ermittelt werden.

Tabelle 46: Ergebnis der Nachweisgrenze des Verfahrens nach KNÖDL (2008)

Zielkeim	Errechnete Keimzahl nach Über-Nacht-Bebrütung (KbE/ml)	Eingesetzte Verdünnungsstufen	Eingesetzte Keimgehalte (KbE/ml bzw. 10 g)	Ergebnis Ansätze			
				1/A	1/B	2/A	2/B
<i>Y. enterocolitica</i> DSM 11502	$1,0 \times 10^9$	10^{-5}	10^4	+			
		10^{-6}	10^3	+			
		10^{-7}	10^2	+	-	+	+
		10^{-8}	10^1	-			
		Unbeimpft			-		



 positives Ergebnis
 negatives Ergebnis

Tabelle 47 zeigt die ermittelten Nachweisgrenzen der beiden Verfahren im Überblick:

Tabelle 47: Ermittelte Nachweisgrenzen im Überblick

Lebensmittel	Nachweisgrenze (KbE/ml bzw. 10 g)					
	Eigenes Verfahren					Verfahren nach KNÖDL
	Kolonie-DNA-Hybridisierung nach einer Wiederbelebenszeit von			Real-Time PCR		Kulturell
	2 h	4 h	6 h	CASO-Anreicherung	ITC-Anreicherung	
Hackfleisch	10^3	10^2	10^2	10^3	10^1	10^2

9.4 Ergebnis des Verfahrensvergleiches

Das eigene Verfahren wurde mit dem von KNÖDL (2008) entwickelten „kulturellen Verfahren zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln“ verglichen. Dafür wurde rohes Rinderhackfleisch mit vier verschiedenen Beimpfungsstufen des *Y. enterocolitica* DSM Stammes 11502 (10^4 , 10^3 , 10^2 und 10^1 KbE/10g) beimpft. Außerdem wurde eine unbeimpfte Probe mitgeführt (Kapitel 6.3.3.1).

Von den **16 inokulierten Proben** konnten mit dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008) aus elf Proben die Zielkeime isoliert werden. Aus einem Ansatz der Beimpfungsstufe 10^2 und aus allen Ansätzen der Beimpfungsstufe 10^1 gelang die kulturelle Isolierung der pathogenen *Y. enterocolitica* nicht.

Mit Hilfe der eigenen Kolonie-DNA-Hybridisierung konnten die Zielkeime nach der erfolgreichsten Wiederbelebenszeit von 4 h aus ebenfalls 11 von 16 Proben isoliert werden. Aus zwei Ansätzen der Beimpfungsstufe 10^2 und aus drei Ansätzen der Beimpfungsstufe 10^1 ergab die Isolierung der pathogenen Keime ein negatives Ergebnis. Dagegen wurden mit Hilfe der Real-Time PCR in allen 16 inokulierten Proben die pathogenen Zielkeime mit Hilfe des *ail*-Gens nachgewiesen. Mit keiner der drei Untersuchungsmethoden konnten die Zielkeime in den **vier nicht-inokulierten Proben** nachgewiesen werden (Tabelle 48).

Tabelle 48: Ergebnisse des Verfahrensvergleiches

Lebensmittel		Hackfleisch																			
Keimgehalt <i>Y. enterocolitica</i> DSM 11502 (KbE/ml bzw. 10 g)		10^4				10^3				10^2				10^1				Unbeimpft			
Ansatz		1/A	1/B	2/A	2/B	1/A	1/B	2/A	2/B	1/A	1/B	2/A	2/B	1/A	1/B	2/A	2/B	1/A	1/B	2/A	2/B
Kulturelles Verfahren nach KNÖDL		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Eigenes Verfahren	Kolonie-DNA-Hybridisierung	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	Real-Time PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

+ positives Ergebnis
- negatives Ergebnis

9.4.1 Vergleich der Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens mit dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008)

Die Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens und das kulturelle Verfahren nach Knödl stellen beide kulturelle Methoden dar, mit dem Ziel, pathogene *Y. enterocolitica* zu isolieren. Zur Überprüfung der Eignung der Kolonie-DNA-Hybridisierung als eine alternative Isolierungs-Methode erfolgte eine Gegenüberstellung beider kultureller Methoden. Die Berechnung der relativen Sensitivität, relativen Spezifität, relativen Falsch-Negativ-Rate, relativen Falsch-Positiv-Rate, der statistischen Übereinstimmung und der relativen Richtigkeit erfolgte, indem die Ergebnisse des Verfahrenvergleiches (Tabelle 48) in das Auswerteschema für qualitative Verfahren eingesetzt wurden (Tabelle 49). Die Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens wurde als die zu validierende Methode eingesetzt, während das kulturelle Verfahren nach KNÖDL (2008) als Referenzmethode diente. Der Einsatz als Referenzmethode wurde durch die Ergebnisse von KNÖDL (2008) ermöglicht, wonach ihr kulturelles Verfahren eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität, wie das Amtliche Verfahren L 00.00-90 nach § 64 des LFGB (N.N. 2004), besitzt.

Tabelle 49: Auswerteschema des Verfahrenvergleiches

Zu validierende Methode (Kolonie-DNA-Hybridisierung)		+	-	Σ
Referenzmethode (KNÖDL 2008)	+	10 ^a	1 ^b	11 ^{a+b}
	-	1 ^c	8 ^d	9 ^{c+d}
	Σ	11 ^{a+c}	9 ^{b+d}	20 ⁿ

+ = positiver Nachweis

- = negativer Nachweis

a = Anzahl der bei beiden Methoden positiven Analysenergebnisse

b = Anzahl der falsch-negativen Analysenergebnisse bezüglich der Referenzmethode

c = Anzahl der falsch-positiven Analysenergebnisse bezüglich der Referenzmethode

d = Anzahl der bei beiden Methoden negativen Analysenergebnisse

n = Gesamtanzahl Analysenergebnisse

Die **relative Sensitivität** (Kapitel 3) errechnet sich als $a/(a + b) \times 100$ und ergab für die Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens einen Wert von **91%** ($10/(10 + 1) \times 100$). Hierbei wurden die zehn Ergebnisse der bei beiden Methoden positiven Ergebnisse, sowie das eine falsch-negative Ergebnis bezüglich der Referenzmethode, berücksichtigt. Das falsch-negative Ergebnis bezeichnet das mit der Referenzmethode positive und zugleich mit der zu validierende Methode negative Ergebnis.

Die **relative Falsch-Negativ-Rate** (Kapitel 3) errechnet sich als $b/(a + b) \times 100$. Hierbei wurde das eine falsch-negative Ergebnis berücksichtigt, das mit der Referenzmethode ein

positives und zugleich ein mit der zu validierenden Methode negatives Ergebnis erzielte. Somit ergab sich für die Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens eine relative Falsch-Negativ-Rate von **9%** ($1/(10 + 1) \times 100$).

Die **relative Spezifität** (Kapitel 3) berechnet sich als $d/(c + d) \times 100$ und ergab somit für die Kolonie-DNA-Hybridisierung als eine alternative Isolierungs-Methode einen Wert von **89%** ($8/(1 + 8) \times 100$). Sie berechnete sich aus den acht bei beiden Verfahren negativen Ergebnissen sowie aus dem einen falsch-positiven Ergebnis bezüglich der Referenzmethode. Das falsch-positive Ergebnis bezeichnet das mit der Referenzmethode negative und zugleich mit der zu validierende Methode positive Ergebnis.

Die **relative Falsch-Positiv-Rate** (Kapitel 3) errechnet sich als $c/(c + d) \times 100$ und ergab somit für die Kolonie-DNA-Hybridisierung einen Wert von **11%** ($1/(1 + 8) \times 100$). Hierbei wurde das eine, mit der Referenzmethode negative, sowie mit dem alternativen Verfahren positive Ergebnis, berücksichtigt. Allerdings werden falsch-positive Ergebnisse als wahre falsch-positive Ergebnisse angesehen, wenn sie durch weitere Bestätigungsverfahren abgesichert wurden (DIN EN ISO 16140:2003; N.N. 2006a). Im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnte das mit dem alternativen Verfahren positive und gleichzeitig mit dem Referenzverfahren negative Ergebnis mit Hilfe von molekularbiologischen, biochemischen und serologischen Bestätigungsverfahren als pathogene *Y. enterocolitica* bestätigt werden. Daher durfte dieses eine falsch-positive Ergebnis nicht als falsch-positiver Befund sondern als wahrer-positiver Befund angesehen werden. Da bei der Berechnung der relativen Spezifität das falsch-positive Analyseergebnis bezüglich der Referenzmethode berücksichtigt wird, musste das auf diese Weise errechnete Ergebnis ebenfalls korrigiert werden. Somit ergab sich für die Kolonie-DNA-Hybridisierung als alternative Methode eine **wahre relative Falsch-Positiv-Rate von 0%** und eine **wahre relative Spezifität von 100%**.

Die Ermittlung der **statistischen Übereinstimmung** (Kapitel 3) erfolgte mit Hilfe des Konkordanzindex Kappa. Dieser wird als $2 \times (a \times d - b \times c) / ((a + c)(c + d) + (a + b)(b + d))$ errechnet. Die Auswertung ergab für Kappa den Wert 0,80 und ergab somit, gemäß der Zuordnung zu den Übereinstimmungsstufen (Tabelle 10), eine starke Übereinstimmung der Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens und dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL.

Die **relative Richtigkeit** (Kapitel 3) berechnet sich als $a + d/n \times 100$. Für die Kolonie-DNA-Hybridisierung als alternative Methode ergab sich somit einen Wert von **90%** ($(10 + 8)/20 \times 100$).

Tabelle 50 zeigt die Ergebnisse des Auswerteschemas im Überblick:

Tabelle 50: Ergebnisse des Auswerteschemas des Verfahrenvergleichs im Überblick

Zu validierende Methode	Referenzmethode	Relative Sensitivität	Wahre Relative Spezifität	Relative Falsch-Negativ-Rate	Wahre Relative Falsch-Positiv-Rate	Statistische Übereinstimmung	Relative Richtigkeit
Kolonie-DNA-Hybridisierung	KNÖDL (2008)	91%	100%	9%	0%	0,8	90%

9.4.2 Vergleich des eigenen Verfahrens mit dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008) in Bezug auf die inokulierten bzw. nicht-inokulierten Proben

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der Real-Time PCR als Screening-Methode, sowie der Kolonie-DNA-Hybridisierung als alternative Isolierungs-Methode, erfolgte die Berechnung der Sensitivität, Spezifität, Falsch-Negativ-Rate und Falsch-Positiv-Rate in Bezug auf die inokulierten bzw. nicht-inokulierten Proben sowohl für das kulturelle Verfahren nach KNÖDL (2008) als auch für die Real-Time PCR und die Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens. Folgende Formeln wurden zur Berechnung herangezogen:

$$\text{Sensitivität (\%)} = \frac{\text{Anzahl positiver Ansätze des zu prüfenden Nachweises}}{\text{Anzahl inokulierter Proben}} \times 100$$

Die **Sensitivität** (Kapitel 3) gibt an, wie viel % aller sicher positiven Proben als positiv erkannt werden. Sie bezieht sich auf die Gesamtanzahl der inokulierten Proben. Bei dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008) und der Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens konnten die Zielkeime aus elf der 16 inokulierten Proben isoliert werden. Dies entsprach einer Sensitivität von 69%. Die Real-Time PCR des eigenen Verfahrens hingegen detektierte in allen 16 inokulierten Proben die pathogene *Y. enterocolitica* und ergab somit eine Sensitivität von 100%.

Die **Spezifität** (Kapitel 3) gibt an, wie viel % aller sicher negativen Proben als negativ erkannt werden. Sie bezieht sich demzufolge auf die Gesamtanzahl der nicht-inokulierten Proben:

$$\text{Spezifität (\%)} = \frac{\text{Anzahl negativer Ansätze des zu prüfenden Nachweises}}{\text{Anzahl nicht-inokulierter Proben}} \times 100$$

Mit keiner der drei Methoden gelang der Nachweis der Zielkeime in den vier nicht inokulierten Proben, was somit einer Spezifität von 100% für alle drei Methoden entsprach.

Die **Falsch-Negativ-Rate** (Kapitel 3) gibt an, wie viel % aller sicher positiven Proben als falsch-negative Befunde gewertet wurden:

$$\text{Falsch-Negativ-Rate (\%)} = \frac{\text{Anzahl negativer Ansätze des zu prüfenden Nachweises}}{\text{Anzahl inokulierter Proben}} \times 100$$

Das kulturelle Verfahren nach KNÖDL (2008) und die Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens konnten aus fünf der 16 inokulierten Proben die Zielkeime nicht isolieren und ergaben somit eine Falsch-Negativ-Rate von 31%. Die Real-Time PCR hingegen detektierte die Zielkeime in allen 16 inokulierten Proben. Somit konnte für die Real-Time PCR eine Falsch-Negativ-Rate von 0% ermittelt werden.

Dagegen gibt die **Falsch-Positiv-Rate** (Kapitel 3) an, wie viel % aller sicher negativen Proben als falsch-positive Befunde gewertet wurden:

$$\text{Falsch-Positiv-Rate (\%)} = \frac{\text{Anzahl positiver Ansätze des zu prüfenden Nachweises}}{\text{Anzahl nicht-inokulierter Proben}} \times 100$$

Mit keiner der drei Methoden konnten in den vier nicht-inokulierten Proben pathogene *Y. enterocolitica* detektiert werden, was somit einer Falsch-Positiv-Rate von 0% für alle drei Methoden entsprach.

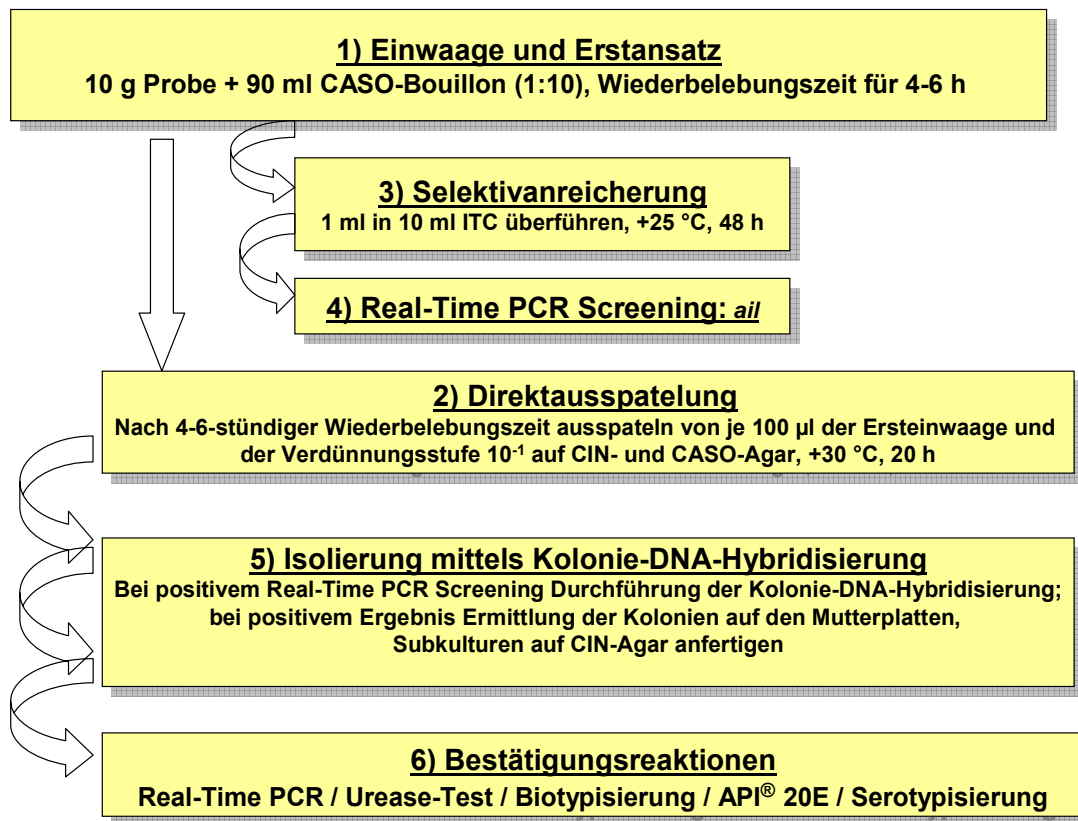
Tabelle 51 zeigt die Ergebnisse der Berechnung der Sensitivität, Spezifität, Falsch-Negativ-Rate und Falsch-Positiv-Rate bezogen auf die inokulierten bzw. nicht-inokulierten Proben für alle drei untersuchten Methoden im Überblick an.

Tabelle 51: Ergebnisse der Berechnung der Sensitivität, Spezifität, Falsch-Negativ-Rate und Falsch-Positiv-Rate bezogen auf die inokulierten bzw. nicht-inokulierten Proben

Methoden	Sensitivität	Spezifität	Falsch-Negativ-Rate	Falsch-Positiv-Rate
KNÖDL (2008)	69%	100%	31%	0%
Eigene Kolonie-DNA-Hybridisierung	69%	100%	31%	0%
Eigene Real-Time PCR	100%	100%	0%	0%

10 Vierter Teil: Verfahrensdigramm

Nach Berücksichtigung der Ergebnisse der Vorversuche und der In house-Validierung konnte folgendes Verfahrensdigramm zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* aus Schweinefleisch mittels Real-Time PCR und Kolonie-DNA-Hybridisierung festgelegt werden (Abbildung 13):



CASO = Caseinpepton-Sojamehlpepton, CIN = Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
ITC = Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat

Abbildung 13: Verfahrensdigramm

1) Einwaage und Erstsatz (Tag 1)

In einen Stomacherbeutel mit Filtereinsatz werden 10 g der Probe mit 90 ml CASO-Bouillon vermischt und für 2 min homogenisiert. Zur Wiederbelebung geschädigter Zellen erfolgt eine 4-6-stündige Wiederbeleungszeit dieses Erstsatzes bei Raumtemperatur.

2) Direktausspatellung (Tag 1)

Im Anschluss an die Wiederbelebung (nach 4-6 h) werden 100 µl des Erstsatzes auf je einen CIN- sowie CASO-Agar gegeben und ausgespatelt. Mit Hilfe einer dezimalen

Verdünnungsreihe erfolgt das Pipettieren der Verdünnungsstufe 10^{-1} mit Verdünnungsflüssigkeit. Hiervon werden ebenfalls 100 μ l auf je einen CIN- sowie CASO-Agar ausgespatelt. Die Bebrütung der Nährböden erfolgt für 20 h \pm 2 h bei +30 °C. Von jeder Probe werden somit vier Platten ausgespatelt. Nach der Bebrütung erfolgt die Lagerung der Nährböden bei +4 °C, um im Falle eines positiven Real-Time PCR Screenings die Kolonie-DNA-Hybridisierung durchzuführen.

3) Selektivanreicherung (Tag 1)

Ebenfalls im Anschluss an die Wiederbelebung (nach 4-6 h) werden zu 10 ml ITC-Bouillon jeweils 10 μ l der Supplemente Irgasan (0,1%) und Ticarcillin (0,1%) zugegeben. Die ITC-Bouillon wird im Anschluss mit 1 ml des Erstansatzes beimpft und bei +25 °C für 48 h \pm 2 h bebrütet.

4) Real-Time PCR Screening (Tag 3)

Alle Proben werden einem Real-Time PCR Screening auf das chromosomal kodierte *ail*-Gen unterzogen. Im Falle eines positiven Ergebnisses schließt sich zur Isolierung der pathogenen *Y. enterocolitica* die Kolonie-DNA-Hybridisierung an. Bei einem negativen Ergebnis des Screenings würde die Untersuchung an dieser Stelle abgebrochen und das Ergebnis würde wie folgt angegeben werden: „pathogene *Y. enterocolitica* nicht nachweisbar“.

a) Nukleinsäureextraktion aus der Selektivanreicherung:

Aus der Selektivanreicherung wird 1 ml in ein 2 ml Safe Lock Tube (EPPENDORF) überführt. Die Durchführung der DNA-Extraktion erfolgt mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN) automatisiert in dem QIAcube-Aufreinigungsautomat (QIAGEN) gemäß Kapitel 6.3.1. Der hieraus entstehende Überstand wird als Template in die Real-Time PCR eingesetzt.

b) Nukleinsäureextraktion aus dem Referenzstamm:

Die erforderliche Zielsequenz der in jedem PCR-Lauf mitgeführten Positiven PCR-Kontrolle wird durch Nukleinsäureextraktion aus dem Referenzstamm DSM 11502 hergestellt. Eine mittlere Menge des auf Columbia-Blutagar gewachsenen Referenzstammens wird in 10 ml CASO-Bouillon (= Ausgangsbouillon) angezchtet und über Nacht bei +30 °C bebrütet. Nach der Bebrütung kann das Vorliegen von circa 10^9 oder 10^8 KbE/ml des Keimes in der Ausgangsbouillon angenommen werden. Zur Bestimmung der Keimzahl wird eine dezimale Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe 10^{-7} hergestellt. Von den Verdünnungsstufen 10^{-6} und 10^{-7} werden jeweils zweimal 100 μ l auf CIN-Agar ausgespatelt, die Bebrütung erfolgt für 20 h (\pm 2 h) bei +30 °C. Am folgenden Tag erfolgt die Auszählung der Platten und Berechnung der Zahl der koloniebildenden Einheiten pro ml gemäß Formel 4. Von den Verdünnungsstufen 10^0 und 10^{-1} erfolgt die Entnahme von jeweils 1 ml in ein 2 ml Safe Lock Tube von EPPENDORF. Die Nukleinsäureextraktion erfolgt ebenfalls mit dem DNeasy®

Blood & Tissue Kit (QIAGEN) unter Einsatz des QIAcube-Aufreinigungsautomates (QIAGEN) (Kapitel 6.3.1). Die in der Ausgangsbouillon ermittelte Keimzahl von 10^9 oder 10^8 kbE/ml kommt als Positivkontrolle in der Real-Time PCR zum Einsatz. Diese wird bei -20 °C mit einem Hinweis auf das Herstellungsdatum gelagert und kann ungefähr zwei Jahre lang für mehrere PCR-Läufe als Positivkontrolle eingesetzt werden.

c) Amplifikation:

Das Pipettieren der Reaktionsansätze für die Real-Time PCR erfolgt unter der Reinraumbank gemäß Tabelle 31. Die Amplifikatgröße des gebildeten PCR-Produktes aus dem *ail*-Gen beträgt 90 bp. Um mögliche Kontaminationen zu erkennen, sind neben der IAC bei jedem PCR-Lauf eine Positive PCR-Kontrolle und eine Negative PCR-Kontrolle (NTC) mitzuführen. Für die Positive PCR-Kontrolle werden anstelle der Probe 2,5 μl der Positivkontrolle zu dem Reaktionsansatz hinzu pipettiert. Die Negative PCR-Kontrolle enthält außer der Probe alle Reagenzien des Reaktionsansatzes, wofür die Wassermenge auf 3,5 μl erhöht wird. Die Amplifikation wird gemäß dem in Tabelle 32 angegebenen Temperatur-Zeit-Profil durchgeführt.

d) Auswertung der Real-Time PCR:

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe eines PC-Programmes anhand des Kurvenverlaufes, der ermittelten C_t -Werte und anhand der Stärke des Fluoreszenzsignals der Reporter-Farbstoffe FAM und JOE. Das Ergebnis der Real-Time PCR auf das *ail*-Gen ist:

Positiv: wenn ein deutliches Fluoreszenz-Signal des Reporter-Farbstoffes FAM vor dem C_t -Wert 39 detektiert wird und die mitgeführten Kontrollen (IAC, Positiv-Kontrolle und Reagenzien-Kontrolle) die erwarteten Ergebnisse liefern.

Negativ: wenn das Fluoreszenz-Signal des Reporter-Farbstoffes FAM sehr schwach ist und/oder der C_t -Wert > 39 liegt und sämtliche Kontrollen die erwarteten Ergebnisse liefern.

Fraglich: wenn die mitgeführten Kontrollen nicht die erwarteten Ergebnisse liefern. Vor allem die IAC kann infolge von Inhibitionseffekten ein negatives Fluoreszenz-Signal des Reporter-Farbstoffes JOE bei gleichzeitig negativem Fluoreszenz-Signal des Reporter-Farbstoffes FAM der Probe liefern. Die Probe muss dann wiederholt werden.

5) Isolierung der pathogenen *Y. enterocolitica* mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung (Tag 3 und 4)

Die Durchführung der Kolonie-DNA-Hybridisierung erfolgt in Anlehnung an den „Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik“ (L 07.18-1) aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (N.N. 2002).

Die Durchführung der Kolonie-DNA-Hybridisierung erfolgt bei einem positiven Real-Time PCR Screening aus den Nährböden der Direktausspatelung. Alle hierfür notwendigen Inkubationen werden gemäß den Herstellerangaben von ROCHE (2000, 2003, 2004) mit kleinen Modifikationen durchgeführt. Die Kolonie-DNA-Hybridisierung gliedert sich in folgende Schritte:

- Vorbereitung
- Lyse der Bakterien
- Fixierung der DNA
- Entfernung der Zellrückstände
- Vorhybridisierung
- Hybridisierung
- Waschschritte
- Immunologische Detektion
- Dokumentation und Isolierung

Vorbereitung:

Die zur Hybridisierung vorgesehenen bebrüteten Mutterplatten (CIN- und CASO-Agar) werden zunächst aus dem Kühlschrank geholt. Die Nylonmembranen (ROCHE) werden zur späteren Zuordnung der Mutterplatten mit Bleistift, gemäß Probennummer, beschriftet und an drei unterschiedlichen Randstellen markiert. Alle Arbeitsschritte müssen mit Handschuhen ausgeführt werden, um eine Kontamination mit Fremd-DNA zu vermeiden. Die Nylonmembranen werden blasenfrei mit der Beschriftung vom Agar weg auf die Mutterplatten aufgelegt. Während des Vollaugens der Nylonmembran erfolgt die Beschriftung der Mutterplatten gemäß den Markierungen auf den Nylonmembranen. Die Nylonmembranen werden mit der Kolonieseite nach oben auf ein Filterpapier gelegt, um die Markierung (x) für die Positivkontrolle aufzubringen. Mit einer sterilen Öse erfolgt die Entnahme mehrerer Kolonien des DSM Stammes 11502, welche an die zuvor gesetzte Markierung (x) für die Positivkontrolle aufgetragen werden. Die Mutterplatten werden anschließend erneut bei +30 °C über Nacht bebrütet.

Lyse der Bakterien:

Sterile Plastikpetrischalen (SARSTEDT) werden mit Filterpapier ausgelegt und mit der Denaturierungslösung getränkt. Die Nylonmembranen werden mit der Kolonieseite nach oben für 15 min auf das Filterpapier gelegt. Im Anschluss müssen sie auf frischem Filterpapier luftgetrocknet werden. Es folgt die Inkubation der Nylonmembranen auf mit Neutralisierungslösung getränktem Filterpapier für 15 min. Nach einer erneuten Trocknungsphase auf frischem Filterpapier werden die Nylonmembranen auf mit 2x SSC

getränktem Filterpapier für weitere 10 min inkubiert. Anschließend müssen sie erneut auf Filterpapier getrocknet werden.

Fixierung der DNA:

Zur Fixierung der DNA auf den Nylonmembranen werden diese einzeln in Glaspetrischalen für 1 h bei +80 °C im Hybridisierungssofen gebacken.

Entfernung der Zellrückstände:

Die Nylonmembranen werden auf mit Aqua dest. befeuchtetem Filterpapier ausgelegt. Das Entfernen der Zellrückstände erfolgt, indem die Nylonmembran einzeln mit Aqua dest. getränkten Wattestäbchen abgefahren werden.

Vorhybridisierung:

Bis zu drei Nylonmembranen können mit der Kolonieseite nach innen in eine Hybridisierungsflasche (VWR) gegeben werden. Die Flaschen werden mit 20 ml DIG Easy Hyb (ROCHE) je Nylonmembran gefüllt, und bei +42 °C für 1 h im Hybridisierungssofen vorhybridisiert. Durch die Vorhybridisierung kommt es zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen. Die Berechnung der geeigneten Hybridisierungstemperatur der Hybridisierungssonde erfolgt gemäß der Gebrauchsanleitung (ROCHE 2000, 2003, 2004) mittels folgender Formel:

Formel 5: Berechnung der Schmelztemperatur der Hybridisierungssonde

$$T_m = 49,82 + 0,41 (\% \text{ G+C}) - (600/l)$$

$$\% \text{ G+C} = \text{G/C Gehalt der } ail\text{-Sonde}$$

$$l = \text{Länge der } ail\text{-Sonde in Basenpaaren}$$

Die optimale Hybridisierungstemperatur ($T_{opt.}$) liegt 20 °C bis 25 °C unter der errechneten Schmelztemperatur (T_m). Die verwendete *ail*-Hybridisierungssonde ist 454 bp lang und besitzt einen G/C Gehalt von 182, was 40% entspricht. Somit errechnet sich die optimale Hybridisierungstemperatur ($T_{opt.}$) mittels oben genannter Formel:

$$T_m = 49,82 \text{ °C} + 0,41 (40 \%) - (600/454 \text{ bp}) = 65 \text{ °C (gerundet)}$$

$$T_{opt.} = 65 \text{ °C} - (20 \text{ °C bis } 25 \text{ °C}) = 45 \text{ °C bis } 40 \text{ °C}$$

Hybridisierung:

Die mit DIG Easy Hyb verdünnte Hybridisierungssonde (mindestens 100 ng/ml), welche bei -20 °C gelagert wird, wird in einem Wasserbad bei +65 °C für 5 min erhitzt. Nach dem Verwerfen der Vorhybridisierungslösung müssen pro Nylonmembran sofort 6 ml des Sonden/DIG Easy Hyb-Gemisches in die Hybridisierungsflaschen gegeben und über Nacht bei +42 °C im Hybridisierungssofen hybridisiert werden.

Waschschritte:

Nach der Hybridisierung erfolgt das Zurückkippen des Sonden/DIG Easy Hyb-Gemisches. Das Gemisch ist bei -20 °C für 12 Monate haltbar, so dass es mehrmals verwendet werden kann. Die Nylonmembranen werden aus den Hybridisierungsflaschen entnommen und zweimal für 5 min bei Raumtemperatur in einer Plastikschaale auf dem Schüttler in der Waschlösung 1 (2x SSC/0,1% SDS = low stringency buffer) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proben zu entfernen. Um Basenpaarungen, die weniger als 95% Homologie zwischen Hybridisierungssonde und DNA aufweisen zu verhindern, erfolgt ein weiterer zweimaliger Waschschritt in der Waschlösung 2 (0,5x SSC/0,1% SDS = high stringency buffer) für 15 min bei +68 °C auf dem Schüttler. Hierfür wird die Waschlösung 2 in einer Plastikschaale bei +68 °C im Hybridisierungssofen vorgewärmt.

Immunologische Detektion:

Die Durchführung aller notwendigen Inkubationen (außer der Farbreaktion) erfolgt bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln in einer Plastikschaale. Nach der Hybridisierung und den anschließenden Waschschritten werden die Nylonmembranen für 1-5 min in 1x Waschpuffer (DIG Wash and Block Buffer Set, ROCHE) gewaschen, um die unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Der 10x Waschpuffer muss dafür mit Aqua dest. 1:10 verdünnt werden. Es folgt die Inkubation der Nylonmembranen für 30 min in 40 ml 1x Blockierungslösung (DIG Wash and Block Buffer Set, ROCHE) pro Membran, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die 1x Blockierungslösung muss hierfür 1:10 mit 1x Maleinsäurepuffer (DIG Wash and Block Buffer Set, ROCHE) verdünnt werden. Anschließend wird die Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, ROCHE) für 5 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Die Verdünnung des Überstandes mit Blockierungslösung erfolgt im Verhältnis von 1:5000. Pro Nylonmembran müssen 20 ml Blockierungslösung mit 4 µl Antikörperüberstand eingesetzt und für 30 min inkubiert werden. Der Antikörper bindet an die mit Digoxigenin markierte Hybridisierungssonde. Er trägt als Enzym die alkalische Phosphatase, welche bei der späteren Färbung das Farbreaenz spaltet. Danach erfolgt ein erneutes zweimaliges Waschen der Membranen für 15 min in 1x Waschpuffer (40 ml pro Membran). Anschließend werden die Membranen für 2-5 min in 1x Detektionspuffer (DIG Wash and Block Buffer Set, ROCHE) äquilibriert (20 ml pro Membran), um den pH-Wert auf 9,5 einzustellen. Um die Antikörperbindung sichtbar zu machen, erfolgt als letzter Schritt der Detektion die Färbung der Membranen mit NBT/BCIP Stock Solution (ROCHE). Hierfür werden pro Membran 80 µl der NBT/BCIP Stock Solution mit 4 ml Detektionspuffer verdünnt. Die Inkubation der Membranen erfolgt einzeln in Petrischalen im Dunkeln ohne Schütteln für 1-16 h. Dabei spaltet das Enzym des Antikörpers das BCIP-Farbreaenz (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) ab, was zu einem blauen Farbniederschlag führt. Das NBT (4-Nitro-

blue-tetrazolium-chloride) verstärkt diese Reaktion zusätzlich. Sobald die Farbreaktion deutlich erkennbar ist, wird die Reaktion mit Aqua dest. beendet.

Dokumentation und Isolierung:

Die Membranen werden fotografiert und aufbewahrt. Bei positiven Nylonmembranen sind die entsprechenden Mutterplatten aus dem Kühlschrank zu entnehmen. Das Auflegen der Membranen auf die Mutterplatten erfolgt gemäß den Markierungen, so dass die positiven Kolonien mit einer sterilen Öse entnommen werden können. Diese werden auf CIN-Agar ausgestrichen und für 20 ± 2 h bei $+30$ °C bebrütet. Am folgenden Tag müssen die beimpften Nährböden auf Reinheit und Kolonienmorphologie überprüft werden. Nach 20 h Bebrütung (± 2 h) bei $+30$ °C bildet *Y. enterocolitica* auf CIN-Agar Kolonien mit himbeerrotem Zentrum, die eine klare Randzone (sog. „Kuh-Augen“) aufweisen. Der Durchmesser dieser Kolonien liegt bei < 1 mm. Falls Mischkulturen vorliegen, müssen zunächst Reinigungsausstriche auf CIN-Agar angefertigt werden. Sobald die Kolonien rein auf CIN-Agar vorliegen, werden diese für die weiteren Bestätigungsreaktionen auf Columbia-Blutagar ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgt für 20 ± 2 h bei $+30$ °C.

6) Bestätigungsreaktionen (Tag 5 und 6)

a) Real-Time PCR:

Alle mit Hilfe der Kolonie-DNA-Hybridisierung ermittelten Kolonien, die nach Ausstrich auf CIN-Agar als typisch befunden werden, werden zur Bestätigung in die Real-Time PCR eingesetzt. Die Real-Time PCR dient der Pathogenitätsprüfung der isolierten Kolonien, indem das nur bei pathogenen *Y. enterocolitica* vorhandene Zielgen *ail* nachgewiesen wird. Von jeder isolierter Kolonie erfolgt die Entnahme von circa fünf Einzelkolonien mit Hilfe einer Impföse von dem Columbia-Blutagar. Diese werden zur Lyse der Bakterienzellen in $100 \mu\text{l}$ nukleasefreiem Wasser in einem 2 ml Safe Lock Tube (EPPENDORF) gelöst und für 10 min bei $+99$ °C erhitzt. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 rpm für 3 min kann der so gewonnene Überstand in ein neues 2 ml Safe Lock Tube überführt werden. Das Template wird gemäß Tabelle 31 und Tabelle 32 in die Real-Time PCR eingesetzt. Aufgrund des Auftretens hitzestabiler DNAsen bei pathogenen *Y. enterocolitica* muss darauf geachtet werden, dass diese Schritte in unmittelbarem zeitlichem Zusammenhang erfolgen. Die Auswertung erfolgt anhand des Kurvenverlaufes, der ermittelten C_t -Werte und anhand der Stärke des Fluoreszsignals von FAM und JOE.

b) Urease-Test:

Hierfür werden nur Kolonien eingesetzt, die im Rahmen der Pathogenitätsprüfung mittels Real-Time PCR als pathogene *Y. enterocolitica* identifiziert werden konnten. Dazu erfolgt die Entnahme von einigen Kolonien des Columbia-Blutagars, welche auf die Oberfläche des Harnstoffagars nach Christensen (HEIPHA) ausgestrichen werden. Die Bebrütung findet für

22 h \pm 2 h bei +30 °C statt. *Y. enterocolitica* zeigt eine positive Urease-Reaktion durch einen Farbumschlag des Indikators nach rosa innerhalb von 24 h. Der Farbumschlag resultiert aus der Alkalisierung des Agars durch Spaltung des vorhandenen Harnstoffs durch das Enzym Urease. Allerdings können neben *Yersinia spp.* auch andere Keime, wie z.B. *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.* oder *Serratia spp.*, eine Urease-Aktivität besitzen. Da die Reaktion bei diesen Keimen jedoch verzögert ausfällt, tritt die deutliche rosa Verfärbung des Agars erst bei einer Bebrütungsdauer von mehr als 24 h auf. Daher muss bei der Auswertung des Agars darauf geachtet werden, dass diese innerhalb von 24 h erfolgt.

c) Biotypisierung: (Tabelle 52)

Zur biochemischen Bestätigung werden nur Kolonien mit einer positiven Urease-Reaktion eingesetzt.

- Tween-Esterase-Test

Circa fünf Einzelkolonien werden in einer geraden Linie auf den Tween-Esterase-Agar ausgestrichen. Eine positive Reaktion wird durch einen milchig trüben Hof um den Impfstrich angezeigt. Die Bebrütung erfolgt bei +30 °C für 24-48 h.

- Äsculinvergärung

Circa fünf Einzelkolonien werden in Form eines Ein-Ösen-Ausstriches auf den Äsculin-Agar aufgetragen. Eine positive Reaktion wird durch eine gelbe Verfärbung des Agars in der Umgebung des Impfstriches angezeigt. Die Bebrütung erfolgt bei +30 °C für 24-48 h.

- Fermentation von Xylose, Trehalose und Salicin

Die Beurteilung der Kohlenhydratfermentation erfolgt durch Beimpfen der Lösungen mit circa fünf Einzelkolonien. Ein Farbumschlag des Mediums von rot nach gelb zeigt eine positive Reaktion an. Die Bebrütung erfolgt bei +30 °C für 24-48 h.

- Pyrazinamidase nachweis

Circa fünf Einzelkolonien werden im unteren Bereich der Schrägfläche des Pyrazinamidase-Agars aufgetragen. Die Bebrütung erfolgt bei +30 °C für 24-48 h. Nach Beendigung der Bebrütung erfolgt die Zugabe von 1 ml Ammoniumferrosulfat-Lösung. Eine rotbraune Verfärbung der Lösung innerhalb von 10 min zeigt eine positive Reaktion an.

Tabelle 52: Biotypisierung von *Y. enterocolitica*

Reaktion	Biotyp					
	1A ^b	1B	2	3	4	5
Tween-Esterase	+	+	-	-	-	-
Äsculin	+	-	-	-	-	-
Pyrazinamidase	+	-	-	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	-	v
Trehalose	+	+	+	+	+	-
Salicin	+	-	-	-	-	-
Indol^a	+	+	(+)	-	-	-

^a = Überprüfung erfolgt im Rahmen der biochemischen Identifizierung mittels API[®] 20E

^b = apathogen

v = variable Reaktion

(+) = schwach positive Reaktion

+ = positive Reaktion

- = negative Reaktion

d) Biochemische Identifizierung mittels API[®] 20E:

Zur weiteren Identifizierung kommt das standardisierte Testsystem API[®] 20E der Firma BIOMÉRIEUX zum Einsatz. Dazu werden fünf Einzelkolonien in 5 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Anschließend werden die 20 Mikroröhrchen des Teststreifens entsprechend der Herstelleranleitung mit der Bakteriensuspension befüllt. Ein Teil der Mikroröhrchen muss zur anaeroben Bebrütung zusätzlich mit Paraffinöl überschichtet werden. Die Auswertung erfolgt nach einer Bebrütungszeit von 20-24 h bei +30 °C und der Zugabe bestimmter Reagenzien zu einigen Mikroröhrchen anhand der Ablesetabelle. Die resultierende siebenstellige Nummer wird zur Identifizierung in die Identifizierungssoftware eingegeben.

e) Serotypisierung:

Zur Bestimmung der Serotypen der isolierten Kolonien aus der Kolonie-DNA-Hybridisierung muss eine Objektträgeragglutination durchgeführt werden. Dafür wird das monospezifische Testserum Anti-*Y. enterocolitica* O:3 von SIFIN eingesetzt. Ein Tropfen des Testserums und ein Tropfen physiologischer Kochsalzlösung werden auf einen Objektträger gegeben. Je eine Einzelkolonie des Columbia-Blutagars wird in die Tropfen eingerieben. Die Auswertung erfolgt durch Schwenkung des Objektträgers. Eine positive Reaktion ist durch eine grob- oder feinflockige Agglutination nach mehreren Schwenkungen ablesbar. Die physiologische Kochsalzlösung dient als Negativkontrolle, um Spontanagglutinationen auszuschließen. Bei einem negativen Ergebnis mit dem Testserum Anti-*Y. enterocolitica* O:3 werden weitere monospezifische Testseren (Anti-*Y. enterocolitica* O:5, O:8, O:9 und O:27, SIFIN) eingesetzt.

f) Auswertung:

Als pathogene *Y. enterocolitica* gelten alle mit Hilfe der Kolonie-DNA-Hybridisierung isolierten Kolonien, welche die oben genannten Bestätigungsreaktionen erfüllen und somit einem der Biotypen 1B, 2, 3, 4 oder 5 gemäß Tabelle 52 zuzuordnen sind. Das Ergebnis wird wie folgt angegeben: „pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen“.

11 Fünfter Teil: Ergebnisse der Untersuchung der Schweinefleischproben

11.1 Ergebnisse des Real-Time PCR Screenings

Bei allen untersuchten rohen Schweinefleischproben wurde das Real-Time PCR Screening auf das chromosomale *ail*-Gen aus der selektiven ITC-Bouillon nach einer 48-stündigen Anreicherung bei +25 °C durchgeführt. Dabei verlief der molekularbiologische Nachweis des Gens bei 17 der insgesamt 100 untersuchten Proben positiv (17%). Die pathogenen Zielkeime konnten in fünf der 35 Proben Hackfleisch, in elf der 25 Proben Zungen sowie in einer der acht Proben Innereien ermittelt werden. Somit belief sich der Anteil der positiven Hackfleischproben, Zungenproben und Innereienproben auf 14%, 44% sowie 12,5%. Innerhalb der Warengruppe Fleisch war der Nachweis des *ail*-Gens nicht möglich (Tabelle 53).

Tabelle 53: Übersicht der Ergebnisse des Real-Time PCR Screenings

Produkt	Anzahl untersuchter Proben	Real-Time PCR positive Proben	Anteil in Prozent
Hackfleisch	35	5	14%
Fleisch	32	0	0%
Zungen	25	11	44%
Innereien	8	1	12,5%
Gesamt	100	17	17%

Im Anhang befindet sich eine tabellarische Übersicht aller untersuchten Proben (Tabelle 57).

11.2 Ergebnisse des kulturellen Nachweises mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung

Alle 17 Proben, welche mittels Real-Time PCR Screening ein positives Ergebnis erzielten, wurden kulturell mit Hilfe der Kolonie-DNA-Hybridisierung untersucht. Aus sechs der 17 untersuchten Proben (35%) konnten pathogene *Y. enterocolitica* durch den Nachweis des *ail*-Gens isoliert und bestätigt werden. Die isolierten Stämme der sechs Proben konnten alle dem pathogenen Bioserotyp 4/O:3 zugeordnet werden (Tabelle 57). Der Nachweis des *ail*-Gens sowie die Zuordnung zum Bioserotyp 4/O:3 wurden im Anschluss durch das BfR bestätigt. Die sechs Proben gliederten sich in eine Probe Hackfleisch, vier Proben Zungen und eine Probe Innerei (Niere). Somit belief sich der Anteil der positiven Hackfleisch-, Zungen- und Innereienproben bezogen auf die hybridisierten Proben auf 20%, 36% sowie

100%. Innerhalb der Warengruppe Fleisch gelang die Isolierung der pathogenen Keime allerdings nicht (Tabelle 54).

Tabelle 54: Übersicht der Ergebnisse des kulturellen Nachweises

Produkt	Anzahl untersuchter Proben	Kulturell positive Proben mit Kolonie-DNA-Hybridisierung	Anteil in Prozent bezogen auf die hybridisierten Proben
Hackfleisch	5	1	20%
Fleisch	0	0	0%
Zungen	11	4	36%
Innereien	1	1	100%
Gesamt	17	6	35%

Bezogen auf die Gesamtanzahl der untersuchten Proben konnten aus insgesamt 6% der Proben pathogene *Y. enterocolitica* isoliert werden. Nach Auftrennung in Warengruppen konnten die Zielkeime aus 3% der untersuchten Hackfleischproben, aus 16% der untersuchten Zungen sowie aus 12,5% der untersuchten Innereien isoliert werden. Innerhalb der Warengruppe Fleisch war die kulturelle Isolierung der pathogenen Keime nicht möglich (Tabelle 55).

Tabelle 55: Übersicht der isolierten Proben in Bezug zur Gesamtprobenzahl

Produkt	Anzahl untersuchter Proben	Kulturell positive Proben mit Kolonie-DNA-Hybridisierung	Anteil in Prozent bezogen auf die Gesamtzahl der Proben
Hackfleisch	35	1	3%
Fleisch	32	0	0%
Zungen	25	4	16%
Innereien	8	1	12,5%
Gesamt	100	6	6%

Beim Vergleich der zur Hybridisierung eingesetzten Nährböden konnte auf dem **CASO-Agar** generell vermehrtes Koloniewachstum beobachtet werden. Bei dem unverdünnten CASO-Agar aller 17 Real-Time PCR positiven Proben wurden circa > 300 Kolonien ermittelt, während bei der Verdünnungsstufe von 10^{-1} in der Regel circa 50-100 Kolonien gezählt wurden. Zur Hybridisierung konnte daher nur die Verdünnungsstufe 10^{-1} des CASO-Agars eingesetzt werden. Bei zwei Proben allerdings war es nicht möglich den CASO-Agar zur Hybridisierung einzusetzen, da die Auszählung der Kolonien auch bei der Verdünnungsstufe von 10^{-1} circa > 300 Kolonien ergab (Tabelle 56).

Beim selektiven **CIN-Agar** hingegen konnte der unverdünnte CIN-Agar bei allen 17 Real-Time PCR positiven Proben zur Hybridisierung eingesetzt werden. Bedingt durch die

Hemmung der Begleitflora ergab die Auszählung der unverdünnten CIN-Platten circa < 100 Kolonien. Bei der Verdünnungsstufe von 10⁻¹ des CIN-Agars wurden in der Regel circa 1-20 Kolonien ermittelt. Aufgrund eines zu geringen Koloniewachstums wurde allerdings bei einigen Proben auf die Hybridisierung dieser Verdünnungsstufe verzichtet (Tabelle 56).

Bei der vergleichenden Darstellung der eingesetzten Nährböden hinsichtlich einer erfolgreichen Hybridisierung schnitt der CIN-Agar im Vergleich zum CASO-Agar deutlich besser ab. Mit Hilfe des CASO-Agars konnten aus drei der 17 Real-Time PCR positiven Proben die Keime isoliert werden, während der CIN-Agar eine erfolgreiche Isolierung aus sechs Proben ermöglichte (Tabelle 56).

Tabelle 56: Übersicht über die zur Hybridisierung eingesetzten Nährböden

Proben Nr.	Produkt	Zur Hybridisierung eingesetzte Nährböden				Positive Kolonie-DNA-Hybridisierung mit erfolgreicher Isolierung			
		CIN 10 ⁰	CIN 10 ⁻¹	CASO 10 ⁰	CASO 10 ⁻¹	CIN 10 ⁰	CIN 10 ⁻¹	CASO 10 ⁰	CASO 10 ⁻¹
57	Zunge	x			x	x			
62	Zunge	x	x		x	x	x		x
65	Zunge	x			x	x			
67	Zunge	x	x		x	x			x
96	Hackfleisch	x	x			x	x		
107	Niere	x	x		x	x	x		x
1	Hackfleisch	x			x				
8	Hackfleisch	x	x		x				
45	Zunge	x			x				
46	Zunge	x			x				
48	Zunge	x			x				
55	Zunge	x			x				
56	Zunge	x			x				
58	Zunge	x			x				
68	Zunge	x			x				
84	Hackfleisch	x			x				
97	Hackfleisch	x	x						

Negative Kolonie-DNA-Hybridisierung und Isolierung

Abbildung 14 zeigt beispielhaft für alle isolierten Proben die hybridisierte Nylonmembran einer positiven Zunge, aus der die kulturelle Isolierung der pathogenen *Y. enterocolitica* positiv verlief. Neben der aufgetragenen Positivkontrolle sind zahlreiche weitere Hybridisierungssignale erkennbar.

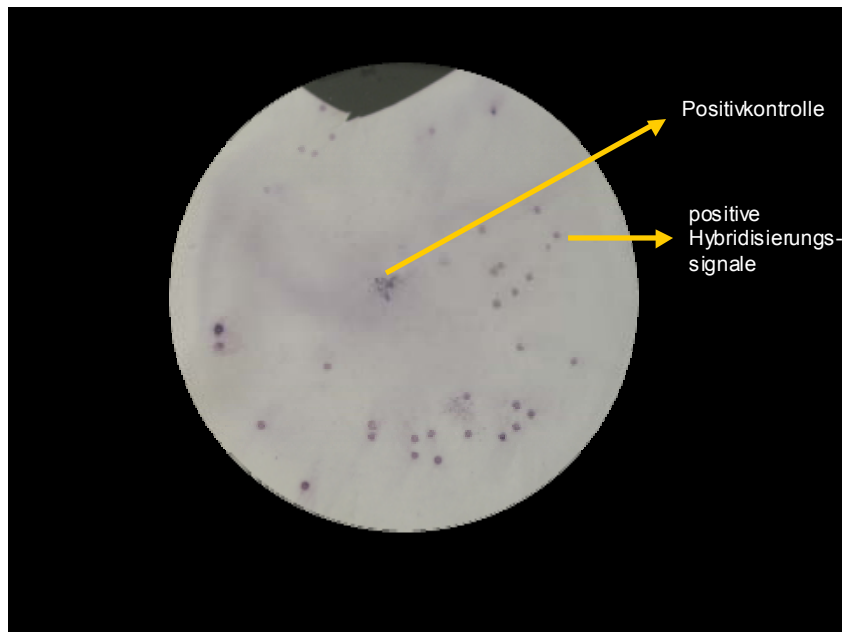


Abbildung 14: Nylonmembran einer positiven Zunge

11.3 Ergebnisse des Real-Time PCR Screenings und des kulturellen Nachweises im Vergleich

Sowohl das Real-Time PCR Screening wie auch die Kolonie-DNA-Hybridisierung als kulturelles Verfahren detektieren mit Hilfe des *ail*-Gens ausschließlich pathogene *Y. enterocolitica* Stämme. Von den insgesamt 100 untersuchten rohen Schweinefleischproben konnte das *ail*-Gen mittels Real-Time PCR in 17 Proben (17%) detektiert werden. Mit Hilfe der Kolonie-DNA-Hybridisierung gelang es aus sechs Proben (6%) die Keime kulturell zu isolieren und im Anschluss als pathogene *Y. enterocolitica* zu bestätigen (Abbildung 15). Bei den restlichen elf Real-Time PCR positiven Proben war der kulturelle Nachweis der pathogenen Keime allerdings nicht möglich. Besonders innerhalb der Warengruppen Hackfleisch und Zungen gelang die kulturelle Isolierung mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung nur selten im Vergleich zur Detektion mit Hilfe der Real-Time PCR. Innerhalb der Warengruppe Innerereien ergaben beide Methoden ein identisches Ergebnis (12,5%), während innerhalb der Warengruppe Fleisch bei beiden Methoden der Nachweis der pathogenen Zielkeime nicht gelang (Abbildung 15).

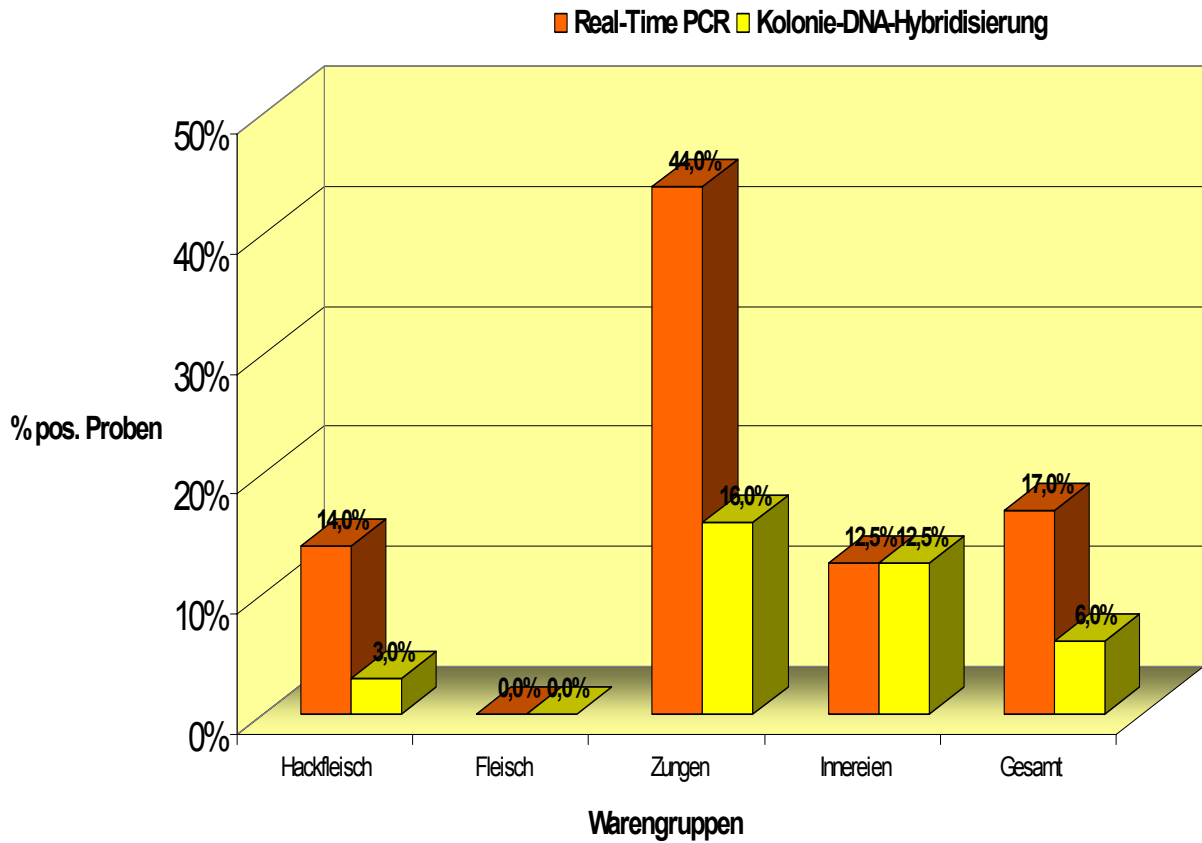


Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der positiven Proben mittels Real-Time PCR und Kolonie-DNA-Hybridisierung in Bezug auf die Gesamtanzahl der untersuchten Proben

Im Umkehrschluss konnten allerdings alle mit Hilfe der Kolonie-DNA-Hybridisierung kulturell isolierten Proben auch mittels des Real-Time PCR Screenings detektiert werden (Tabelle 57).

DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, ein kombiniertes Verfahren aus Real-Time PCR und Kolonie-DNA-Hybridisierung für den Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* in Schweinefleisch zu entwickeln. Die Real-Time PCR sollte dabei als Screening-Methode eingesetzt werden, um den ökonomischen Einsatz von Zeit- und Personalressourcen zu gewährleisten. Um eine Inhibition der Real-Time PCR frühzeitig zu erkennen und somit falsch-negative Ergebnisse auszuschließen, wurde zusätzlich eine IAC konstruiert. Die Kolonie-DNA-Hybridisierung wurde als kulturelles Verfahren etabliert, um bei einem positiven Real-Time PCR Screening den Nachweis der Lebensfähigkeit sowie die weitere Bestätigung und Charakterisierung der pathogenen Zielkeime zu erbringen. Der Nachweis der Lebensfähigkeit ist in der amtlichen Lebensmittelüberwachung von entscheidender Bedeutung, um eine Aussage über eine Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers treffen zu können. Neben den Vorversuchen zur Optimierung der Real-Time PCR sowie der Kolonie-DNA-Hybridisierung wurde eine In house-Validierung des Verfahrens inklusive einer Verfahrensvergleichsuntersuchung durchgeführt. Als Referenzmethode diente das im Labor bereits etablierte kulturelle Verfahren nach KNÖDL (2008). Die Ergebnisse der Vorversuche sowie der In house-Validierung dienten schließlich als Grundlage zur Erstellung des Verfahrensdiagramms, mit welchem abschließend 100 rohe Schweinefleischproben auf das Vorkommen von pathogenen *Y. enterocolitica* untersucht wurden.

Als Zielsequenz sowohl für die Real-Time PCR als auch für die Kolonie-DNA-Hybridisierung wurde das *ail*-Gen ausgewählt. Dieser chromosomal-kodierte Virulenzfaktor kommt nur bei pathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen vor, die in der Lage sind, eine Infektion zu verursachen (MILLER et al. 1989). Die für die Real-Time PCR verwendeten Primer und die TaqMan Sonde wurden aus der von JOURDAN et al. (2000) entwickelten Real-Time PCR übernommen. Die Primer für die Herstellung der Hybridisierungssonde der Kolonie-DNA-Hybridisierung entstammen der Methode Nr. 163 A des Nordic Committee on Food Analysis „Pathogenic *Y. enterocolitica*. PCR methods for detection in foods“ (NMKL 1998). Die Durchführung der Kolonie-DNA-Hybridisierung erfolgte in Anlehnung an den „Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik“ (L07.18-1) aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (N.N. 2002).

12 Erster Teil: Vorversuche zur Real-Time PCR

12.1 Vorversuche mit SYBR Green

Bei den Vorversuchen zur Real-Time PCR mit dem Detektionsfarbstoff SYBR Green konnte mit der Primerkonzentration von 0,2 µM ein optimales Ergebnis erzielt werden. Auch JOURDAN et al. (2000) verwendeten in ihrer Real-Time PCR diese Primerkonzentration. Die optimale Anlagerungs-Temperatur konnte durch zahlreiche Versuche bei +50 °C für 60 s ermittelt werden. Die Anlagerungs-Temperatur sollte ungefähr 5 °C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen (BANGSOW et al. 2002). Die ermittelte optimale Anlagerungs-Temperatur von +50 °C lag demzufolge bei dem *RT-ail 1* Primer (Schmelztemperatur von +55,19 °C) recht genau 5 °C, bei dem *RT-ail 2* Primer (Schmelztemperatur +53,78 °C) circa 4 °C unterhalb der Schmelztemperatur. JOURDAN et al. (2000) verwendeten in ihrer Real-Time PCR eine Anlagerungs-Temperatur von +58 °C, die in den eigenen Untersuchungen jedoch keine zufrieden stellenden Ergebnisse erzielte.

12.2 Vorversuche mit der TaqMan Sonde

Bei den Vorversuchen zur Real-Time PCR mit der TaqMan Sonde als sequenzspezifischen Farbstoff konnten die besten Ergebnisse mit einer Sondenkonzentration von 0,08 µM erreicht werden. JOURDAN et al. (2000) verwendeten in ihrer Real-Time PCR allerdings eine TaqMan Sondenkonzentration von 25 nM. Da schon die kleinste eingesetzte Konzentration von 0,05 µM die schlechtesten Ergebnisse lieferte, wurde auf das Einsetzen dieser Konzentration von JOURDAN et al. (2000) verzichtet. Bei den Versuchen zur Ermittlung des optimalen Master Mixes ergab der QuantiFast Probe PCR Kit von QIAGEN gegenüber den weiteren eingesetzten Master Mixen das beste Ergebnis.

12.3 Konstruktion einer IAC für die TaqMan PCR

Das Mitführen einer IAC oder EAC ist in der Amtlichen Methode L 00.00-45 nach § 64 LFGB (N.N. 2006c) vorgeschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine IAC in Anlehnung an SACHADYN und KUR (1998) und ABDULMAWJOOD et al. (2002) entwickelt. Die IAC bestand aus einer Nicht-Ziel-DNA, die zu jeder Reaktion in einer festgelegten Anzahl an Kopien zugefügt wurde. Sie wurde gleichzeitig mit der Ziel-Sequenz im gleichen Reaktionsansatz unter gleichen Bedingungen amplifiziert (HOORFAR et al. 2004). Die in dieser Arbeit zum Einsatz kommende IAC stellte eine „kompetitive IAC“ dar. Hierbei wurden Ziel-DNA und IAC mit Hilfe des gleichen Primerpaares amplifiziert, was allerdings zu einer

Konkurrenz zwischen Ziel-DNA und IAC um das gleiche Primerpaar führte. Daher musste bei der Konstruktion der kompetitiven IAC das Augenmerk ganz besonders auf die Kopienzahl und die Größe der IAC gelegt werden (HOORFAR et al. 2004) (Kapitel 2.2.1.1). Die Verdünnungsstufe 10^{-10} der IAC mit einer Kopienzahl von 6,7 Kopien/ μ l erwies sich in den eigenen Versuchen als optimal, da diese gerade noch in der Lage war, ein positives Fluoreszenzsignal des Reporter-Farbstoffes JOE zu generieren, ohne dabei die Amplifikation der pathogenen *Y. enterocolitica* zu stark zu beeinflussen.

Bisher existieren nur sehr wenige PCR-Verfahren für *Y. enterocolitica*, die eine IAC beinhalten. THISTED LAMBERTZ et al. (1998, 2007) setzten in ihren Untersuchungen mittels konventioneller PCR ebenfalls eine kompetitive IAC für den Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* ein. Die Konstruktion erfolgte über die zusammengesetzten Primer mit der humanen β -actin DNA als Template. Auch im Rahmen des bundesweiten jährlichen Monitoringsplans für Zoonosen in der Lebensmittelkette (BfR 2007) wurden zwei Real-Time PCR Methoden für den Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* dargestellt. Beide verwenden eine nicht kompetitive IAC, welche den Einsatz von zwei Primerpaaren erfordert. Die Plasmide *pUC18* und *pUC19* dienten dabei als Template für die IAC. Auch JACOBSEN et al. (2005) entwickelten eine Real-Time PCR zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* des Serotypes O:9 mit einer nicht kompetitiven IAC. Als Template für die IAC setzten sie das Virale Hämorrhagische Septikämie Virus ein.

13 Zweiter Teil: Vorversuche zur Kolonie-DNA-Hybridisierung

13.1 Herstellung der mit Digoxigenin markierten Hybridisierungssonde

Bei der Herstellung der mit Digoxigenin-dUTP markierten Hybridisierungssonde wurden die HotStarTaq DNA Polymerase von QIAGEN und das Digoxigenin-11-dUTP von ROCHE, gemäß den Herstellerangaben, eingesetzt. Demnach wurden die dNTP's mit Ausnahme des dTTP's in einer Endkonzentration von 200 μ M verwendet. Lediglich das dTTP wurde in einer geringeren Konzentration von 130 μ M eingesetzt, da ein Teil durch das Digoxigenin-dUTP ersetzt werden sollte. Das Digoxigenin-dUTP hingegen wurde in einer Endkonzentration von 70 μ M eingesetzt, was einem Verhältnis von 35% Digoxigenin-dUTP zu 65% dTTP entsprach. Die Hybridisierungssonde wurde, gemäß der Amtlichen Methode L 07.18-1 nach § 64 LFGB (N.N. 2002), zur Hybridisierung in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt.

Gemäß ROCHE (2000, 2003, 2004) ist ihre Verwendung mit einer geringeren Konzentration von 25 ng/ml jedoch auch möglich.

Bereits in früheren Untersuchungen wurde das Digoxigenin zur Markierung von Hybridisierungssonden zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* verwendet (GOVERDE et al. 1993; DURISIN et al. 1997; WEAGANT et al. 1999; GRÖTZBACH 2007). Mit Digoxigenin markierte Hybridisierungssonden bieten im Vergleich zu den früher verwendeten radioaktiv markierten Sonden den Vorteil, dass sie sehr stabil sind und mehrere Male verwendet werden können. Weiterhin sind bei der Herstellung sowie der Anwendung dieser Hybridisierungssonden, im Vergleich zu den radioaktiv markierten Sonden, keine besonderen Sicherheitsvorkehrungen zu beachten (WEAGANT et al. 1999).

13.2 Ermittlung des optimalen Anreicherungsmediums

Da die Effizienz der Kolonie-DNA-Hybridisierung bei hohen Gesamtkeimzahlen ab 10^6 - 10^7 KbE/g Lebensmittel durch ein vermindertes Wachstum der Zielzellen reduziert wird (HILL et al. 1985; JAGOW und HILL 1988; HILL und KEASLER 1991; DURISIN et al. 1997), wurde das optimale Anreicherungsmedium anhand des Koloniewachstums der selektiven CIN-Nährböden ermittelt.

Der Nachweis von einzelnen Kolonien auf den Nährböden gelang bei der nicht-selektiven CASO-Anreicherung bzw. der selektiven ITC-Anreicherung ab der Verdünnungsstufe von 10^{-3} bzw. 10^{-4} . Demzufolge war eine Verdünnung von mindestens 1:1000 bzw. 1:10 000 für die nicht-selektive CASO-Anreicherung bzw. die selektive ITC-Anreicherung nötig, um die Kolonie-DNA-Hybridisierung durchführen zu können. Da sich jedoch mit steigender Anzahl an Verdünnungsstufen nicht nur die Begleitkeime, sondern auch die pathogenen *Y. enterocolitica* verdünnten und zusätzlich ihr Wachstum durch die hohe Begleitflora reduziert wurde, konnte das Ergebnis der Kolonie-DNA-Hybridisierung negativ beeinflusst werden. Daher wurden beide Anreicherungen (nicht-selektive CASO- und selektive ITC-Anreicherung) für die Kolonie-DNA-Hybridisierung als ungeeignet beurteilt. Das Verfahren der Direktausspatelung aus der Ersteinwaage nach kurzer Wiederbelebenszeit wurde somit als Ausgangsmethode für alle weiteren Untersuchungen gewählt. Die optimale Wiederbelebenszeit der Ersteinwaage vor der Direktausspatelung wurde in der folgenden In house-Validierung ermittelt. Der selektive CIN-Agar wurde als Nähragar ausgewählt, da die Verwendung von selektiven Nährböden und Anreicherungen die Sensitivität der Hybridisierung steigern kann (HILL et al. 1983; JAGOW und HILL 1986).

Bei GRÖTZBACH (2007) hingegen erfolgte die Durchführung der Kolonie-DNA-Hybridisierung aus der Rückstellprobe der modifizierten CASO-Anreicherung, die bei -20 °C gelagert wurde. Von der Rückstellprobe wurde eine 1:10 Verdünnung angefertigt und zur Hybridisierung auf den Nährboden aufgetragen. Bei fünf der 14 hybridisierten Proben war eine Anzucht der Bakterien aus der zurückgestellten Anreicherung allerdings nicht möglich. Bedingt durch die Lagerung bei -20 °C kam es hier möglicherweise zur Zerstörung der Keime.

14 Dritter Teil: In house-Validierung des Verfahrens

Mit der DIN EN ISO 16140:2003 (Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren) steht eine normierte internationale Arbeitsvorschrift zur Validierung von qualitativen und quantitativen Verfahren auf dem Gebiet der mikrobiologischen Untersuchung von Lebensmitteln und Futtermitteln zur Verfügung. Allerdings ist die Anwendung der in dieser Norm beschriebenen Verfahren zur Validierung alternativer Verfahren mit einem sehr hohen Aufwand verbunden und daher nicht immer praktikabel. Im Anwendungsbereich dieser Arbeitsvorschrift wird daher darauf hingewiesen, dass es zweckmäßig sein kann, an die Validierung eines alternativen Verfahrens, das als Routineverfahren zur hausinternen Untersuchung eingesetzt werden soll, weniger strenge Anforderungen zu stellen. Daher wurde der Umfang der Validierung an die Erfordernisse des untersuchenden Labors angepasst. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen zur Validierung orientierten sich dabei zum Teil an den Vorgaben der DIN EN ISO 16140:2003, an dem Leitfaden der Schweizerischen Akkreditierungsstelle (N.N. 2006a), sowie an den Anweisungen von HÜBNER et al. (2002).

Zielkeim für die gesamte Validierung war der *Y. enterocolitica* DSM Stamm 11502, welcher dem pathogenen Bioserotyp 4/O:3 zugeordnet ist und der in Deutschland die weiteste Verbreitung aufweist (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2006a). Aufgrund des Mangels an natürlich kontaminierten Proben wurde zur Bestimmung der Nachweisgrenze und der Vergleichsuntersuchung rohes Rinderhackfleisch mit dem *Y. enterocolitica* DSM Stamm 11502 beimpft. Eine natürliche Kontamination konnte damit weitgehend ausgeschlossen werden, da Rinder selten Träger von pathogenen *Y. enterocolitica* darstellen (BUCHER et al. 2002, GRÖTZBACH 2007). Das rohe Rinderhackfleisch wurde als einzige Lebensmittelkategorie ausgewählt, da das eigene Verfahren zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* zukünftig zur Untersuchung von Schweinefleisch angewendet werden soll.

14.1 Inklusivität und Exklusivität der Real-Time PCR

Die Überprüfung der Inklusivität der Real-Time PCR auf das *ail*-Gen von *Y. enterocolitica* erfolgte über den Nachweis von Reinkulturen des *Y. enterocolitica* DSM Stammes 11502. Zur Überprüfung der Exklusivität wurden 32 Nicht-Zielorganismen mittels Reinkulturen eingesetzt. Die Auswahl der exklusiven Keime erfolgte in Anlehnung an die DIN EN ISO 16140:2003, wonach Stämme, die natürlicherweise in dem Lebensmittel vorkommen sowie andere Spezies innerhalb der Zielgattung, miteinbezogen werden sollten. Daher wurden bei der Auswahl vor allem weitere Gattungen aus der Familie der *Enterobacteriaceae* sowie weitere *Yersinia*-Spezies (*Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. enterocolitica* Biotyp 1A) miteinbezogen. Gemäß DIN EN ISO 16140:2003 wurden nur Reinkulturen aus Mikroorganismen eingesetzt, ohne dass eine Lebensmittelprobe zugesetzt wurde.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen belegen die Eignung der Real-Time PCR pathogene *Y. enterocolitica* durch den Nachweis des *ail*-Gens ab einem Keimgehalt von 10^3 KbE/ml detektieren zu können. Gleichzeitig ist die Real-Time PCR in der Lage Nicht-Zielorganismen als solche zu erkennen.

Die hier eingesetzten Primer- und Sondensequenzen wurden bereits von JOURDAN et al. (2000) auf Inklusivität und Exklusivität untersucht. Die Überprüfung der Exklusivität erfolgte anhand von 33 Bakterienstämmen, darunter 21 *Yersinia*-Spezies. Bei keinem der Stämme konnte das *ail*-Gen detektiert werden. Für die Überprüfung der Inklusivität wurden 26 pathogene *Y. enterocolitica* Stämme eingesetzt, bei denen alle das *ail*-Gen ab einem Keimgehalt von ≤ 4 KbE/ml nachgewiesen werden konnte. Hierbei machte es keinen Unterschied, ob die Anzucht der Zielkeime in CASO- oder ITC-Bouillon erfolgte. Dieser Wert korreliert nicht gänzlich mit dem in dieser Arbeit bei der Überprüfung der Inklusivität ermittelten Ergebnis. Allerdings sind die eigenen Untersuchungen zur Überprüfung der Inklusivität aufgrund einer unterschiedlichen eingesetzten Nukleinsäureextraktion (bei JOURDAN et al. (2000) PrepMan[®] von APPLIED BIOSYSTEMS, bei der eigenen Untersuchung DNeasy[®] Blood & Tissue Kit von QIAGEN) und dem Mitführen einer IAC im Vergleich zu den Untersuchungen von JOURDAN et al. (2000) nicht direkt vergleichbar, da sowohl die Effizienz der Probenvorbereitung als auch eine IAC die Sensitivität der PCR beeinflussen können (LANTZ et al. 1998, HOORFAR et al. 2004).

14.2 Inklusivität und Exklusivität der Kolonie-DNA-Hybridisierung

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen belegen die Fähigkeit der Kolonie-DNA-Hybridisierung das *ail*-Gen spezifisch nachzuweisen. Das *ail*-Gen des *Y. enterocolitica* Zielkeims konnte auf allen aufgetragenen Nylonmembranen in allen vier Ansätzen mit Hilfe des positiven Hybridisierungssignals detektiert werden, wohingegen das *ail*-Gen bei keinem der 32 untersuchten exklusiven Keime nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zur Überprüfung der Inklusivität und Exklusivität der Kolonie-DNA-Hybridisierung an einer mit Digoxigenin markierten *ail*-Hybridisierungssonde sind mit den Ergebnissen aus früheren Studien vergleichbar. So konnten KWAGA et al. (1992) an einer mit Digoxigenin markierten *ail*-Sonde bei allen 58 eingesetzten pathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen das *ail*-Gen nachweisen. Bei der Überprüfung der Exklusivität mittels 53 eingesetzten Keimen (*Yersinia*-Spezies, *Y. enterocolitica* Biotyp 1A und weitere Gattungen aus der Familie der *Enterobacteriaceae*) gelang der Nachweis des *ail*-Gens in keinem der Ansätze. Auch GOVERDE et al. (1993) untersuchten mit Digoxigenin markierte *ail*-Sonden mit einer Größe von 0,1 und 0,7 kb auf Inklusivität und Exklusivität. Beide *ail*-Hybridisierungssonden konnten bei 39 pathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen ein positives Hybridisierungssignal erzeugen, während von 174 untersuchten apathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen und anderen *Yersinia*-Spezies lediglich zwei Stämme ein positives Hybridisierungssignal generieren konnten. Bei diesen zwei apathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen war es mittels Southern-Blot gelungen, ein nicht funktionstüchtiges *ail*-Gen zu identifizieren. Im Rahmen dieser Dissertation und den Untersuchungen von KWAGA et al. (1992) und GOVERDE et al. (1993) wurde das funktionstüchtige *ail*-Gen somit ausschließlich bei pathogenen *Y. enterocolitica* nachgewiesen.

14.3 Nachweisgrenze der Real-Time PCR

Die Ermittlung der Nachweisgrenze der Real-Time PCR erfolgte sowohl aus der nicht-selektiven CASO- wie auch aus der selektiven ITC-Bouillon. Für die selektive ITC-Anreicherung (+25 °C für 48 h) konnte die Nachweisgrenze bei 10^1 KbE/10 g Hackfleisch, für die nicht-selektive CASO-Anreicherung (+25 °C über Nacht) bei 10^3 KbE/10 g Hackfleisch ermittelt werden. Der Einsatz der selektiven Anreicherung erbrachte somit eine Verbesserung der Nachweisgrenze um zwei Zehnerpotenzen. Zur Untersuchung der

Schweinefleischproben konnte daher die selektive ITC-Anreicherung als das optimale Anreicherungsmedium zur Durchführung der Real-Time PCR ermittelt werden.

In früheren Studien konnten bereits andere Autoren vergleichbare Nachweisgrenzen mit denselben Primer- und TaqMan Sondensystemen ermitteln. So gelang es JOURDAN et al. (2000) eine Nachweisgrenze von ≤ 1 KbE/g Hackfleisch aus der ITC-Anreicherung nach 24 h Bebrütung bei Raumtemperatur nachzuweisen. BOYAPALLE et al. (2001) ermittelten mit dergleichen TaqMan Real-Time PCR (nach einer Anreicherung in ITC-Bouillon für 48 h) eine Nachweisgrenze von 0,4 KbE/g Hackfleisch. Auch HARTMANN (2007) konnte mit einer TaqMan Real-Time PCR auf das *ail*-Gen, jedoch mit anderen Primern (170 bp), eine Nachweisgrenze von 10 KbE/10 g Hackfleisch aus der CASO-Anreicherung nach 24 h Bebrütung nachweisen. Somit sind die in früheren Studien ermittelten Werte mit der hier nachgewiesenen Nachweisgrenze aus der ITC-Anreicherung von 10 KbE/10 g vergleichbar. Allerdings wurde bei keiner der genannten Autoren eine IAC mitgeführt, durch die die Nachweisgrenze durch Konkurrenz um das gleiche Primerpaar hätte beeinflusst werden können (HOORFAR et al. 2004). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der vorliegenden Arbeit, trotz des Mitführens einer IAC, eine vergleichbare Nachweisgrenze ermittelt werden konnte.

14.4 Nachweisgrenze der Kolonie-DNA-Hybridisierung

Die Ermittlung der Nachweisgrenze der Kolonie-DNA-Hybridisierung wurde mittels einer Digoxigenin markierten Hybridisierungssonde vollzogen, die das auf dem Chromosom lokalisierte Zielgen *ail* detektiert. Dafür erfolgte das Ausspateln von 100 μ l der Ersteinwaage nach verschiedenen Wiederbelebungszeiten bei Raumtemperatur mit dem Ziel, die bestmögliche Zeit festzulegen, um die kleinste Anzahl an Bakterien zu isolieren. Bei allen mit Hilfe der Kolonie-DNA-Hybridisierung ermittelten Kolonien, die nach Ausstrich auf CIN-Agar als typisch befunden wurden, erfolgte zur spezifischen Bestätigung der Isolate die Durchführung der Real-Time PCR und die biochemische Charakterisierung. Daher wurde das Ergebnis der Kolonie-DNA-Hybridisierung nur bei einer erfolgreichen kulturellen Isolierung als positiv beurteilt.

Nach einer Wiederbelebungszeit von 2 h bei Raumtemperatur konnte die Nachweisgrenze der Kolonie-DNA-Hybridisierung bei 10^3 KbE/10 g ermittelt werden. Durch die Wiederbelebung für 4 und 6 h erfolgte eine Verbesserung der Nachweisgrenze von 10^3 KbE/10 g auf 10^2 KbE/10 g. Bei der 4-stündigen Wiederbelebung konnte im Vergleich zur 6-stündigen Wiederbelebungszeit eine positive Probe der Beimpungsstufe 10^1 KbE/10 g

mehr erkannt werden. Daher wurde für die nachfolgenden Untersuchungen der Schweinefleischproben eine Wiederbelebenszeit von 4-6 h festgelegt.

Die Nachweisgrenze von Kolonie-DNA-Hybridisierungsverfahren wurde bereits in früheren Studien untersucht. So konnten JAGOW und HILL (1986) eine Nachweisgrenze von ≤ 100 KbE/g Schweinefleisch ermitteln. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen wurden hierbei jedoch auf dem Plasmid lokalisierte Zielgene mit Hilfe einer Hybridisierungssonde, die radioaktiv markiert wurde, detektiert. Auch DURISIN et al. (1997) ermittelten mit einer Digoxigenin markierten Sonde auf das *yst*-Gen eine Nachweisgrenze von 10^2 KbE/g Schweinefleisch. Die Ermittlung der Nachweisgrenze wurde bei beiden Untersuchungen allerdings anhand des beobachteten Hybridisierungssignals durchgeführt. Im Gegensatz dazu erfolgte die Ermittlung der eigenen Nachweisgrenze von 10^2 KbE/10 g anhand einer erfolgreichen kulturellen Isolierung mit Hilfe des gebildeten Hybridisierungssignals. Andere Autoren wiederum, die die Hybridisierung ebenfalls im Hinblick auf eine erfolgreiche Isolierung beurteilen, stufen die Nachweisgrenze der Hybridisierungsverfahren ähnlich den kulturellen Verfahren bei 10^3 - 10^5 KbE/g (GRÖTZBACH 2007) bzw. bei 10^5 - 10^6 KbE/10 g (HILL und KEASLER 1991) ein. Die eigene, relativ niedrige Nachweisgrenze von 10^2 KbE/10 g lässt sich möglicherweise durch die Verwendung eines frischen Stammes bei der Beimpfung der Hackfleischproben erklären. Zudem konnte bei dem zur Validierung eingesetzten Rinderhackfleisch eine niedrige Gesamtkeimzahl von $9,0 \times 10^4$ KbE/g errechnet werden, so dass die pathogenen *Y. enterocolitica* nicht von der Hintergrundflora auf dem Selektivagar überwachsen wurden. Allerdings könnte die Optimierung des Anreicherungsmediums der Kolonie-DNA-Hybridisierung in den eigenen Vorversuchen eine weitere mögliche Erklärung für die ermittelte niedrige Nachweisgrenze darstellen.

14.5 Nachweisgrenze des kulturellen Verfahrens nach KNÖDL (2008)

Das kulturelle Verfahren nach KNÖDL (2008) wurde aus dem Direktausstrich, der Über-Nacht-Anreicherung sowie der ITC-Anreicherung durchgeführt. Die Nachweisgrenze konnte für das kulturelle Verfahren nach KNÖDL (2008) in der vorliegenden Arbeit bei 10^2 KbE/10 g Hackfleisch ermittelt werden. Hierbei wurden die Zielkeime bei der Beimpfungsstufe von 10^2 KbE/10 g Hackfleisch aus drei von vier Proben isoliert, wohingegen der Nachweis der Keime bei der Beimpfungsstufe von 10^1 KbE/10 g Hackfleisch in keiner der vier Proben gelang. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der von KNÖDL (2008) selbst ermittelten Nachweisgrenze, die bei 10^1 bis 10^2 KbE/10 g Hackfleisch ermittelt wurde. KNÖDL (2008)

konnte bei der Beimpfungsstufe von 10^2 KbE/10 g Hackfleisch die pathogenen Keime aus allen vier Proben isolieren, während bei der Beimpfungsstufe von 10^1 KbE/10 g Hackfleisch der kulturelle Nachweis in einer von vier Proben positiv verlief.

Die ermittelte eigene Nachweisgrenze für das kulturelle Verfahren nach KNÖDL (2008) liegt circa ein bis zwei Zehnerpotenzen niedriger als die ermittelten Nachweisgrenzen von kulturellen Verfahren anderer Autoren. So konnten BOYAPALLE et al. (2001) eine Nachweisgrenze von 4×10^3 KbE/g Hackfleisch nach einer 48-stündigen Anreicherung in ITC und nachfolgendem Ausstrich auf CIN-Agar ermitteln. HARTMANN (2007) konnte mit einem Direktausstrich auf CIN-Agar nach einer Anreicherung in ITC für 48 h bei der Beimpfungsstufe von 10^3 KbE/10 g Hackfleisch aus drei von vier Proben die pathogenen *Y. enterocolitica* isolieren, während bei der Beimpfungsstufe von 10^2 KbE/10 g Hackfleisch die Keime in keiner der Proben kulturell nachgewiesen wurden.

14.6 Verfahrensvergleichsuntersuchung

14.6.1 Vergleich der Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens mit dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008)

Bei der vergleichenden Untersuchung der Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens mit dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008) als Referenzmethode erfolgte die Auswertung mit Hilfe des Auswerteschemas für den Vierfeldertest (SACHS 2002; N.N. 2006a). Für die eigene Kolonie-DNA-Hybridisierung ergab sich eine relative Sensitivität von 91% sowie eine relative Falsch-Negativ-Rate von 9% in Bezug auf die Referenzmethode. Das eine falsch-positive Ergebnis der Kolonie-DNA-Hybridisierung bezüglich der Referenzmethode konnte durch weitere Bestätigungsverfahren als pathogene *Y. enterocolitica* identifiziert werden. Somit ergab sich eine wahre relative Spezifität von 100% sowie eine wahre relative Falsch-Positiv-Rate von 0%. Die Ermittlung der statistischen Übereinstimmung ergab einen Wert von 0,8, was einer starken Übereinstimmung der Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens mit dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL entsprach. Auch die Berechnung der relativen Richtigkeit als Maß für den Grad der Übereinstimmung der Resultate, lieferte einen Wert von 90%. Somit konnte die Eignung der Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens als eine alternative Isolierungsmethode für pathogene *Y. enterocolitica* bestätigt werden.

14.6.2 Vergleich des eigenen Verfahrens mit dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008) in Bezug auf die inokulierten bzw. nicht-inokulierten Proben

Für die Real-Time PCR des eigenen Verfahrens konnte im Rahmen der Vergleichsuntersuchung (Tabelle 51) eine deutlich höhere Sensitivität (100%) gegenüber der Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens (69%) und dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL (69%) ermittelt werden. Mit Hilfe der Real-Time PCR gelang es in allen 16 inokulierten Proben die pathogenen *Y. enterocolitica* nachzuweisen (Tabelle 48). Die Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens und das kulturelle Verfahren nach KNÖDL (2008) hingegen konnten die pathogenen Zielkeime aus lediglich elf der 16 inokulierten Proben isolieren. Die Falsch-Negativ-Rate des kulturellen Verfahrens nach KNÖDL und der Kolonie-DNA-Hybridisierung (31%) lagen dementsprechend deutlich höher als die der Real-Time PCR (0%). Durch die im Vergleich zur Kolonie-DNA-Hybridisierung und zum kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008) ermittelte höhere Sensitivität und geringere Falsch-Negativ-Rate der Real-Time PCR ist sie geeignet, als Screening-Methode eingesetzt zu werden.

Diese Ergebnisse bestätigen die von anderen Autoren ermittelte höhere Sensitivität der Real-Time PCR gegenüber den kulturellen Nachweisverfahren (BOYAPALLE et al. 2001; VISHNUBHATLA et al. 2001; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2006b; HARTMANN 2007; GRÖTZBACH 2007). Dafür wird eine zu geringe Ausgangskeimzahl an pathogenen *Y. enterocolitica* oder das Vorkommen von toten oder sublethal geschädigten Keimen, die ebenfalls in der PCR amplifiziert werden, verantwortlich gemacht (JOHANNESSEN et al. 2000). Allerdings kann in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von toten oder sublethal geschädigten Keimen relativ ausgeschlossen werden, da durch den Einsatz einer selektiven ITC-Anreicherung für 48 h die Wahrscheinlichkeit lebensfähige Keime mit der PCR zu detektieren, erhöht wurde (SCHEU et al. 1998). Für eine geringe Ausgangskeimzahl kommen bestimmte Lebensmittelinhaltsstoffe oder hohe Gehalte an Begleitkeimen in Frage, da diese in der Lage sind das Wachstum der Zielkeime negativ zu beeinflussen (MÄDE et al. 2004).

Im Gegensatz dazu ergaben die Berechnungen der Spezifität und der Falsch-Positiv-Rate (100% und 0%) aller drei Methoden ein identisches Ergebnis. Mit allen drei Methoden ergab die Untersuchung der vier nicht-inokulierten Proben ein negatives Ergebnis.

Das kulturelle Verfahren nach KNÖDL (2008) und die Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens erzielten eine identische Sensitivität und Falsch-Negativ-Rate. Mit beiden Methoden gelang es aus elf der 16 inokulierten Proben pathogene *Y. enterocolitica*

zu isolieren. Daher stellt die Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens im Vergleich zum kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008) ein mindestens gleichwertiges Verfahren dar, um die pathogenen Zielkeime aus Schweinefleisch isolieren zu können. In früheren Studien allerdings konnte für die Kolonie-DNA-Hybridisierung eine höhere Sensitivität gegenüber den kulturellen Verfahren ermittelt werden (NESBAKKEN et al. 1991a; GOVERDE et al. 1993). Allerdings wurde bei diesen Untersuchungen die Beurteilung anhand des gebildeten Hybridisierungssignals durchgeführt, wohingegen in den eigenen Untersuchungen die Beurteilung anhand einer erfolgreichen kulturellen Isolierung erfolgte.

KNÖDL (2008) führte im Rahmen ihrer Dissertationsarbeit ebenfalls eine Verfahrensvergleichsuntersuchung ihres kulturellen Verfahrens mit dem „Horizontalen Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Y. enterocolitica*“ L 00.00-90 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (N.N. 2004) durch. Für beide Verfahren konnte eine vergleichbare Sensitivität und Falsch-Negativ-Rate ermittelt werden. Da für die Kolonie-DNA-Hybridisierung des eigenen Verfahrens eine identische Sensitivität und Falsch-Negativ-Rate gegenüber dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL ermittelt werden konnte, stellt diese, auch im Vergleich zum Amtlichen Verfahren, ein gleichwertiges Verfahren dar. Die Kolonie-DNA-Hybridisierung ist gegenüber dem Amtlichen Verfahren und dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008) mit einem geringeren zeitlichen Aufwand verbunden. Darüber hinaus liefert die Kolonie-DNA-Hybridisierung durch den Einsatz der *ail*-spezifischen Hybridisierungssonde einen direkten Pathogenitätsnachweis, während die klassischen kulturellen Verfahren verdächtige Kolonien zunächst rein nach der Kolonienmorphologie auswählen. Daraus resultiert ein höherer Arbeitsaufwand, da auch andere apathogene *Yersinia spp.* oder andere Gattungen innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* verdächtige Kolonien auf CIN-Agar bilden können und diese zunächst der weiteren Charakterisierung bedürfen (HEAD et al. 1982; DE BOER und SELDAM 1987; FUKUSHIMA 1987; VISHNUBHATLA et al. 2001).

Um im Rahmen der Amtlichen Lebensmittelüberwachung eine Aussage über eine Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers treffen zu können, bedarf es des Nachweises der Lebensfähigkeit der Erreger. Die Real-Time PCR als alleiniges Verfahren kann diesen Nachweis nicht erbringen, da auch die DNA von toten oder nicht mehr lebensfähigen *Y. enterocolitica* Stämmen amplifiziert und detektiert wird (JOHANNESSEN et al. 2000; MÄDE et al. 2004). Aufgrund der ermittelten höheren Sensitivität der Real-Time PCR gegenüber der Kolonie-DNA-Hybridisierung ist diese jedoch in der Lage Proben auf das Vorkommen von pathogenen *Y. enterocolitica* zu screenen. Die Kolonie-DNA-Hybridisierung

stellt dagegen eine geeignete Methode dar, um bei einem positiven Real-Time PCR Screenig die pathogenen *Y. enterocolitica* kulturell zu isolieren.

15 Vierter Teil: Verfahrensdigramm

Bei der Festlegung des Verfahrensdigrammes zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* mittels Real-Time PCR und Kolonie-DNA-Hybridisierung wurden die Ergebnisse der Vorversuche sowie der In house-Validierung berücksichtigt.

Aus den **Vorversuchen der Real-Time PCR** wurde eine Primerkonzentration von 0,2 μM , eine Anlagerungs-Temperatur von +50 °C sowie eine TaqMan Sondenkonzentration von 0,08 μM festgelegt. Außerdem konnte der QuantiFast Probe PCR Kit von QIAGEN als der optimale Master Mix ermittelt werden. Bei der Konstruktion der IAC für die TaqMan PCR wurde mit der Kopienzahl von 6,7/ μl die niedrigste Konzentration an IAC ermittelt, die gerade noch in der Lage war, ein positives Fluoreszenzsignal des Reporter-Farbstoffes JOE zu erzielen, ohne dabei die Amplifikation des *ail*-Gens zu beeinflussen.

Aus den **Vorversuchen der Kolonie-DNA-Hybridisierung** konnte das Verfahren der Direktausspatelung als die optimale Methode zur Durchführung der Kolonie-DNA-Hybridisierung ermittelt werden.

Aus den Ergebnissen der **In house-Validierung** wurde die selektive ITC-Bouillon nach einer 48-stündigen Anreicherungszeit bei +25 °C als das optimale Anreicherungsmedium zur Durchführung der Real-Time PCR festgelegt. Darüber hinaus wurde für das Verfahren der Direktausspatelung der Kolonie-DNA-Hybridisierung eine optimale Wiederbelebenszeit von 4-6 h festgelegt. Durch die in der In house-Validierung ermittelte niedrigere Nachweisgrenze sowie höhere Sensitivität der Real-Time PCR gegenüber der Kolonie-DNA-Hybridisierung ist sie somit geeignet als Screening-Methode eingesetzt zu werden. Auch die Kolonie-DNA-Hybridisierung hat sich, durch die in der In house-Validierung ermittelten, vergleichbaren Sensitivität zum kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008), als eine alternative Methode zur kulturellen Isolierung der pathogenen *Y. enterocolitica* dargestellt.

Für das Verfahren der Direktausspatelung zur Durchführung der Kolonie-DNA-Hybridisierung wurde einerseits der selektive CIN-Nährboden ausgewählt, da durch den Einsatz von selektiven Nährmedien die Sensitivität der Hybridisierung erhöht werden kann (HILL et al. 1983; JAGOW und HILL 1986). Bei den Untersuchungen von GRÖTZBACH (2007) stellte sich der selektive CIN-Agar zur Hybridisierung als weniger geeignet heraus, da

die in dem Agar vorhandenen Farbstoffe durch die Waschschriffe nicht vollständig entfernt werden konnten. Dies führte zum Teil zu Verwechslungen mit positiven Signalen. Um diese möglichen Verwechslungen zu verhindern und um die Sensitivität der Kolonie-DNA-Hybridisierung durch Kombination zweier Nährböden zu erhöhen, wurde bei der Erstellung des Verfahrensdiagrammes zusätzlich der nicht-selektive CASO-Agar eingeführt. Des Weiteren wurde von jeder Probe die Verdünnungsstufe 10^{-1} auf beide Nährböden ausgespatelt, um bei einer gegebenenfalls hohen Begleitflora der Probe die Hybridisierung durchführen zu können. Die Durchführung der Kolonie-DNA-Hybridisierung erfolgte in Anlehnung an den „Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik“ (L07.18-1) aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (N.N. 2002), da diese Technik der Durchführung das bereits etablierte Verfahren im Labor darstellte.

Mit dem eigens entwickelten kombinierten Verfahren ist eine Aussage über die An- oder Abwesenheit pathogener *Y. enterocolitica* bereits am Tag 3 der Untersuchung möglich. Sollte das Real-Time PCR Screening am Tag 3 ein negatives Ergebnis erzielen, so kann die Untersuchung an dieser Stelle abgebrochen werden. Damit ist ein effektiverer sowie effizienterer Einsatz von Personal- und Zeitressourcen gewährleistet. Bei einem positiven Real-Time PCR Screening schließt sich zur Isolierung der pathogenen Zielkeime die Kolonie-DNA-Hybridisierung an. Im Anschluss an die Kolonie-DNA-Hybridisierung erfolgt die Untersuchung auf Pathogenität der isolierten Kolonien mittels Real-Time PCR, gefolgt von der biochemischen Bestätigung, wie sie im „Horizontalen Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Y. enterocolitica*“ L 00.00-90 (N.N. 2004) der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren gefordert wird. Das positive Real-Time PCR Ergebnis kann somit bereits am Tag 6 der Untersuchung vollständig isoliert vorliegen.

16 Fünfter Teil: Nachweis von *Y. enterocolitica* im Schweinefleisch

16.1 Real-Time PCR Screening

Insgesamt wurden 35 Proben rohes Hackfleisch, 32 Proben rohes Fleisch, 25 Proben Zungen und acht Proben Innereien untersucht. Der molekularbiologische Nachweis des *ail*-Gens verlief bei 17 der insgesamt 100 untersuchten Proben positiv (17%). Von 35 untersuchten **Hackfleischproben** konnte das *ail*-Gen in fünf Proben (14%) detektiert werden. In rohem Schweinehackfleisch konnte durch die Real-Time PCR auf das *ail*-Gen in früheren Untersuchungen in Deutschland Prävalenzen zwischen 6,5% (GRÖTZBACH 2007) und 13% (HARTMANN 2007) ermittelt werden. Die eigene ermittelte Prävalenz in Hackfleisch von 14% ist somit im Vergleich zu früheren Untersuchungen aus Deutschland leicht erhöht. In den USA hingegen konnten in der Vergangenheit mittels Real-Time PCR deutlich höhere Nachweisraten erzielt werden. So gelang es BOYAPALLE et al. (2001) eine Prävalenz von 38% in 350 untersuchten Hackfleischproben nachzuweisen während VISHNUBHATLA et al. (2001) bei 47% der 100 untersuchten Hackfleischproben pathogene *Y. enterocolitica* detektieren konnten. Im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen waren diese Untersuchungen mit einer Probenzahl von 350 und 100 allerdings weitaus umfangreicher. Außerdem wurde bei beiden Studien eine von den eigenen Untersuchungen abweichende Nukleinsäureextraktion gewählt und es wurden keine IAC's mitgeführt. Darüber hinaus bietet Hackfleisch aufgrund seiner vergrößerten Oberfläche einen idealen Nährboden für das Wachstum von Mikroorganismen. Bei unsachgemäßer Reinigung der Gerätschaften, wie beispielsweise des Fleischwolfes, sind Kreuzkontaminationen innerhalb der Hackfleischproben somit leicht möglich.

Innerhalb der Warengruppe **rohes Fleisch** gelang der Nachweis des *ail*-Gens in keiner der 32 untersuchten Proben. GRÖTZBACH (2007) ermittelte in Deutschland mit einer Real-Time PCR eine Prävalenz von 10% in 109 untersuchten rohen Fleischproben. Auch HARTMANN (2007) wies eine Prävalenz von 10% in 30 untersuchten Proben nach. FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2006b) konnten ebenfalls mit einer Real-Time PCR eine Prävalenz von 7% in 100 untersuchten rohen Schweinefleischproben ermitteln. In unzerkleinertem Fleisch ist der Ausgangskeimgehalt an pathogenen Keimen im Vergleich zu Hackfleisch in der Regel geringer. Daher ist es nicht auszuschließen, dass die pathogenen *Y. enterocolitica* zum Teil in geringen Konzentrationen im Lebensmittel vorhanden waren, mit der Real-Time PCR allerdings nicht detektiert werden konnten.

In insgesamt elf der 25 untersuchten **Schweinezungen** konnten pathogene *Y. enterocolitica* mit der Real-Time PCR nachgewiesen werden. Daraus ergab sich für die eigene Untersuchung eine Prävalenz von 44%. Für Deutschland liegen jedoch noch keine weiteren Studien über die Nachweisraten von pathogenen *Y. enterocolitica* aus Schweinezungen mittels Real-Time PCR vor. Mit Hilfe der konventionellen PCR allerdings ermittelte KNÖDL (2008) in Deutschland eine Nachweisrate von 25% in vier Zungen. Die eigene ermittelte Nachweisrate von 44% liegt somit deutlich über diesem Wert. In den USA hingegen konnten VISHNUBHATLA et al. (2001) mittels Real-Time PCR eine Nachweisrate von 67% in 15 untersuchten Schweinezungen nachweisen. Frühere Untersuchungen mittels konventioneller PCR aus Finnland bestätigen die hohe Nachweisrate von pathogenen *Y. enterocolitica* in Schweinezungen. Die Untersuchungen von FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999, 2001b) ergaben Nachweisraten von 92% und 83% in 51 bzw. 99 untersuchten Schweinezungen. Die eigene ermittelte Nachweisrate liegt damit deutlich unter diesen Werten aus den USA und Finnland.

Innerhalb der Warengruppe **Innereien** (3 x Leber und 5 x Niere) wurde das *ail*-Gen in einer von acht untersuchten Proben detektiert (Niere), was einer Prävalenz von 12,5% entsprach. Weitere Ergebnisse zum Vorkommen von pathogenen *Y. enterocolitica* in Innereien liegen bisher nur aus Untersuchungen mittels konventioneller PCR vor. KNÖDL (2008) konnte in sieben untersuchten Innereien in Deutschland keine pathogenen *Y. enterocolitica* ermitteln. In Finnland wiesen FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2000 und 2001b) eine Prävalenz von 62% und 56% in 34 bzw. 16 untersuchten Innereien nach. Die eigene ermittelte Prävalenz von 12,5% liegt daher über der von KNÖDL (2008), aber deutlich unter den von FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2000 und 2001b) ermittelten Prävalenzen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass in den eigenen Untersuchungen lediglich eine sehr begrenzte Anzahl an Innereien untersucht wurde.

Die zum Teil unterschiedlichen Nachweisraten in Zungen und Innereien vom Schwein kommen vermutlich durch den Schlachtprozess zustande. Da pathogene *Y. enterocolitica* häufig in den Tonsillen von Schweinen vorkommen und diese in der Regel mit dem gesamten Geschlinge entfernt werden, stellen die Tonsillen eine bedeutende Kontaminationsquelle der Zungen und Innereien beim Schlachtvorgang dar (CHRISTENSEN 1980; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000, 2007). Durch eine Optimierung des Schlachtprozesses sowie verbesserte Hygienemaßnahmen lassen sich Kreuzkontaminationen und in deren Folge hohe Nachweisraten vermeiden.

Bei keiner der genannten Autoren wurde jedoch bei den Untersuchungen mittels PCR eine IAC mitgeführt. IAC's können durch Konkurrenz um die gleichen Primerpaare zu einer herabgesetzten Sensitivität der Real-Time PCR führen (HOORFAR et al. 2004). Dennoch sind die eigenen ermittelten Ergebnisse der Real-Time PCR mit einer IAC innerhalb der verschiedenen Warengruppen vergleichbar mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen, welche keine IAC's beinhalteten. Durch das Mitführen der IAC konnten in der vorliegenden Arbeit falsch-negative Ergebnisse vermieden werden.

16.2 Kultureller Nachweis mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung

Um in der amtlichen Lebensmittelüberwachung eine Aussage über eine mögliche Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers treffen zu können, ist die kulturelle Isolierung der pathogenen Erreger nötig. In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Kolonie-DNA-Hybridisierung zur Isolierung pathogener *Y. enterocolitica* aus den Real-Time PCR positiven Proben etabliert. Daher wurde das Ergebnis der Kolonie-DNA-Hybridisierung nur bei einer erfolgreichen kulturellen Isolierung als positiv beurteilt. Mit Hilfe der Kolonie-DNA-Hybridisierung konnten die pathogenen *Y. enterocolitica* aus insgesamt sechs der 17 hybridisierten Proben (35%) isoliert werden. Bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Proben entsprach dies einem Anteil von 6%. Nach Auftrennung in Warengruppen gelang die Isolierung somit aus 3% der untersuchten Hackfleischproben, aus 16% der untersuchten Zungen und aus 12,5% der untersuchten Innereien. Innerhalb der Warengruppe rohes Fleisch konnten die pathogenen Keime allerdings nicht isoliert werden. Alle aus den sechs Proben isolierten Stämme konnten dem pathogenen Bioserotyp 4/O:3 zugeordnet werden, was im Anschluss durch das BfR bestätigt wurde.

GRÖTZBACH (2007) führte in ihrer Dissertationsarbeit ähnliche Untersuchungen durch. Auch sie setzte die Kolonie-DNA-Hybridisierung bei Real-Time PCR positiven Proben ein. Genau wie bei den eigenen Untersuchungen wurde hier eine mit Digoxigenin markierte Sonde, die das *ail*-Gen nachwies, verwendet. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen war in dieser Arbeit eine Isolierung pathogener *Y. enterocolitica* aus Schweinefleischproben allerdings nicht möglich. Die Durchführung der Kolonie-DNA-Hybridisierung wies jedoch im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen Unterschiede auf. So verwendete GRÖTZBACH (2007) als Anreicherungsmedium modifizierte CASO-Bouillon mit Gallensalzen, um die grampositive Begleitflora zu hemmen. Darüber hinaus erfolgte die Durchführung der Kolonie-DNA-Hybridisierung aus den Rückstellproben der Ersteinwaagen, welche bei -20 °C gelagert wurden. GRÖTZBACH (2007) gab zur Diskussion, dass gerade

diese Lagerung bei -20 °C möglicherweise zur Zerstörung der Keime und somit zu negativen Hybridisierungsergebnissen führte. Somit ist das eigene Verfahren der Direktausspatelung nach 4-6-stündiger Wiederbelebungszeit mit anschließender Kühllagerung der bebrüteten CIN- und CASO-Nährböden weitaus erfolgreicher. Bei den Untersuchungen von GRÖTZBACH (2007) stellte sich außerdem der selektive CIN-Agar als weniger geeignet dar, da die in dem Agar vorhandenen Farbstoffe durch die Waschvorgänge nicht vollständig entfernt werden konnten. Dies wurde bei den eigenen Untersuchungen jedoch nicht beobachtet. Hier stellte sich der CIN-Agar im Vergleich zu dem nicht-selektiven CASO-Agar durch die Hemmung der Begleitflora als geeigneter dar. Mittels CIN-Agar war die Isolierung aus sechs der 17 Real-Time PCR positiven Proben möglich, während mit Hilfe des CASO-Agars lediglich drei Proben isoliert werden konnten.

Andere Autoren wiederum, die das Ergebnis der Kolonie-DNA-Hybridisierung anhand des gebildeten Hybridisierungssignals beurteilen, konnten in der Vergangenheit deutlich höhere Nachweisraten der Kolonie-DNA-Hybridisierung im Vergleich zu den klassischen kulturellen Verfahren erzielen (NESBAKKEN et al. 1991a; GOVERDE et al. 1993). Beispielsweise gelang es NESBAKKEN et al. (1991a) in Norwegen mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung im Anschluss an zwei konventionelle kulturelle Verfahren in 60% der 50 untersuchten rohen Schweineproben pathogene *Y. enterocolitica* mittels des positiven Hybridisierungssignals nachzuweisen. Mit den beiden klassischen kulturellen Verfahren gelang die Isolierung lediglich aus 18% der Proben.

Bezogen auf die einzelnen Warengruppen gelang es somit in den eigenen Untersuchungen mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung aus 3% der untersuchten **rohen Hackfleischproben** pathogene *Y. enterocolitica* zu isolieren. Verglichen mit den ermittelten klassischen kulturellen Nachweisraten weiterer deutscher Studien ist diese eigene ermittelte Nachweisrate von 3% recht hoch. Weder bei KNÖDL (2008) noch bei HARTMANN (2007) und GRÖTZBACH (2007) war die kulturelle Isolierung pathogener *Y. enterocolitica* aus rohem Hackfleisch möglich. Auch in den USA verlief der kulturelle Nachweis bei BOYAPALLE et al. (2001) in 350 untersuchten Hackfleischproben negativ. Dagegen gelang es VISHNUBHATLA et al. (2001) in 32% der untersuchten Proben die pathogenen Keime kulturell nachzuweisen. Bei weiteren Untersuchungen in Finnland wurden von FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999) eine Nachweisrate von 2% in Hackfleisch erzielt.

Innerhalb der Warengruppe **rohes Fleisch** war der kulturelle Nachweis der pathogenen *Y. enterocolitica* mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung nicht möglich. Dies korreliert mit

weiteren Ergebnissen von GRÖTZBACH (2007), HARTMANN (2007) und FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2006b) aus Deutschland.

Innerhalb der Warengruppe **Zungen und Innereien** verlief der kulturelle Nachweis der pathogenen *Y. enterocolitica* mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung in 16% bzw. 12,5% der untersuchten Proben positiv. Mittels klassischer kultureller Nachweismethoden konnte KNÖDL (2008) in Deutschland aus Innereien keine pathogenen *Y. enterocolitica* isolieren, während der kulturelle Nachweis in 25% der vier untersuchten Zungen positiv verlief. In Finnland und den USA konnten deutlich höhere Prävalenzen pathogener *Y. enterocolitica* in Zungen und Innereien vom Schwein ermittelt werden. So stellten FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999, 2001b) die Zielkeime in 78% bzw. 80% und VISHNUBHATLA et al. (2001) in 33% der untersuchten Zungen fest. Innerhalb der Warengruppe Innereien verlief der kulturelle Nachweis bei FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2000, 2001b) in 50% bzw. 31% der Proben positiv. Die zum Teil recht unterschiedlich hohen Nachweisraten in diesen Produkten kommen vermutlich, wie bereits in [Kapitel 16.1](#) beschrieben, durch unterschiedliche Schlachtabläufe und Hygienemaßnahmen zustande.

Generell sind die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen durch klassische kulturelle Nachweisverfahren vergleichbar. Innerhalb der Warengruppe Hackfleisch ist das eigene Ergebnis im Vergleich zu weiteren deutschen Untersuchungen sogar deutlich besser ausgefallen. Die Kolonie-DNA-Hybridisierung bietet im Vergleich zu den klassischen kulturellen Nachweisverfahren den Vorteil, dass sie eine direkte Unterscheidung sowohl zwischen pathogenen und apathogenen *Y. enterocolitica* als auch zwischen pathogenen *Y. enterocolitica* und anderen *Yersinia*-Spezies ermöglicht. Des Weiteren ist ihre Durchführung weniger zeitintensiv und es werden ausschließlich lebende Zellen detektiert (DURISIN et al. 1997; JOHANNESSEN et al. 2000).

16.3 Vergleich des Real-Time PCR Screenings und des kulturellen Nachweises

In den eigenen Untersuchungen stellte sich das Real-Time PCR Screening im Vergleich zur Kolonie-DNA-Hybridisierung als kulturelles Verfahren als das sensitivste Verfahren dar, um pathogene *Y. enterocolitica* im Schweinefleisch nachzuweisen. Mittels Real-Time PCR Screening gelang der molekularbiologische Nachweis des *ail*-Gens in 17 der 100 untersuchten Proben (17%), wohingegen mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung aus sechs Proben (6%) pathogene *Y. enterocolitica* isoliert werden konnten. Bei den elf weiteren Real-

Time PCR positiven, aber kulturell negativen Proben, waren die pathogenen *Y. enterocolitica* vermutlich in einer so geringen Keimzahl vorhanden, dass sie mittels der Kolonie-DNA-Hybridisierung als kulturelles Verfahren nicht nachgewiesen werden konnten.

Bereits in früheren Untersuchungen konnte eine höhere Sensitivität der Real-Time PCR gegenüber den kulturellen Nachweisverfahren festgestellt werden. GRÖTZBACH (2007) detektierte das *ail*-Gen mittels Real-Time PCR in 9,3% der untersuchten rohen Schweinefleischproben, während die Isolierung mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung bei keiner der Proben positiv verlief. Ebenfalls in rohem Schweinefleisch verlief der Nachweis des *ail*-Gens bei FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2006b) und HARTMANN (2007) bei 7% bzw. 12% der Proben positiv, der kulturelle Nachweis hingegen verlief bei beiden Untersuchungen negativ. BOYAPALLE et al. (2001) ermittelten in rohem Schweinehackfleisch mit der Real-Time PCR eine Nachweisrate von 38% und für das kulturelle Verfahren eine Nachweisrate von 0%. In dieser Studie konnte außerdem mit künstlich kontaminierten Hackfleischproben gezeigt werden, dass die TaqMan Real-Time PCR 10 000 mal sensitiver als das kulturelle Verfahren ist. In Rinderhackfleisch konnten VISHNUBHATLA et al. (2001) in 31% der untersuchten Proben das *yst*-Gen nachweisen, während der kulturelle Nachweis lediglich bei 23% der Proben positiv verlief. Auch in Tofu konnten VISHNUBHATLA et al. (2001) in 12% der untersuchten Proben pathogene *Y. enterocolitica* nachweisen; die Isolierung der Erreger gelang allerdings aus keiner der Proben. Unabhängig von der Art der eingesetzten Lebensmittel sowie den kulturellen Nachweismethoden konnte bei diesen Untersuchungen höhere Nachweisraten mittels Real-Time PCR erzielt werden. Die in den eigenen Untersuchungen ermittelte höhere Sensitivität der Real-Time PCR gegenüber der Kolonie-DNA-Hybridisierung korreliert daher mit diesen Ergebnissen. Die höhere Sensitivität wird zudem durch die in der In house-Validierung ermittelte niedrigere Nachweishgrenze der Real-Time PCR gegenüber der Kolonie-DNA-Hybridisierung sowie durch die Ergebnisse des Verfahrensvergleichs bestätigt. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass bei diesen elf Real-Time PCR positiven, aber kulturell negativen Proben, lediglich die DNA von toten oder nicht kultivierbaren Keimen detektiert wurde. Durch die vorausgehende 48-stündige Anreicherung in ITC-Bouillon bei +25 °C ist dies jedoch wenig wahrscheinlich.

Durch die eigene ermittelte hohe kulturelle Nachweisrate der Kolonie-DNA-Hybridisierung von 6% im Vergleich zu anderen Studien, hat sich diese in den eigenen Untersuchungen als ein zuverlässiges, alternatives Verfahren zur kulturellen Isolierung der pathogenen *Y. enterocolitica* aus Schweinefleisch dargestellt.

ZUSAMMENFASSUNG

Pathogene *Y. enterocolitica* verursachen beim Menschen akute gastrointestinale Infektionen, die überwiegend oral-alimentär über kontaminierte Lebensmittel, insbesondere über Schweinefleisch erworben werden. Der Nachweis der pathogenen *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln ist mit klassischen kulturellen Nachweisverfahren aufgrund der geringen Sensitivität sowie dem hohen Arbeits- und Zeitaufwand nur selten erfolgreich. Dagegen ist der Nachweis mittels Real-Time PCR mit einem deutlich geringeren Zeitaufwand sowie mit einer höheren Sensitivität verbunden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein kombiniertes Verfahren bestehend aus Real-Time PCR und Kolonie-DNA-Hybridisierung etabliert, um in der amtlichen Lebensmittelüberwachung über ein zuverlässiges Verfahren zum Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* in Schweinefleisch zu verfügen.

In Vorversuchen erfolgte zunächst die Optimierung der Real-Time PCR und der Kolonie-DNA-Hybridisierung sowie die Konstruktion einer internen Amplifikationskontrolle für die Real-Time PCR. Anschließend wurde zur näheren Charakterisierung des Verfahrens eine In house-Validierung durchgeführt. Bei der Überprüfung der Inklusivität der Real-Time PCR mittels Reinkulturen konnte das *ail*-Gen ab einem Keimgehalt von circa 10^3 KbE/ml detektiert werden. Bei der Überprüfung der Inklusivität der Kolonie-DNA-Hybridisierung wurde das *ail*-Gen ebenfalls mit Hilfe des positiven Hybridisierungssignals nachgewiesen. Die Überprüfung der Exklusivität erfolgte anhand von Reinkulturen von 32 Nicht-Zielkeimen. Die Zielsequenz konnte weder bei der Real-Time PCR noch bei der Kolonie-DNA-Hybridisierung detektiert werden. Bei der Bestimmung der Nachweisgrenze aus Hackfleisch konnte diese für die Real-Time PCR bei 10^1 KbE/10 g und für die Kolonie-DNA-Hybridisierung bei 10^2 KbE/10 g ermittelt werden.

Zur Durchführung der Verfahrensvergleichsuntersuchung wurde Hackfleisch mit verschiedenen Keimgehalten des Zielkeims beimpft. Bezogen auf die inokulierten Proben konnten für die Real-Time PCR und die Kolonie-DNA-Hybridisierung Sensitivitäten von 100% bzw. 69% erzielt werden. Beim kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008), das als Referenzmethode zur Durchführung der Verfahrensvergleichsuntersuchung ausgewählt wurde, konnte ebenfalls eine Sensitivität von 69% ermittelt werden. Beim direkten Vergleich der Kolonie-DNA-Hybridisierung - mit dem kulturellen Verfahren nach KNÖDL (2008) als Referenzmethode - konnte eine relative Sensitivität von 91% sowie eine wahre relative Spezifität von 100% erzielt werden.

Abschließend erfolgte die Untersuchung von 100 rohen Schweinefleischproben auf das Vorkommen von pathogenen *Y. enterocolitica*. Mittels Real-Time PCR konnten in insgesamt

17 Proben (17%) pathogene *Y. enterocolitica* detektiert werden. Das *ail*-Gen wurde in fünf Proben Hackfleisch, elf Proben Zungen und in einer Probe Niere nachgewiesen. Aus einer Probe Hackfleisch, vier Proben Zungen und einer Probe Niere - der insgesamt 17 Real-Time PCR positiven Proben (35%) - wurden die Zielkeime im Anschluss mit Hilfe der Kolonie-DNA-Hybridisierung isoliert. Die isolierten Stämme konnten alle dem pathogenen Bioserotyp 4/O:3 zugeordnet werden. Bezogen auf die Gesamtanzahl der Proben konnten somit aus 6% der untersuchten Proben pathogene *Y. enterocolitica* isoliert werden.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigen, dass die eigens entwickelte Real-Time PCR Methode eine schnelle und sehr sensitive Methode zur Detektion von pathogenen *Y. enterocolitica* in Schweinefleisch darstellt. Durch die ermittelte höhere Sensitivität der Real-Time PCR - im Vergleich zur Kolonie-DNA-Hybridisierung - ist sie geeignet, als Screening-Methode eingesetzt zu werden. Bereits am Tag 3 der Untersuchung ist eine Aussage über die An- oder Abwesenheit der pathogenen Keime möglich. Darüber hinaus hat sich die Kolonie-DNA-Hybridisierung in den eigenen Untersuchungen als eine zuverlässige, alternative Methode zur kulturellen Isolierung der pathogenen Zielkeime aus Schweinefleisch erwiesen. Sie ermöglicht die kulturelle Isolierung der Zielkeime mit einem geringeren zeitlichen Aufwand im Vergleich zu den klassischen kulturellen Nachweisverfahren. Des Weiteren ist durch den Einsatz der *ail*-spezifischen Hybridisierungssonde eine direkte Unterscheidung zwischen pathogenen und apathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen möglich. Real-Time PCR positive Ergebnisse können mit Hilfe der Kolonie-DNA-Hybridisierung bereits am Tag 6 der Untersuchung vollständig isoliert vorliegen.

SUMMARY

Development of a combined real-time PCR and DNA colony hybridization method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pork

Pathogenic *Y. enterocolitica* causes in humans acute gastrointestinal infections which are mainly acquired orally by contaminated foods, especially by pork. The detection of pathogenic *Y. enterocolitica* in food by traditional culture methods is rarely successful, because of their low sensitivity and the fact that they are very labour-intensive and time-consuming. In contrast, detection by real-time PCR is definitely less time-consuming and much more sensitive. Therefore a combined real-time PCR and DNA colony hybridization method for routine use in official food control was established in this study to apply on a reliable method for detection of pathogenic *Y. enterocolitica* in pork.

Preliminary tests concentrated on the optimization of the real-time PCR and DNA colony hybridization and the construction of an internal amplification control for the real-time PCR. After this an in house-validation was made for further characterization of the method. When the inclusivity of the real-time PCR was tested the *ail*-Gen was detected at 10^3 cfu/ml in pure culture of the target strain. Testing the inclusivity of the DNA colony hybridization the *ail*-Gen was also detected by a positive hybridization signal. For exclusivity, 32 non-target microorganisms were tested. All real-time PCR and DNA colony hybridization results were negative showing an exclusivity of 100% for both methods. For raw minced meat, the detection limit of 10^1 cfu/10 g by real-time PCR and 10^2 cfu/10 g by DNA colony hybridization was determined.

For method comparison raw minced meat was inoculated with different amounts of the target strain. Real-time PCR and DNA colony hybridization revealed a sensitivity of 100% and respectively 69%. The sensitivity of the reference method, the cultural method by KNÖDL (2008), was as well 69%. When the DNA colony hybridization was compared with the cultural method by KNÖDL (2008) as the reference method, a relative sensitivity of 91% and a true relative specificity of 100% was obtained.

Finally, 100 raw pork samples were analyzed with the combined method for the occurrence of pathogenic *Y. enterocolitica*. By real-time PCR the pathogenic *Y. enterocolitica* could be detected in 17 (17%) samples. The *ail*-Gen was detected in five samples of raw minced pork, in eleven samples of tongues and in one kidney sample. Afterwards, pathogenic *Y. enterocolitica* was isolated from 6 (35%) out of 17 real-time PCR positive samples by DNA

colony hybridization. This pathogen was isolated from one raw minced pork, four tongues and one kidney. All six strains were belonging to bioserotyp 4/O:3. Based on the total samples pathogenic *Y. enterocolitica* could be isolated by DNA colony hybridization from 6% of the examined samples.

The results of this study shows that the developed real-time PCR is a fast and very sensitive method for the detection of pathogenic *Y. enterocolitica* in pork. Because of the higher sensitivity of the real-time PCR in comparison to the DNA colony hybridization, real-time PCR is a suitable screening method before DNA colony hybridization. An information about the presence or absence of the pathogenic microorganisms is already possible on the third day of analysis. Moreover, DNA colony hybridization was shown to be an alternative, reliable method for the isolation of pathogenic microorganisms from pork. In comparison to traditional culture methods, it enables the isolation of the target-microorganisms more rapidly. Furthermore, the probe based on nucleotide sequences from the *ail*-Gen permits the discrimination of pathogenic and apathogenic *Y. enterocolitica* strains. Real-time PCR positive results can already be confirmed on the sixth day of analysis by DNA colony hybridization.

ANHANG

17 Tabellarische Übersicht der untersuchten Proben

Tabelle 57: Tabellarische Übersicht der untersuchten Proben

Proben Nr.	Produkt	Offene Ware	Fertigpackung	Probeneingang	Real-Time PCR		Kolonie-DNA-Hybridisierung	Real-Time PCR der Kolonien	Urease-Test	Biotypisierung	API® 20E- Profil	Serotypisierung
					Ergebnis	C _t -Wert						
HACKFLEISCH												
1	Hackfleisch		x	30.05.2007	+	37,5	-					
3	Hackfleisch	x		06.06.2007	-							
6	Hackfleisch	x		14.06.2007	-							
7	Hackfleisch	x		26.06.2007	-							
8	Hackfleisch	x		26.06.2007	+	36,6	-					
9	Hackfleisch		x	27.06.2007	-							
10	Hackfleisch	x		03.07.2007	-							
11	Hackfleisch		x	05.07.2007	-							
12	Hackfleisch	x		04.07.2007	-							
13	Hackfleisch		x	10.07.2007	-							
26	Hackfleisch		x	20.09.2007	-							
36	Hackfleisch	x		25.10.2007	-							
41	Hackfleisch	x		28.11.2007	-							
43	Hackfleisch	x		10.12.2007	-							
70	Hackfleisch		x	14.04.2008	-							
71	Hackfleisch	x		15.04.2008	-							
73	Hackfleisch	x		17.04.2008	-							
74	Hackfleisch		x	17.04.2008	-							
75	Hackfleisch		x	17.04.2008	-							
76	Hackfleisch		x	17.04.2008	-							
78	Hackfleisch	x		22.04.2008	-							
79	Hackfleisch	x		22.04.2008	-							
80	Hackfleisch	x		22.04.2008	-							
81	Hackfleisch		x	23.04.2008	-							
82	Hackfleisch	x		23.04.2008	-							
83	Hackfleisch	x		24.04.2008	-							
84	Hackfleisch		x	30.04.2008	+	37,3	-					
85	Hackfleisch		x	30.04.2008	-							
86	Hackfleisch		x	07.05.2008	-							
87	Hackfleisch		x	07.05.2008	-							
88	Hackfleisch	x		08.05.2008	-							
91	Hackfleisch	x		14.05.2008	-							
92	Hackfleisch		x	20.05.2008	-							
96	Hackfleisch		x	21.05.2008	+	38,2	+	+	+	4	1015522	O:3
97	Hackfleisch	x		21.05.2008	+	37,5	-					
Gesamt: 35												

Proben Nr.	Produkt	Offene Ware	Fertigpackung	Probeneingang	Real-Time PCR		Kolonie-DNA-Hybridisierung	Real-Time PCR der Kolonien	Urease-Test	Biotypisierung	API® 20E- Profil	Serotypisierung
					Ergebnis	C _t -Wert						

FLEISCH

14	Rücken	x		21.08.2007	-							
15	Steak		x	01.08.2007	-							
16	Schnitzel	x		01.08.2007	-							
17	Schnitzel	x		02.08.2007	-							
19	Hals	x		06.09.2007	-							
20	Stielkotelett		x	06.09.2007	-							
22	Gulasch	x		18.09.2007	-							
23	Schinkengulasch		x	18.09.2007	-							
24	Schnitzel	x		19.09.2007	-							
25	Gulasch	x		19.09.2007	-							
27	Schinkengulasch		x	02.10.2007	-							
29	Gulasch		x	18.10.2007	-							
30	Schnitzel		x	24.10.2007	-							
31	Gulasch		x	23.10.2007	-							
32	Schnitzel	x		23.10.2007	-							
34	Schnitzel	x		17.10.2007	-							
37	Schinkenfleisch	x		25.10.2007	-							
38	Schweinefuß	x		29.10.2007	-							
40	Gulasch	x		08.11.2007	-							
44	Gulasch	x		24.09.2007	-							
93	Gulasch, gewürzt	x		20.05.2008	-							
94	Gulasch	x		20.05.2008	-							
95	Schinkengulasch		x	20.05.2008	-							
98	Gulasch	x		27.05.2008	-							
99	Gulasch		x	27.05.2008	-							
100	Gulasch	x		28.05.2008	-							
101	Gulasch		x	29.05.2008	-							
102	Gulasch		x	29.05.2008	-							
103	Schinkengulasch		x	29.05.2008	-							
104	Schinkengulasch	x		04.06.2008	-							
105	Schinkengulasch	x		04.06.2008	-							
106	Gulasch	x		24.06.2008	-							
Gesamt: 32												

Proben Nr.	Produkt	Offene Ware	Fertigpackung	Probeneingang	Real-Time PCR		Kolonie-DNA-Hybridisierung	Real-Time PCR der Kolonien	Urease-Test	Biotypisierung	API® 20E- Profil	Serotypisierung
					Ergebnis	C _t -Wert						
ZUNGEN												
45	Zunge	x		14.04.2008	+	36,4	-					
46	Zunge	x		14.04.2008	+	38,2	-					
47	Zunge	x		14.04.2008	-							
48	Zunge	x		14.04.2008	+	31,8	-					
49	Zunge	x		14.04.2008	-							
50	Zunge	x		14.04.2008	-							
51	Zunge	x		14.04.2008	-							
52	Zunge	x		14.04.2008	-							
53	Zunge	x		14.04.2008	-							
54	Zunge	x		14.04.2008	-							
55	Zunge	x		14.04.2008	+	38	-					
56	Zunge	x		14.04.2008	+	31,1	-					
57	Zunge	x		14.04.2008	+	28,9	+	+	+	4	1015522	O:3
58	Zunge	x		14.04.2008	+	34	-					
59	Zunge	x		14.04.2008	-							
60	Zunge	x		14.04.2008	-							
61	Zunge	x		14.04.2008	-							
62	Zunge	x		14.04.2008	+	32,4	+	+	+	4	1015523	O:3
63	Zunge	x		14.04.2008	-							
64	Zunge	x		14.04.2008	-							
65	Zunge	x		14.04.2008	+	36,6	+	+	+	4	1015522	O:3
66	Zunge	x		14.04.2008	-							
67	Zunge	x		14.04.2008	+	26	+	+	+	4	1015522	O:3
68	Zunge	x		14.04.2008	+	37,5	-					
69	Zunge	x		14.04.2008	-							
Gesamt: 25												
INNEREIEN												
5	Leber	x		12.06.2007	-							
35	Leber	x		17.10.2007	-							
39	Leber	x		08.11.2007	-							
28	Niere	x		16.10.2007	-							
107	Niere	x		04.06.2008	+	37,2	+	+	+	4	1015522	O:3
108	Niere	x		05.06.2008	-							
109	Niere	x		10.06.2008	-							
110	Niere	x		24.06.2008	-							
Gesamt: 8												
Gesamt: 100					Real-Time PCR positiv		Kulturell positiv (mit Kolonie-DNA-Hybridisierung)					
					17		6					

18 Mikroorganismenstämme

DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN (DSM)

GmbH:

<i>Bacillus cereus</i>	DSM Nr. 345
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM Nr. 347
<i>Candida albicans</i>	DSM Nr. 1386
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM Nr. 30039
<i>Citrobacter koseri</i>	DSM Nr. 4596
<i>Clostridium perfringens</i>	DSM Nr. 756
<i>Enterobacter cloacae subs. cloacae</i>	DSM Nr. 30054
<i>Enterobacter pyrinus</i>	DSM Nr. 12410
<i>Enterobacter sakazakii</i>	DSM Nr. 4485
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM Nr. 20409
<i>Escherichia coli</i>	DSM Nr. 1103
<i>Escherichia coli</i>	DSM Nr. 30083
<i>Geotrichum candidum</i>	DSM Nr. 1240
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM Nr. 1268
<i>Listeria monocytogenes</i>	DSM Nr. 12464
<i>Micrococcus luteus</i>	DSM Nr. 348
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM Nr. 30118
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM Nr. 1117
<i>Salmonella choleraesuis</i>	DSM Nr. 5569
<i>Shigella sonnei</i>	DSM Nr. 5570
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM Nr. 1104
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM Nr. 11502

OXOID GmbH:

<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 non toxigenic strain	NCTC 12900

LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN, Institut für Hygiene und

Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs:

<i>Yersinia enterocolitica</i>	Isolat 1M32
<i>Yersinia frederiksenii</i>	Isolat 5M30
<i>Yersinia intermedia</i>	Isolat 5M25
<i>Yersinia kristensenii</i>	Isolat 2M25

Andere Herkunft:

<i>Escherichia coli</i>	C600 (RKI, Wernigerode)
<i>Escherichia coli</i>	05-01435 (RKI, Wernigerode)
<i>Salmonella Saint-paul</i>	Nr. 31 (CVUA KA, Laboreigener Stamm)
<i>Vibrio cholerae</i>	101345/00 (LUA, Bremerhaven)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	101349/00 (LUA, Bremerhaven)

19 Nährmedien

19.1 Flüssige Medien

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (CASO)

HEIPHA DR. MÜLLER GmbH, D-69214 Eppelheim, Nr. 502100

IrgasanTM-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Bouillon (ITC)**Zusammensetzung:**Basisnährmedium:

Trypton, OXOID, Nr. LP0042	10 g
Hefe Extrakt, OXOID, Nr. L21	1 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O, MERCK, Nr. 105833	60 g
NaCl, MERCK, Nr. 106404	5 g
KClO ₃ , MERCK, Nr. 104944	1 g
Malachitgrün (0,2%ige wässrige Lösung), MERCK, Nr. 101398	5 ml

Supplemente:

Ticarcillin-Lösung 0,1% (siehe Rezept Ticarcillin-Lösung)

Irgasan-Lösung 0,1% (siehe Rezept Irgasan-Lösung)

Herstellung:

- Substanzen abwiegen und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen, mischen und gegebenenfalls unter Erwärmen im Wasserbad lösen
- pH-Wert einstellen: $7,3 \pm 0,2$
- abfüllen à 10 ml in Reagenzglasröhrchen
- autoklavieren: 15 min/+121 °C
- pH-Wert kontrollieren: $7,3 \pm 0,2$ (bei circa +25 °C)
- haltbar 4 Wochen
- vor Gebrauch: Sterile Zugabe von jeweils 10 µl der Supplement-Lösungen zu jedem Reagenzglas

Supplement 1 für ITC-Bouillon: Ticarcillin-Lösung 0,1%**Zusammensetzung:**

Ticarcillin Disodium, DUCHEFA, Nr. T 0180

Herstellung:

- 10 mg Ticarcillin Disodium in 10 ml sterilem destilliertem Wasser lösen und sterilfiltrieren
- haltbar 4 Wochen

Supplement 2 für ITC-Bouillon: Irgasan-Lösung 0,1%**Zusammensetzung:**

Irgasan DP 300, CIBA

Ethanol absolut (vergällt), MERCK, Nr. 100974

Herstellung:

- 10 mg Irgasan DP 300 in 10 ml Ethanol in einem sterilen Röhrchen lösen
- haltbar 4 Wochen

Medium für die Kohlenhydratfermentation**Zusammensetzung:****Basisnährmedium:**

Peptonwasser gepuffert, MERCK, Nr. 107228	10 g
Natriumchlorid, MERCK, Nr. 106404	5 g
Phenolrot, SIGMA, Nr. P-4133	0,02 g

Supplemente:

Jeweilige Kohlenhydrat-Lösung (siehe Rezept Trehalose-, Xylose-, Salicin-Lösung)

Hilfsmittel:

Rote, blaue, silberne Metallkappen

Herstellung:

- Substanzen abwiegen und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen, mischen und gegebenenfalls unter Erwärmen im Wasserbad lösen
- pH-Wert einstellen: $6,8 \pm 0,2$ (bei circa $+25\text{ °C}$)
- in Reagenzglasröhrchen à 5 ml abfüllen, für KOFER-Xylose rote Metallkappen, für KOFER-Trehalose blaue Metallkappen, für KOFER-Salicin silberne Metallkappen verwenden
- autoklavieren: 15 min/ $+121\text{ °C}$
- sterile Zugabe von jeweils 500 µl der Trehalose- oder Xylose-Lösung, oder 1ml der Salicin-Lösung zu den jeweiligen Reagenzgläsern
- haltbar 4 Wochen bei $+4\text{ °C}$

Supplement 1 für die Kohlenhydratfermentation: Xylose-Lösung 10%ig**Zusammensetzung:**

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

Herstellung:

- 10 g Xylose in 100 ml sterilem destilliertem Wasser lösen und steril filtrieren
- haltbar 4 Wochen

Supplement 2 für die Kohlenhydratfermentation: Trehalose-Lösung 10%ig**Zusammensetzung:**

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

Herstellung:

- 10 g Trehalose in 100 ml sterilem destilliertem Wasser lösen und steril filtrieren
- haltbar 4 Wochen

Supplement 3 für die Kohlenhydratfermentation: Salicin-Lösung 5%ig**Zusammensetzung:**

Salicin, SIGMA, Nr. S-0625-25G

Herstellung:

- 10 g Salicin in 200 ml sterilem destilliertem Wasser lösen und steril filtrieren
- haltbar 4 Wochen

19.2 Feste Medien

Äsculin-Agar**Zusammensetzung:**

Nutrient Agar Bacto[®], DIFCO, Nr. 2130000

Äsculin, MERCK, Nr. 1.00842.0025

Herstellung:

- 40 g Nutrient Agar Bacto[®] und 1 g Äsculin mischen und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen, unter Erhitzen auflösen
- autoklavieren: 15 min/+121 °C
- mit +60 °C abfüllen
- steril Platten gießen (15 ml)
- pH-Wert kontrollieren: Soll $6,8 \pm 0,2$ (bei circa +25 °C)
- haltbar 4 Wochen

Casein-Soja-Agar (CASO)

CASO-Agar, HEIPHA DR. MÜLLER GmbH, D-69214 Eppelheim, Nr. 307e

CIN-Agar

Yersinia Agar (CIN), HEIPHA DR. MÜLLER GmbH, D-69214 Eppelheim, Nr. 395e

Columbia-Blutagar

Columbia-Blutagar, HEIPHA DR. MÜLLER GmbH, D-69214 Eppelheim, Nr. 109e

Harnstoffagar nach Christensen

Harnstoffagar nach Christensen (6 ml), HEIPHA DR. MÜLLER GmbH, D-69214 Eppelheim, Nr. 398r

Plate-Count-Agar (PC)

Plate-Count-Agar, HEIPHA DR. MÜLLER GmbH, D-69214 Eppelheim, Nr. 306e

Pyrazinamidase-Agar**Zusammensetzung:**

CASO-Agar, MERCK, Nr. 105458	30 g
Pyrazinamid, SIGMA, Nr. P-7136	1 g
Tris-Hydrochlorid, SIGMA, Nr. T-3253	31,5 g

Herstellung:

- mischen der Komponenten mit 800 ml destilliertem Wasser
- auffüllen mit destilliertem Wasser auf 1000 ml
- abfüllen zu je 5 ml in Reagenzglasröhrchen
- autoklavieren: 15 min/+121 °C
- pH-Wert kontrollieren: Soll: 6,0 ± 0,2 (bei circa +25 °C)
- abkühlen in schräger Position
- haltbar 4 Wochen

Indikator für Pyrazinamidase-Agar: Ammoniumferrosulfat-Lösung**Zusammensetzung:**

Ammonium-Eisen-II-Sulfat Hexahydrat, MERCK, Nr. 103792

Herstellung:

- 1 g Ammonium-Eisen-II-Sulfat Hexahydrat mit sterilem destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen und lösen
- die Lösung muss nicht sterilisiert werden
- es dürfen nur frisch angesetzte Lösungen (keine Trübung oder Ausfällung) benutzt werden

Tween-Esterase-Agar**Zusammensetzung:**

Nutrient Agar Bacto, DIFCO, Nr. 2130000

Tween 80 zur Synthese, MERCK, Nr. 822187

Herstellung:

- 14 g Nutrient Agar Bacto mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen und unter Erhitzen auflösen
- Zugabe von 5 ml Tween 80 und erneut für 5 min erhitzen
- autoklavieren: 15 min/+121 °C
- steril Platten gießen (15 ml)
- pH-Wert überprüfen: Soll $6,8 \pm 0,2$ (bei circa +25 °C)
- haltbar 4 Wochen

Yeast Glucose Chloramphenicol Agar (YGC)

Yeast Glucose Chloramphenicol Agar, HEIPHA DR. MÜLLER GmbH, D-69214 Eppelheim, Nr. 545200

20 Reagenzien und Chemikalien

20.1 Allgemein

API® 20E

System zur Identifizierung von *Enterobacteriaceae* und anderen gramnegativen, nicht anspruchsvollen Stäbchen

BIOMÉRIEUX®, Nr. 20100

Zusätzlich benötigte Reagenzien:

TDA Reagenz, BIOMÉRIEUX® Nr. 70402

JAMES Reagenz, BIOMÉRIEUX® Nr. 70542

VP1 + VP2 Kit, BIOMÉRIEUX® Nr. 70422

Paraffinöl, BIOMÉRIEUX® Nr. 70100

NaCl-Pepton-Lösung 0,85% (Verdünnungslösung)

Zusammensetzung:

Casein-Pepton, trypt. Verdaut, MERCK, Nr. 1.07213.1000 8,5 g

Natriumchlorid, MERCK, Nr. 1.06404.1000 1 g

Herstellung:

- die Bestandteile in 1000 ml destilliertem Wasser suspendieren
- pH-Wert einstellen: $6,5 \pm 0,2$ (bei circa $+25\text{ °C}$)
- abfüllen in Reagenzglasröhrchen á 9,2 ml (oder ggf. 5 l in großer Schottflasche)
- autoklavieren: 15 min/ $+121\text{ °C}$
- pH-Wert kontrollieren: 7,0 (Schwankungsbreite: 6,8-7,6; bei circa $+25\text{ °C}$)
- haltbar 4 Wochen

Serotypisierung

Monospezifische Testseren „Anti-*Yersinia enterocolitica*“

Anti-*Yersinia enterocolitica* O:3, 1 ml, lyophilisiert SIFIN, Nr. TS 1701

Anti-*Yersinia enterocolitica* O:5, 1 ml, lyophilisiert SIFIN, Nr. TS 1704

Anti-*Yersinia enterocolitica* O:8, 1 ml, lyophilisiert SIFIN, Nr. TS 1705

Anti-*Yersinia enterocolitica* O:9, 1 ml, lyophilisiert SIFIN, Nr. TS 1703

Anti-*Yersinia enterocolitica* O:27, 1 ml, lyophilisiert SIFIN, Nr. TS 1706

20.2 Real-Time PCR

Absolute QPCR Rox Mix

AB GENE, Nr. AB-1138/a

DNeasy® Blood & Tissue Kit

QIAGEN, Nr. 69506

Ethanol

MERCK, Nr. 1.00983.2500

InstaGene™ Matrix

BIORAD, Nr. 7326030

QIAquick PCR Purification Kit

QIAGEN, Nr. 28104

QuantiFast Probe PCR Kit

QIAGEN, Nr. 204254

QuantiTect Probe PCR Kit

QIAGEN, Nr. 204343

Power SYBR Green Master Mix

APPLIED BIOSYSTEMS, Nr. 4367659

Primer RT-ail 1

Sequenz: 5' GGT CAT GGT GAT GTT GAT TAC TAT TCA 3'

APARA BIOSCIENCE, D-79211 Denzlingen

Primer RT-ail 2

Sequenz: 5' CGG CCC CCA GTA ATA CCA TA 3'

APARA BIOSCIENCE, D-79211 Denzlingen

RT-ail-Sonde

Sequenz: 5' CCA TCT TTC CGC ATC AAC GAA TAT GTT AGC 3'

markiert am 5' Ende mit 6-FAM, am 3' Ende mit TAMRA

APARA BIOSCIENCE, D-79211 Denzlingen

Primer RT-ail-pUC19-1

Sequenz: 5' GGT CAT GGT GAT GTT GAT TAC TAT TCA ACC ATA TGC GGT GTG AA 3'

MWG BIOTECH AG, D-85560 Ebersberg

Primer RT-ail-pUC19-2

Sequenz: 5' CGG CCC CCA GTA ATA CCA TAA TTC ACT GGC CGT CGT T 3'

MWG BIOTECH AG, D-85560 Ebersberg

pUC19-Sonde

Sequenz: 5' GGA TGT GCT GCA AGG CGA TTA AGT TGG GTA ACG 3'

markiert am 5' Ende mit JOE, am 3' Ende mit TAMRA

MWG BIOTECH AG, D-85560 Ebersberg

pUC 19-Vector

NEW ENGLAND BIOLABS, Nr. N3041S

TaqMan Universal PCR Master Mix

APPLIED BIOSYSTEMS, Nr. 4304437

20.3 Kolonie-DNA-Hybridisierung

Denaturierungslösung**Zusammensetzung:**

Natriumhydroxidplättchen 0,5 mol/l (1 M 40 g/mol) MERCK, Nr. 106498	20 g/l Aqua dest.
Natriumchlorid 1,5 mol/l (1 M 58,44 g/mol) MERCK, Nr. 106404	87,66 g/l Aqua dest.

Herstellung:

- die Bestandteile in 1000 ml destilliertem Wasser suspendieren
- abfüllen in Schottflaschen
- bei Raumtemperatur aufbewahren

Neutralisierungslösung**Zusammensetzung:**

TRIS 1,0 mol/l (1 M 121,14 g/mol) Trishydroxymethylaminomethane FLUKA, Nr. 93362	121,14 g/l Aqua dest.
Natriumchlorid 1,5 mol/l (1 M 58,44 g/mol) MERCK, Nr. 106404	87,66 g/l Aqua dest.

Herstellung:

- die Bestandteile in 1000 ml destilliertem Wasser suspendieren
- abfüllen in Schottflaschen
- bei Raumtemperatur aufbewahren
- pH-Wert einstellen: 7,5 (bei +21 °C)

Äquibrierungslösung 20fach konzentriert (20xSSC)**Zusammensetzung:**

Natriumchlorid 3,0 mol/l (1 M 58,44 g/mol) MERCK, Nr. 106404	175,32 g/l Aqua dest.
Natriumcitrat 0,3 mol/l (1 M 214,11 g/mol) FLUKA, Nr. 71498	64,233 g/l Aqua dest.

Herstellung:

- die Bestandteile in 1000 ml destilliertem Wasser suspendieren
- abfüllen in Schottflaschen
- bei Raumtemperatur aufbewahren
- pH-Wert einstellen: 7,0
- Herstellung der 2xSSC Lösung: Verdünnung 1:10
100 ml 20xSSC
900 ml Aqua dest.
- Herstellung der 0,5xSSC Lösung: Verdünnung 1:40
25 ml 20xSSC
975 ml Aqua dest.

Waschlösung 1: 2xSSC/0,1% SDS (low stringency buffer)**Zusammensetzung:**

SDS 1 g/l
Sodium dodecyl sulfate
FLUKA, Nr. 71725

2xSSC Lösung
siehe Äquibrierungslösung

Herstellung:

- 1g SDS in 1000 ml 2xSSC suspendieren
- abfüllen in Schottflaschen
- bei Raumtemperatur aufbewahren

Waschlösung 2: 0,5xSSC/0,1% SDS (high stringency buffer)**Zusammensetzung:**

SDS 1 g/l

Sodium dodecyl sulfate

FLUKA, Nr. 71725

0,5xSSC Lösung

siehe Äquilibrierungslösung

Herstellung:

- 1g SDS in 1000ml 0,5xSSC suspendieren
- abfüllen in Schottflaschen
- bei Raumtemperatur aufbewahren

DIG Easy Hyb, Hybridisierungslösung

ROCHE DIAGNOSTICS, Nr. 11603 558001

DIG Wash and Block Buffer Set

ROCHE DIAGNOCTICS, Nr. 11585762001

Beinhaltet:**Flasche Nr. 1 Washing Buffer (10x) (Waschpuffer)**

mit Aqua dest. 1:10 verdünnen, nach Anbruch bei +4 °C lagern

Zweck: abwaschen von unspezifisch gebundenen Antikörpern

Flasche Nr. 2 Maleic acid Buffer (10x) (Maleinsäurepuffer)

mit Aqua dest. 1:10 verdünnen, nach Anbruch bei +4 °C lagern

Zweck: zur Verdünnung der Blocking Solution

Flasche Nr. 3 Blocking Solution (10x) (Blockierungslösung)

immer frisch herstellen!

mit Maleic acid Buffer 1:10 verdünnen, nach Anbruch bei +4 °C lagern

Zweck: zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen

Flasche Nr. 4 Detection Buffer (10x) (Detektionspuffer)

mit Aqua dest. 1:10 verdünnen, nach Anbruch bei +4 °C lagern

Zweck: zum Angleichen des pH-Wertes auf 9,5 für die Substratreaktion

Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, 150 U

ROCHE DIAGNOSTICS, Nr. 11093274910

Herstellung:

Zentrifugation der Antikörperlösung für 5 min bei 10000 rpm, aus dem Überstand die benötigte Menge entnehmen.

Verdünnung 1:5000 mit 1x Blocking Solution (4 µl vom Überstand mit 20 ml Blocking Solution pro Membran), bei +2 bis +8 °C für 12 h haltbar

Zweck: bindet an die mit Digoxigenin markierte Hybridisierungssonde

NBT/BCIP Stock Solution

ROCHE DIAGNOSTICS, Nr. 11681451001

Herstellung:

Pro Membran 80 µl NBT/BCIP Stock Solution zu 4 ml 1x Detection Buffer geben, immer frisch ansetzen! Lichtgeschützt aufbewahren.

Zweck: Visualisierung der Antikörperbindung

Für die Herstellung der mit Digoxigenin markierten Hybridisierungssonde**Biozym LE Agarose**

BIOZYM, Nr. 840004

Bromphenolblau

MERCK, Nr. 1.08122.0005

Digoxigenin-11-dUTP, alkali-stable, 25 nmol

ROCHE DIAGNOSTICS, Nr. 11 093 088 910

dNTP Set, PCR Grade, 4 x 100µl, 100 mM each

QIAGEN, Nr. 201912

Herstellung des dNTP Mixes:

10 µl dATP	10mM
10 µl dCTP	10mM
10 µl dGTP	10mM
6,5 µl dTTP	6,5mM

63,5 µl Wasser

Ethidiumbromid

FLUKA, Nr. 46065

HotStarTag Master Mix Kit

QIAGEN, Nr. 203443

HotStarTaq DNA Polymerase (250U)

QIAGEN, Nr. 203203

QIAquick PCR Purification Kit

QIAGEN, Nr. 28104

Primer *ail 1*

Sequenz: 5'GTT TAT CAA TTG CGT CTG TTA ATG TGT ACG 3'

APARA BIOSCIENCE, D-79211 Denzlingen

Primer *ail 2*

Sequenz: 5'CTA TCG AGT TTG GAG TAT TCA TAT GAA GCG 3'

APARA BIOSCIENCE, D-79211 Denzlingen

TBE-Fertigpuffer (TRIS-Borat-EDTA) 5 x

FLUKA, Nr. 93309

50 Base Pair Ladder

GE HEALTHCARE, Nr. 27-4005-01

100 Base Pair Ladder

GE HEALTHCARE, Nr. 27-4007-01

21 Geräte und Laborbedarf

21.1 Allgemein

Bag Mixer

INTERSCIENCE

Biosphere Micro Tube, 1,5 ml

SARSTEDT, Nr. 7081701

Cryobank

MAST DIAGNOSTICA GmbH, Stammhaltungssystem zur Langzeitlagerung von Mikroorganismen bei -70 °C

Glaswaren

DRIGALSKI-Spatel

Reagenzglasröhrchen mit Metallkappen

Pipetten (Volumina 10 ml und 1 ml)

Demeterpipetten

Petrischalen

Impfösen mit Nadel und Schlinge 1 µl

BRAND, Nr. 425201

Impfösen mit Nadel und Schlinge 10 µl

BRAND, Nr. 452210

Labortischzentrifuge Biofuge pico

HERAEUS INSTRUMENTS

Laborwaage

SARTORIUS BP 2100

Magnetrührer Speedsafe™

HANNA

Mikrotiterplatten

VWR, Nr. 0591/06-25

Nitrilhandschuhe 3000 Blue, M

MEDITRADE, Nr. 1281

Pipetten 5ml, einzeln, steril

BIOMÉRIEUX®, Nr. 70 250

Pipettenspitzen Tip One®

STARLAB

0,5-10 µl Nr. S 1121-4810

1-100 µl Nr. S 1120-1840

101-1000 µl Nr. S 1126-7810

Plastikpetrischalen 92x16 mm

SARSTEDT, Nr. 82 1473

Reax top Vortex

HEIDOLPH

Reference Pipetten

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

Reinraumbank aura PCR

NUNC™

Safe Lock Tubes, PCR clean 2ml

EPPENDORF, Nr. 0030 123.344

Stomacherbeutel mit Filter

TRANSIA, Nr. 85002

Thermomixer comfort

EPPENDORF

Thin-Wall 8-Tube Strip, farblos

BIOZYM, Nr. 712130

Vortex Mixer

NEOLAB®

21.2 Real-Time PCR

Absolute QPCR Seal

ABGENE, Nr. AB-1170

Centrifuge 5804

EPPENDORF

Compression Pad

APPLIED BIOSYSTEMS, Nr. 4312639

QIAcube

QIAGEN

Thermo-Fast 96 Detection Plate

ABGENE, Nr. AB-1100/w

7000 Sequence Detection System

APPLIED BIOSYSTEMS

21.3 Kolonie-DNA-Hybridisierung

Gelelektrophoresesystem Agagel Maxi

Elektrophoresekammer inklusive Zubehör Agagel Maxi, Netzgerät Standard Power Pack P 25, BIOMETRA BIOMEDIZINISCHE ANALYTIK GmbH

GFL Schüttler

Glaspetrischalen

Hybridisierungsflaschen

VWR, Nr. 732-1823

Hybridisierungsöfen

BINDER

MicroAmp[®] Base

APPLIED BIOSYSTEMS, Nr. N8015531

MicroAmp[®] Tray Retainer Assembly

APPLIED BIOSYSTEMS, Nr. N8015530

Nylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization, 82 mm diameter

ROCHE DIAGNOSTICS, Nr. 11 699 075 001

Photometer

PERKIN ELMER MBA 2000

Rundfilter, 12,5 cm

MACHEREY-NAFEL, Nr. MN 615

Thermocycler 2720

APPLIED BIOSYSTEMS

UV/VIS Spectroscopy Cells

PERKIN ELMER

Video-Dokumentationssystem BioDocII

Controller inklusive Folientastatur und Monitor, CCD Kamera Interline transfer, Dunkelhaube

BDR-6, Thermofotodrucker Sony UP-D890

BIOMETRA BIOMEDIZINISCHE ANALYTIK GmbH

Wattestäbchen

HEINZ HERENZ, Nr. REF 1030128

LITERATURVERZEICHNIS

ABDULMAWJOOD, A., ROTH, S., BÜLTE, M. (2002)

Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *Escherichia coli* O157 by polymerase chain reaction
Mol. Cell. Probes, 16: 335-339

ALEKSIĆ, S. und BOCKEMÜHL, J. (1990)

Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen
Immun. Infekt., 18: 178-185

ARCHER, J.R., SCHELL, R.F., PENNELL, D.R., WICK, P.D. (1987)

Identification of *Yersinia* spp. with the API 20E System
J. Clin. Microbiol., 25: 2398-2399

ARNOLD, T. NEUBAUER, H., NIKOLAOU, K., ROESLER, U., 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 Infect. Dis. Vet. Public Health, 51: 23-27

BALLAGI-PORDÁNY A. und BELÁK, S. (1996)

The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR
Mol. Cell. Probes, 10: 159-164

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

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
In: Schrimpf, G., Gentechnische Methoden
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3: 147-168

BHADURI, S., WESLEY, I.V., BUSH, E.J. (2005)

Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains in pigs in the United States
Appl. Environ. Microbiol., 71: 7117-7121

BHAHURI, S. (2006)

Enrichment, isolation, and virulence of freeze-stressed plasmid-bearing virulent strains of *Yersinia enterocolitica* on Pork
J. Food Prot., 69: 1983-1985

BHADURI, S. und WESLEY, I. (2006)

Isolation and Characterization of *Yersinia enterocolitica* from swine feces recovered during the National Animal Health Monitoring System Swine 2000 Study

J. Food Prot., 69: 2107-2112

BIEDZKA-SAREK, M., VENHO, R., SKURNIK, M. (2005)

Role of YadA, Ail and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3

Infect. Immun., 73: 2232-2244

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: 211-214

BLISKA, J.B. und FALKOW, S. (1992)

Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89: 3561-3565

BOCKEMÜHL, J. und ROGGENTIN, P. (2004)

Enterale Yersiniosen. Klinische Bedeutung, Epidemiologie, Diagnostik und Prävention
Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 47: 685-691

BOTTONE, E.J. (1997)

Yersinia enterocolitica: The Charisma Continues

Microbes Infect., 1: 323-333

BOTTONE, E.J. (1999)

Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates

Clin. Microbiol. Rev., 10: 257-276

BOWMAN, A.S., GLENDENING, C., WITTUM, T.E., LEJEUNE, J.T., STICH, R.W.,
FUNK, J.A. (2007)

Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in different phases of production on swine farms

J. Food Prot., 70: 11-16

- BOYAPALLE, S., WESLEY, I.V., HURD, H.S., REDDY, P.G. (2001)
Comparison of culture, multiplex, and 5' nuclease polymerase chain reaction assays for the rapid detection of *Yersinia enterocolitica* in swine and pork products
J. Food Prot., 64: 1352-1361
- BOYCE, J.M., EVANS, D.J.JR., EVANS, D.G., DUPOND, H.L. (1979)
Production of heat-stable, methanol-soluble Enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*
Infect. Immun., 25: 532-537
- BUCHER, M., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., STOLLE, A. (2002)
Vorkommen von Yersinien-Arten in Kälbern und Jungrindern
Fleischwirtsch., 9: 125-127
- BUCHER, M., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., STOLLE, A. (2005a)
Yersinia enterocolitica in der Lebensmittelkette
Teil I: Vorkommen
Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, 3: 161-165
- BUCHER, M., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., STOLLE, A. (2005b)
Yersinia enterocolitica in der Lebensmittelkette
Teil II: Nachweis und Lebensmittelhygienische Aspekte
Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, 4: 234-239
- BUSTIN, S.A. (2005)
Real-Time PCR
Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics, 1117-1125
- CHRISTENSEN, S.G. (1980)
Yersinia enterocolitica in Danish pigs
J. Appl. Bacteriol., 48: 377-382
- CORNELIS, G.R., BOLAND, A., BOYD, A.P., GEUIJEN, C., IRIARTE, M., NEYT, C., SORY, M-P., STAINIER, I. (1998)
The Virulence Plasmid of *Yersinia*, an Antihost Genome
Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62: 1315-1352

DE BOER, E. und SELDAM, W.M. (1987)

Comparison of methods for the isolation of *Yersinia enterocolitica* from porcine tonsils and pork

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

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

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

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

DE BOER, E. (1992)

Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods

Int. J. Food Microbiol., 17: 75-84

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

Contribution of Urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*

Infect. Immun., 63: 3790-3795

DELOR, I. und CORNELIS, G.R. (1992)

Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits

Infect Immun., 60: 4269-4277

DE ZUTTER, L., LE MORT, L., JANSSENS, M., WAUTERS, G. (1994)

Shortcomings of irgasan ticarcillin chlorate broth for the enrichment of *Yersinia enterocolitica* biotype 2, serotype 9 from meat

Int. J. Food Microbiol., 23: 231-237

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

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

Int. J. Food Microbiol., 37: 103-112

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

YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin

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

FALCÃO, J.P., FALCÃO, D.P., PITONTO-SILVA, A., MALASPINA, A.C., BROCCHI, M. (2006)

Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil

J. Med. Microbiol., 55: 1539-1548

FELDSINE P., ABEYTA C., ANDREWS W.H. (2002)

AOAC INTERNATIONAL methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis

J. AOAC Int., 85: 1187-1200

FENG, P., KEASLER, S.P., HILL, W.E. (1992)

Direct identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by polymerase chain reaction amplification

Transfusion, 32: 850-854

FENWICK, S.G. und MURRAY, A. (1991)

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction

Lancet, 337: 496-497

FORSBERG, A., ROSQVIST, R., WOLF-WATZ H. (1994)

Regulation and polarized transfer of the *Yersinia* outer proteins (YOPS) involved in antiphagocytosis

Trends Microbiol., 1: 14-19

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

High Prevalence of yadA-Positive *Yersinia enterocolitica* in pig tongues and minced meat at the Retail Level in Finland

J. Food Prot., 62: 123-127

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., KORTE, T., KORKEALA, H. (2000)

Contamination of carcasses, offals, and the environment with yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in a pig slaughterhouse

J. Food Prot., 63: 31-35

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., KORTE, T., KORKEALA, H. (2001a)

Transmission of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 to pets via contaminated pork
Lett. Appl. Microbiol., 32: 375-378

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., LYHS, U., KORTE, T., KORKEALA, H. (2001b)

Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food samples at retail level in Finland
Arch. Lebensmittelhyg., 52: 66-68

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., BUCHER, M., HANK, C., STOLLE, A., KORKEALA, H. (2001c)

High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O:3 on pig offal in southern Germany: a slaughtering technique problem
Syst. Appl. Microbiol., 24: 457-563

FREDRIKSSON-AHOMAA, M. und KORKEALA, H. (2003)

Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem
Clin. Microbiol. Rev., 16: 220-229

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., KOCH, U., KLEMM, C., BUCHER, M., STOLLE, A. (2004)

Different genotypes of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains widely distributed in butcher shops in the Munich area
Int. J. Food Microbiol., 95: 89-94

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., STOLLE, A., SIITONEN, A., KORKEALA, H. (2006a)

Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O:3 originate mainly from pigs
J. Med. Microbiol., 55: 747-749

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., HARTMANN, B., SCHEU, P., STOLLE, A. (2006b)

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in meat using Real-Time PCR
J. Verbr. Lebensm., 2006: 202-208

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., STOLLE, A., STEPHAN, R. (2007)

Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs at a Swiss abattoir
Int. J. Food Microbiol., 119: 207-212

FUKUSHIMA, H. und GOMYODA, M. (1986)

Groth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* Biotype 3B Serotype O:3 inhibited on Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin Agar

J. Clin. Microbiol., 24: 116-120

FUKUSHIMA, H. (1987)

New selektive agar medium for isolatin of virulent *Yersinia enterocolitica*

J. Clin. Microbiol., 25: 1068-1073

GIBSON, U.E.M., HEID, C.A., WILLIAMS, P.M. (1996)

A novel method for real time quantitative RT-PCR

Genome Res., 6: 995-1001

GOVERDE, L.J., JANSEN, W.H., BRUNINGS, H.A., HUIS IN' T VELD, J.H.J., MOOI, F.R. (1993)

Digoxigenin-labelled *inv*- and *ail*-probes for the detection and identification of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical specimens and naturally contaminated pig samles

J. Appl. Bacteriol., 74: 301-313

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

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

Infect. Immun., 66: 1113-1120

GRÖTZBACH, B. (2007)

Nachweis von pathogener *Yersinia enterocolitica* in Rohfleisch- und Rohfleischerzeugnissen von Rind, Schwein und Geflügel mit modernen molekularbiologischen Methoden

Diss. med. vet., LMU München

HANNA, M.O., STEWART, J.C., ZINK, D.L., CARPENTER, Z.L., VANDERZANT, C. (1977)

Development of *Yersinia enterocolitica* on raw and cooked beef and pork at different temperatures

J. Food Sci., 42: 1180-1184

HARTMANN, B. (2007)

Entwicklung einer Real-Time PCR-Nachweismethode für *Yersinia enterocolitica*
Diss. med. vet., LMU München

HEAD, C.B., WHITTY, D.A., RATNAM, S. (1982)

Comparative study of selective media for recovery of *Yersinia enterocolitica*
J. Clin. Microbiol., 16: 615-621

HEESEMANN, J. (1990)

Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische Methoden
Immun. Infekt., 18: 186-191

HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K.J., WILLIAMS, P.M. (1996)

Real Time Quantitative PCR
Genome Res., 6: 986-994

HEIM, F., FEHLHABER, K., SCHEIBNER, G. (1984)

Untersuchungen über das Verhalten von *Yersinia enterocolitica* bei unterschiedlichen
Temperaturen und verschiedenen Pökelsalzkonzentration
Arch. Exp. Veterinärmed., 38: 729-734

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

HILL, W.E., PAYNE, W.L., ZON, G., MOSELEY, S.L. (1985)

Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes for detecting Heat-Stable Enterotoxin-
Producing *Escherichia coli* by DNA colony Hybridization
Appl. Environ. Microbiol., 50: 1187-1191

HILL, W.E. und KEASLER, S.P. (1991)

Identification of foodborne pathogens by nucleid acid hybridization
Int. J. Food Microbiol., 12: 67-76

HOFF, C., MIKOSCH, T., SERANSKI, P. (2002)

Blottingverfahren und Hybridisierungen

In: Schrimpf, G., Gentechnische Methoden

Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, 3: 223-247

HOORFAR, J., MALORNY, B., ABDULMAWJOOD, A., COOK, N., WAGNER, M.,
FACH, P. (2004)

Practical Considerations in Design of internal controls for diagnostic PCR Assays

Minireview

J. Clin. Microbiol., 42: 1863-1868

HÜBNER, P., GAUTSCH, S., JEMMI, T. (2002)

In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren

Mitt. Lebensm. Hyg., 93:118-139

IBRAHIM, A., LIESACK, W., STACKEBRAND, E. (1992a)

Polymerase Chain Reaction-Gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*

J. Clin. Microbiol., 30: 1942-1947

IBRAHIM, A., LIESACK, W., PIKE, S, STACKEBRANDT, E. (1992b)

The polymerase chain reaction: an epidemiological tool to differentiate between two clusters of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains

FEMS Microbiol. Lett., 76: 63-66

IBRAHIM, A., LIESACK, W., GRIFFITHS, M.W., 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

ICHINONE, H. YOSHIOKA, M., FUKUSHIMA, H., KANEKO, S., MARUYAMA, T. (1991)

First isolation of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 in Japan

J. Clin. Microbiol., 29: 846-847

JACOBSEN, N.R., BOGDANOVICH, T., SKURNIK, M., LÜBECK, P.S., AHRENS, P., HOORFAR, J. (2005)

A real-time PCR assay for the specific identification of serotype O:9 of *Yersinia enterocolitica*

J. Microbiol. Methods, 63: 151-156

JAGOW, J. und HILL, W.E. (1986)

Enumeration by Colony Hybridization of virulent *Yersinia enterocolitica* colonies in artificially contaminated food

Appl. Environ. Microbiol., 51: 441-443

JAGOW, A.J. und HILL, W.E. (1988)

Enumeration of virulent *Yersinia enterocolitica* colonies by DNA colony hybridization using alkaline treatment and paper filters

Mol. Cell. Probes, 2: 189-195

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

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

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

JOHANNESSEN, G.S., LONCAREVIC, S., KRUSE, H. (2002)

Bacteriological analysis of fresh produce in Norway

Int. J. Food Microbiol., 77: 199-204

JOURDAN, A.D., JOHNSON, S.C., WESLEY, I. (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

KANEKO, S., ISHIZAKI, N., KOKUBO, Y. (1995)

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from pork using the Polymerase Chain Reaction

Contrib. Microbiol. Immunol., 13: 153-155

KAPPERUD, G., DOMMARSNES, K., SKURNIK, M., HORNES, E. (1990)

A synthetic oligonucleotide probe and a cloned polynucleotide probe based on the *yopA* gene for detection of virulent *Yersinia enterocolitica*

Appl. Environ. Microbiol., 56: 17-23

KAPPERUD, G. (1991)

Yersinia enterocolitica in food hygiene

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

KAPPERUD, G., VARUND, T., SKJERVE, E., HORNES, E., MICHAELSEN, T.E. (1993)

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested Polymerase Chain Reactions, and colorimetric detection of amplified DNA

Appl. Environ. Microbiol., 59: 2938-2944

KLEER, J. (2004)

Yersinia enterocolitica. In: *Einführung in die Lebensmittelhygiene*, Sinell H.J. (eds.), 4., neu bearbeitete Auflage, Parey Verlag, Stuttgart: 37-40

KNÖDL, C. (2008)

Etablierung und Validierung eines kombinierten Verfahrens aus kulturellen Methoden und der PCR zum Nachweis von pathogenen *Yersinia enterocolitica* in Lebensmitteln

Diss. med. vet., LMU München

KNUTSSON, R., FONTANESI, M., GRAGE, H., RADSTRÖM, P. (2002)

Development of a PCR-compatible enrichment medium for *Yersinia enterocolitica*: amplification precision and dynamic detection range during cultivation

Int. J. Food Microbiol., 72: 185-201

KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJÖBACK, R., SJÖGREEN, B., STRÖMBOM, L., STAHLBERG, A. ZORIC, N. (2006)

The real-time polymerase chain reaction

Mol. Aspects Med., 27: 95-125

KWAGA, J., IVERSEN, J.O., MISRA, V. (1992)

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by Polymerase Chain Reaction and Digoxigenin-Labeled Polynucleotide Probes

J. Clin. Microbiol., 30: 2668-2673

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

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

LINDBLAD, M., LINDMARK, H., THISTED LAMBERTZ, S., LINDQVIST, R. (2006)

Microbiological baseline study of broiler chickens at Swedish Slaughterhouses

J. Food Prot., 69: 2875-2882

LINDQVIST, R., NORLING B., THISTED LAMBERTZ, S. (1997)

A rapid sample preparation method for PCR detection of food pathogens based on buoyant density centrifugation

Lett. Appl. Microbiol., 24: 306-310

LORENZ, M.C., MUIR, R.S., LIM, E., MCELVER, J., WEBER, S.C., HEITMAN, J. (1995)

Gene disruption with PCR products in *Saccharomyces cerevisiae*

Gene, 158: 113-117

LÜBECK, P.S., WOLFFS, P., ON, S.L.W., AHRENS, P., RADSTRÖM, P., HOORFAR, J. (2003)

Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant *Campylobacters*: Assay development and analytical validation

Appl. Environ. Microbiol., 69: 5664-5669

MACKAY, I.M. (2004)

Real-Time PCR in the microbiology laboratory

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

- MÄDE, D., PETERSEN, R., TRÜMPER, K., STARK, R., GROHMANN, L. (2004)
In-house validation of a real-time PCR method for rapid detection of *Salmonella ssp.*
in food products
Eur. Food Res. Technol., 219: 171-177
- MC KILLIP, J. und DRAKE, M. (2004)
Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food
J. Food Prot., 67: 823-832
- MC NALLY, A., CHEASTY, T., DALZIEL, R.W., PAIBA, G.A., MANNING, G.,
NEWELL, D.G. (2004)
Comparison 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
Lett. Appl. Microbiol., 39: 103-108
- MERHEJ, V., ADÉKAMBI, T., PAGNIER, I., RAOULT, D., DRANCOURT, M. (2008)
Yersinia massiliensis sp. nov., isolated from fresh water
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58: 779-784
- MILLER, V.L., FARMER III, J.J., HILL, W.E., FALKOW, S. (1989)
The *ail* Locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* Serotypes commonly
associated with disease
Infect. Immun., 57: 121-131
- MOBLEY, H.L.T., ISLAND, M.D., HAUSINGER, R.P. (1995)
Molecular Biology of Microbial Ureases
Microbiol. Rev., 59: 451-480
- MÜLLER, F.M., SCHNITZLER, N., CLOOT, O., KOCKELKORN, P., HAASE, G.,
LI, Z. (1998)
The rationale and method for constructing internal control DNA used in pertussis
polymerase chain reaction
Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 31: 517-523

- NAKAJIMA, H., ITOH, K., ARAKAWA, E., INOUE, M., MORI, T., 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
- NAKAJIMA, H., ITOH, K., ARAKAWA, E., INOUE, M., MORI, T., WATANABE, H. (1994)
Degradation of a Polymerase Chain Reaction (PCR) Product by Heat-Stable Deoxyribonuclease (DNase) produced from *Yersinia enterocolitica*
Microbiol. Immunol., 38: 153-156
- NESBAKKEN, T. (1988)
Enumeration of *Yersinia enterocolitica* O:3 from the porcine oral cavity, and its occurrence on cut surfaces of pig carcasses and the environment in a slaughterhouse
Int. J. Food Microbiol., 6: 287-293
- NESBAKKEN, T., KAPPERUD, G., DOMMARSNES, K., SKURNIK, M., HORNES, E. (1991a)
Comparative study of a DNA Hybridization Method and two isolation procedures for the detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 in naturally contaminated pork products
Appl. Environ. Microbiol., 57: 389-394
- NESBAKKEN, T., KAPPERUD, G., LASSEN, J., SKJERVE, E. (1991b)
Yersinia enterocolitica O:3 antibodies in slaughterhouse employees, veterinarians, and military recruits: Occupational exposure to pigs as a risk factor for Yersiniosis
Contrib. Microbiol. Immunol., 12: 32-39
- NEUBAUER, H., SAUER, T., BECKER, H., ALEKSIĆ, S., MEYER, H. (1998)
Comparison of systems for identification and differentiation of species within the *Genus Yersinia*
J. Clin. Microbiol., 36: 3366-3368
- NEUBAUER, H., SPRAGUE, L.D., SCHOLZ, H., HENSEL, A. (2001a)
Die Diagnostik der *Yersinia enterocolitica*-Infektionen: Eine Übersicht über klassische Nachweistechiken und neue molekularbiologische Methoden
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 114: 1-7

- NEUBAUER, H., SPRAGUE, L.D., SCHOLZ, H., HENSEL, A. (2001b)
Yersinia-enterocolitica-Infektionen: 1. Bedeutung bei Tieren
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 114: 8-12
- NEUBAUER, H., SPRAGUE, L.D., SCHOLZ, H., HENSEL, A. (2001c)
Yersinia-enterocolitica-Infektionen: 2. Bedeutung bei Menschen
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 114: 81-87
- NEWTON, C.R. und GRAHAM, A. (1994)
PCR. In: *Focus*, Spektrum Akademischer Verlag, 19-60
- ÖZBAS, Z.Y., LEHNER, A., WAGNER, M. (2000)
Development of a multiplex and semi-nested PCR assay for detection of *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in raw milk
Food Microbiol., 17: 197-203
- PALLEN, M.J., PUCKEY, L.H., WREN, B.W. (1992)
A rapid, simple method for detecting PCR failure
Genome Res., 2: 91-92
- PEPE, J.C. und MILLER, V.L. (1990)
The *Yersinia enterocolitica inv* Gene product is an outer membrane protein that shares Epitopes with *Yersinia pseudotuberculosis* Invasin
J. Bacteriol.,172: 3780-3789
- PORTNOY, D. A., MOSELEY, S. L., FALFOW, S. (1981)
Characterization of Plasmids and plasmid-Associated determinants of *Yersinia enterocolitica* Pathogenesis
Infect. Immun., 31: 775-782
- RÅDSTRÖM, P., LÖFSTRÖM, C., LÖVENKLEV, M., KNUTSSON, R., WOLLFS, P. (2003)
Strategies for overcoming PCR inhibition, PCR primer: a laboratory manual
In: DIEFENBACH, C.W. und DVEKSLER G.S.: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*,
New York

- RASMUSSEN, H.N., RASMUSSEN, O.F., ANDERSEN, J.K., OLSEN, J.E. (1994)
Specific detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by two-step PCR using hot-start and DMSO
Mol. Cell. Probes, 8: 99-108
- ROSSEN, L., NORSKOV, P., HOLMSTROM, K., RASMUSSEN, O. (1992)
Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions
Int. J. Food Microbiol., 17: 37-45
- SACHADYN, P. und KUR, J. (1998)
The construction and use of a PCR internal control
Mol. Cell. Probes, 12: 259-262
- SACHS, L. (2002)
Angewandte Statistik. Springer Verlag, Berlin, 2002: 468-473
- SCHEU, P.M., BERGHOF, K., STAHL, U. (1998)
Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction
Food Microbiol., 15: 13-31
- SCHIEMANN, D.A. (1979)
Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*
Can. J. Microbiol., 25: 1298-1304
- 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, S. 601-672

- SCHUBERT, S, BOCKEMÜHL, J, BRENDLER, U, HEESEMANN, J. (2003)
First isolation of virulent *Yersinia enterocolitica* O8, biotype 1B in Germany
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 22: 66-68
- SEN, K. (2000)
Rapid identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by the 5' Nuclease Assay
J. Clin. Microbiol., 38: 1953-1958
- SIEBERT, P.D. und LARRICK, J.W. (1992)
Competitive PCR
Nature, 359: 557-558
- SKURNIK, M., BÖLIN, I., HEIKKINEN, H., PIHA, S., WOLF-WATZ, H. (1984)
Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp.
J. Bacteriol., 158: 1033-1036
- SKURNIK, M. und TOIVANEN, P. (1992)
LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* Gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*
J. Bacteriol., 174: 2047-2051
- SPRAGUE, L.D. und NEUBAUER, H. (2005)
Yersinia aleksiciae sp. nov.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55: 831- 835
- SPRAGUE, L.D., SCHOLZ H.C., AMANN, S., BUSSE, H.J., NEUBAUER H. (2008)
Yersinia similes sp. nov.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58: 952-958
- TAUXE, R.V., VANDEPITTE, J., WAUTERS, G., MARTIN, S.M., GOOSSENS, V., DE MOL, P., VAN NOYEN, R., THIERS, G. (1987)
Yersinia enterocolitica infections and pork: The missing link
Lancet, 16.1: 1129-1132

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., GRANT, T.H., ROBINS-BROWNE, R.M. (2003)

Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A

FEMS Immunol. Med. Microbiol., 38: 127-137

THISTED LAMBERTZ, S., BALLAGY-PORDÁNY; A., NILSSON, A., NORBERG, P., DANIELSSON-THAM, M.L. (1996)

A comparison between a PCR method and a conventional culture method for detecting pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food

J. Appl. Microbiol., 81: 303-308

THISTED LAMBERTZ, S., BALLAGY-PORDÁNY; A., LINDQVIST, R. (1998)

A mimic as internal standard to monitor PCR analysis of food-borne pathogens

Lett. Appl. Microbiol., 26: 9-11

THISTED LAMBERTZ, S., LINDQVIST, R., BALLAGY-PORDÁNY, A., DANIELSSON-THAM, M.L. (2000)

A combined culture and PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food

Int. J. Food Microbiol., 57: 63-73

THISTED LAMBERTZ, S. und DANIELSSON-THAM, M.-L. (2005)

Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Appl. Environ. Microbiol., 71: 3674-3681

THISTED LAMBERTZ, S., GRANATH, K., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., JOHANSSON, K., DANIELSSON-THAM, M. (2007)

Evaluation of a combined culture and PCR method (NMKL-163A) for detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Pork Products

J. Food Prot., 70: 335-340

VISHNUBHATLA, A., FUNG, D.Y.C., OBEREST, R.D., HAYS, M.P., NAGARAJA, T. G., FLOOD, S.J.A. (2000)

Rapid 5'-nuclease (TaqMan) assay for detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica*

Appl. Environ. Microbiol., 66: 4131-4135

VISHNUBHATLA, A., OBERST, R.D., FUNG, D.Y.C., WONGLUMSOM, W., HAYS, M.P., NAGARAJA, T.G. (2001)

Evaluation of a 5'-nuclease Assay for the detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica* of in raw meat and tofu samples

J. Food Prot., 64: 355-360

VUYE, A. und PIJCK, J. (1973)

Urease activity of *Enterobacteriaceae*: Witch medium to choose

Appl. Microbiol., 26: 850-854

WAAGE, A. S., VARDUND, T., LUND, V., KAPPERUD, G. (1999)

Detection of low numbers of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in environmental water and sewage samples by nested polymerase chain reaction

J. Appl. Microbiol., 87: 814-821

WANG, R.F., CAO, W.W., JOHNSON, M.G. (1992)

16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to food

Appl. Environ. Microbiol., 58: 2827-2831

WANG, R.F., CAO, W.W., CERNIGLIA, C.E. (1997)

A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in food

J. Appl. Microbiol., 83: 727-736

WAUTERS, G. (1973)

Improved methods for the isolation and the recognition of *Yersinia enterocolitica*

Contrib. Microbiol. Immunol., 2: 68-70

WAUTERS, G., KANDOLO, K., JANSSENS, M. (1987)

Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*

Contrib. Microbiol. Immunol., 9: 14-21

WAUTERS, G., GOOSSENS, V., JANSSENS, M., VANDEPITTE, J. (1988)

New enrichment method for isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 from pork

Appl. Environ. Microbiol., 54: 851-854

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

Modified enrichment broth for isolation of *Yersinia enterocolitica* from nonfood sources

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

WEAGANT, S.D., JAGOW, J.A., JINNEMAN, K.C., OMIECINSKI, C.J., KAYSNER, C.A., HILL, W.E. (1999)

Development of digoxigenin-labeled PCR amplicon probes for use in the detection and identification of enteropathogenic *Yersinia* and shiga toxin-producing *Escherichia coli* from foods

J. Food Prot., 62: 438-443

WEAGANT, S.D. (2008)

A new chromogenic agar medium for detection of potentially virulent *Yersinia enterocolitica*

J. Microbiol. Methods, 72: 185-190

WEYNANTS, V., JADOT, V., DENOEL, P.A., TIBOR, A., LETESSON, J.J. (1996)

Detection of *Yersinia enterocolitica* Serogroup O:3 by a PCR method

J. Clin. Microbiol., 34: 1224-1227

WILSON, I. G. (1997)

Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification

Appl. Environ. Microbiol., 63: 3741-3751

WOLFFS, P., KNUTTSON, R., NORLING, B., RADSTRÖM, P. (2004)

Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, flotation, prior to Real-Time PCR

J. Clin. Microbiol., 42: 1042-1047

WREN, B.W. und TABAQCHALI, S. (1990)

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction
Lancet, 336: 693

ZINK, D.L., FEELEY, J.C., WELLS, J.G., VANDERZANT, C., VICKERY, J.C., ROOF, W.D.,
O'DONOVAN, G.A. (1980)

Plasmid-mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica*
Nature, 283: 224-226

Sonstige Literaturquellen

BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) (2007)

Untersuchung von Lebensmitteln auf das Vorkommen von pathogenen
Yersinia enterocolitica im Rahmen eines bundesweiten jährlichen Monitoringplans für
Zoonosen in der Lebensmittelkette

DIN EN ISO 10273 (2003)

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Horizontales Verfahren zum
Nachweis von präsumtiv pathogenen *Yersinia enterocolitica* (ISO 10273:2003);
Deutsche Fassung EN ISO 10273:2003
DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

DIN EN ISO 16140 (2003)

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Arbeitsvorschrift für die
Validierung alternativer Verfahren (ISO 16140:2003); Deutsche Fassung EN ISO
16140:2003
DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

DIN EN ISO 22174 (2005)

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Polymerase-Kettenreaktion
(PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln –
Allgemeine Anforderungen und Begriffe (ISO 22174:2005); Deutsche Fassung EN
ISO 22174:2005
DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

DIN EN ISO 20837 (2006)

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln – Anforderungen an die Probenvorbereitung für den qualitativen Nachweis (ISO 20837:2006); Deutsche Fassung EN ISO 20837:2006

DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

DIN EN ISO 22118 (2007)

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Leistungsmerkmale von molekularen Nachweisverfahren (ISO/DIS 22118:2007); Deutsche Fassung prEN ISO 22118:2007

DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

EFSA (European Food Safety Authority) (2007)

Monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia spp.* Scientific Opinion of the Panel in Biological Hazards

The EFSA Journal 595: 1-30

NMKL (Nordic Committee on Food Analysis) (1998)

Pathogenic *Yersinia enterocolitica*. PCR methods for detection in foods

Nordic Committee on Food Analysis, Method no. 163. Oslo, Norway

N.N. (1999)

Yersinia enterocolitica

Stellungnahme des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit

Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 42: 613-621

N.N. (2000)

Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz) vom 20. Juli 2000

Bundesgesetzblatt I, 1045

N.N. (2002)

Untersuchung von Lebensmitteln

Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik (L 07.18-1)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB

N.N. (2004)

Untersuchung von Lebensmitteln

Horizontales Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Yersinia enterocolitica* (L 00.00-90)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB

N.N. (2006a)

Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie

Schweizerische Akkreditierungsstelle (SAS), Dokument Nr. 328.dw.

N.N. (2006b)

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch) i. d. F. vom 26.04.2006

Bundesgesetzblatt I, 945

N.N. (2006c)

Untersuchung von Lebensmitteln

Allgemeine verfahrensspezifische Anforderungen zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Lebensmitteln (L 00.00-45)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB

N.N. (2007a)

Protocol for the validation of alternative microbiological methods

NordVal, c/o National Veterinary Institute, Oslo, Norway

N.N. (2007b)

Untersuchung von Lebensmitteln

Anforderungen an die Probenvorbereitung für den qualitativen Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (L 00.00-109)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB

ROBERT KOCH INSTITUT (2007a)

Falldefinitionen des Robert Koch-Institutes zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern

Ausgabe 2007

ROBERT KOCH INSTITUT (2007b)

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2006

01.03.2007

ROCHE (2000)

DIG DNA Markierungs- und Detektionskit

Gebrauchsanleitung für den allgemeinen Laborgebrauch

ROCHE (2003)

DIG Application Manual for Filter Hybridization

ROCHE (2004)

Nylon Membranen für Kolonie und Plaque Hybridisierung

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schema der Konstruktion der IAC über die composite primer technology, beispielhaft mit dem <i>pUC19</i> als Template (nach SACHADYN und KUR 1998; ABDULMAWJOOD et al. 2002)	37
Abbildung 2: Verteilung der untersuchten rohen Schweinefleischproben	54
Abbildung 3: Schema der Konstruktion der IAC (nach SACHADYN und KUR 1998; ABDULMAWJOOD et al. 2002)	59
Abbildung 4: Dezimale Verdünnungsreihe der CASO- und ITC-Anreicherung	65
Abbildung 5: Verfahrensdigramm aus KNÖDL (2008)	72
Abbildung 6: Lineare Darstellung des DSM Stammes 11502 in der SYBR Green PCR	77
Abbildung 7: Schmelzkurve des <i>ail</i> -Fragmentes der SYBR Green PCR bei +75,7 °C	77
Abbildung 8: Lineare Darstellung des DSM Stammes 11502 in der TaqMan PCR	78
Abbildung 9: Konventionelle PCR der 218 bp großen IAC	79
Abbildung 10: Lineare Darstellung des DSM Stammes 11502 in der TaqMan PCR mit der IAC 10 ⁻¹⁰	80
Abbildung 11: Konventionelle PCR der markierten und nicht markierten Hybridisierungssonde	81
Abbildung 12: Ergebnisse der Inklusivität und Exklusivität der Kolonie-DNA-Hybridisierung	85
Abbildung 13: Verfahrensdigramm	94
Abbildung 14: Nylonmembran einer positiven Zunge	106
Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der positiven Proben mittels Real-Time PCR und Kolonie-DNA-Hybridisierung in Bezug auf die Gesamtanzahl der untersuchten Proben	107

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Biotypen von <i>Y. enterocolitica</i> modifiziert nach WAUTERS et al. 1987 (nach BOTTONE 1999)	16
Tabelle 2: Nachweis von pathogenen <i>Y. enterocolitica</i> in rohem Fleisch und Fleischprodukten vom Schwein	22
Tabelle 3: PCR-Verfahren mit Amplifikationskontrollen zum Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i>	39
Tabelle 4: Übersicht über Untersuchungen von Lebensmitteln und Reinkulturen mittels Kolonie-DNA-Hybridisierung auf <i>Y. enterocolitica</i>	45
Tabelle 5: Definitionen und Berechnungen der Validierungskriterien (nach DIN EN ISO 16140:2003)	47
Tabelle 6: Auswerteschema zur Berechnung der relativen Genauigkeit, relativen Spezifität und relativen Empfindlichkeit (nach DIN EN ISO 16140:2003)	47
Tabelle 7: Übersicht über weitere Vorschriften zur Validierung	49
Tabelle 8: Auswerteschema des Vierfeldertests (nach N.N. 2006a; SACHS 2002)	49
Tabelle 9: Definitionen und Berechnungen der Validierungskriterien in Bezug auf die Referenzmethode (nach N.N. 2006a).....	50
Tabelle 10: Auswertung des Konkordanzindexes Kappa (nach SACHS 2002)	51
Tabelle 11: Definitionen und Berechnungen der Validierungskriterien in Bezug auf die inokulierten bzw. nicht-inokulierten Proben (nach DIN EN ISO 22118:2007; KNÖDL 2008)	52
Tabelle 12: Nukleotidsequenz der <i>RT-ail 1 + 2</i> Primer der Real-Time PCR	54
Tabelle 13: Pipettierschema der SYBR Green PCR	55
Tabelle 14: Versuche zum Temperatur-Zeit-Profil der SYBR Green PCR.....	56
Tabelle 15: Nukleotidsequenz der TaqMan Sonde	56
Tabelle 16: Pipettierschema der TaqMan PCR mit unterschiedlichen TaqMan Sondenkonzentrationen.....	57
Tabelle 17: Temperatur-Zeit-Profil der TaqMan PCR	57
Tabelle 18: TaqMan PCR mit unterschiedlichen Master Mixen	57
Tabelle 19: Nukleotidsequenz der zusammengesetzten Primer der konventionellen PCR zur Konstruktion der IAC.....	58
Tabelle 20: Eingesetzte <i>pUC19</i> - und Primerkonzentrationen zur Konstruktion der IAC	59
Tabelle 21: Pipettierschema der konventionellen PCR zur Konstruktion der IAC.....	60
Tabelle 22: Temperatur-Zeit-Profil der konventionellen PCR zur Konstruktion der IAC	60
Tabelle 23: Pipettierschema der TaqMan PCR mit IAC	61
Tabelle 24: Temperatur-Zeit-Profil der TaqMan PCR mit IAC.....	61
Tabelle 25: Nukleotidsequenz der <i>pUC19</i> -Sonde der TaqMan PCR mit IAC	62

Tabelle 26: Nukleotidsequenz der <i>ail 1 + 2</i> Primer zur Herstellung der Hybridisierungssonde	62
Tabelle 27: Pipettierschema des ersten konventionellen PCR-Schrittes	63
Tabelle 28: Temperatur-Zeit-Profil des ersten PCR-Schrittes (nach NMKL 1998).....	63
Tabelle 29: Pipettierschema des zweiten konventionellen PCR-Schrittes	64
Tabelle 30: Arbeitsschritte des QIAcubes (QIAGEN).....	68
Tabelle 31: Pipettierschema der Real-Time PCR	68
Tabelle 32: Temperatur-Zeit-Profil der Real-Time PCR	68
Tabelle 33: Bebrütungsmodalitäten der Mikroorganismen für die Exklusivität.....	70
Tabelle 34: Ergebnisse zur idealen Primerkonzentration der SYBR Green PCR	76
Tabelle 35: Ergebnisse zum Temperatur-Zeit-Profil der SYBR Green PCR	76
Tabelle 36: Ergebnisse der idealen TaqMan Sondenkonzentration.....	78
Tabelle 37: Ergebnisse der TaqMan PCR mit unterschiedlichen Master Mixen	78
Tabelle 38: Eingesetzte Verdünnungsstufen der IAC in die TaqMan PCR	79
Tabelle 39: Optimale Verdünnungsstufen der IAC für den Einsatz in die TaqMan PCR	80
Tabelle 40: Temperatur-Zeit-Profil der TaqMan PCR mit IAC.....	80
Tabelle 41: Verdünnungsstufen für den Einsatz in die Kolonie-DNA-Hybridisierung.....	82
Tabelle 42: Ergebnisse der Inklusivität der Real-Time PCR	83
Tabelle 43: Ergebnisse der Exklusivität der Real-Time PCR	84
Tabelle 44: Ergebnis der Nachweisgrenze der Real-Time PCR	86
Tabelle 45: Ergebnis der Nachweisgrenze der Kolonie-DNA-Hybridisierung	87
Tabelle 46: Ergebnis der Nachweisgrenze des Verfahrens nach KNÖDL (2008).....	88
Tabelle 47: Ermittelte Nachweisgrenzen im Überblick	88
Tabelle 48: Ergebnisse des Verfahrensvergleiches	89
Tabelle 49: Auswerteschema des Verfahrensvergleiches	90
Tabelle 50: Ergebnisse des Auswerteschemas des Verfahrenvergleichs im Überblick.....	92
Tabelle 51: Ergebnisse der Berechnung der Sensitivität, Spezifität, Falsch-Negativ-Rate und Falsch-Positiv-Rate bezogen auf die inokulierten bzw. nicht-inokulierten Proben	93
Tabelle 52: Biotypisierung von <i>Y. enterocolitica</i>	102
Tabelle 53: Übersicht der Ergebnisse des Real-Time PCR Screenings	103
Tabelle 54: Übersicht der Ergebnisse des kulturellen Nachweises.....	104
Tabelle 55: Übersicht der isolierten Proben in Bezug zur Gesamtprobenzahl.....	104
Tabelle 56: Übersicht über die zur Hybridisierung eingesetzten Nährböden	105
Tabelle 57: Tabellarische Übersicht der untersuchten Proben	132

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei den Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit mit Rat und Tat unterstützt haben, vor allem bei:

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Stolle für die freundliche Überlassung des Themas meiner Dissertation.

Frau Dr. M. Fredriksson-Ahomaa für die überaus herzliche sowie stets fachkundige Betreuung und Durchsicht meiner Arbeit.

Der **Grimminger-Stiftung** für die Finanzierung dieser Arbeit über das Forschungsprojekt.

Dem **Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe** für die Möglichkeit der Bearbeitung des Themas.

Frau Dr. C. Knödl für die freundliche Unterstützung bei der Einarbeitung in das Thema und für die vielen nützlichen Ratschläge zur Anfertigung der Dissertation.

Herrn Dr. M. Lohneis, Frau Dr. D. Noack und Frau Dr. A. Sabrowski für die freundliche Unterstützung bei der Anforderung der Proben und die stets gewährte kollegiale Hilfe.

Frau E. Brand für die große Unterstützung bei der Validierung des Verfahrens sowie **allen weiteren Mitarbeitern** im mikrobiologischen Labor für die jederzeit gewährte freundliche Hilfe.

Frau T. Behrendt, Frau M. Schmitt-Beck, Frau D. Stortz und Frau H. Zimmer für die überaus gewissenhafte Korrektur des Manuskriptes sowie **Frau U. Böttler und Frau V. Ostermayer** für die große Hilfe bei der Beschaffung der Literatur.

Meinem Freund Benjamin für seine unermüdliche geistige und moralische Unterstützung und den Rückhalt den er mir stets bot.

Meinen Eltern und Großeltern für die liebevolle Unterstützung und Förderung in allen Lebenslagen. Ohne sie wären Studium und Promotion nicht möglich gewesen. Ich danke ihnen von ganzem Herzen, dass sie immer für mich da sind.

