

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

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

**Die Verbreitung der Yersiniose beim Menschen im Großraum
München unter Berücksichtigung
von Schweinefleisch und Schlachtnebenprodukten
als mögliche Infektionsquelle**

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

von
Katja Zechner
aus München

München 2003

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

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

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
B	Literatur	3
1	<i>Yersinia enterocolitica</i> als Krankheitserreger	3
1.1	Für den Menschen bedeutsame Spezies	3
1.2	Das Krankheitsbild beim Menschen	4
1.2.1	Enterale Verlaufsformen	5
1.2.2	Extraintestinale Verlaufsformen	6
1.2.3	Immunpathologische Verlaufsformen	8
1.3	Das Krankheitsbild beim Tier	9
1.3.1	Schwein	9
1.3.2	Andere Haustiere	10
1.4	Pathomechanismen und Virulenz des Erregers	11
1.5	Behandlung der Yersiniose	14
2	Epidemiologie	16
2.1	Vorkommen und Verbreitung beim Menschen	16
2.1.1	Geographische Verteilung	16
2.1.2	Die Yersiniose in Europa und anderen Kontinenten	16
2.1.3	Die Yersiniose in Deutschland	17
2.2	Infektionsquellen	22
2.2.1	Tiere	22
2.2.2	Umwelt	23
2.2.3	Lebensmittel	23
2.2.4	Mensch	24
2.3	Übertragungswege	25
2.3.1	Lebensmittel	25
2.3.2	Tiere	27
2.3.3	Mensch	28
3	Diagnostik von <i>Yersinia enterocolitica</i>	30
3.1	Eigenschaften des Erregers	30
3.2	Kulturelle Nachweisverfahren	31
3.2.1	Anzucht aus Untersuchungsmaterial	31

3.2.2	Isolierung von <i>Yersinia enterocolitica</i>	33
3.2.3	Identifizierung auf Speziesebene	34
3.2.4	Pathogenitätsnachweis	35
3.3	Immunologische Nachweisverfahren einer Yersiniose	36
3.4	Molekularbiologische Nachweisverfahren	39
4	Methoden zur Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge	40
4.1	Fall-Kontroll-Studien	40
4.2	Molekularmethoden	41
4.2.1	Restriktionsenzymanalyse des Plasmids	41
4.2.2	Restriktionsenzymanalyse chromosomaler DNS	42
4.2.3	Ribotypisierung	42
4.2.4	Analysen von random amplified polymorphic DNS	43
4.2.5	Sequenzierung	43
4.2.6	Pulsfeldgelelektrophorese	44
5	Anwendung der Pulsfeldgelelektrophorese für <i>Yersinia enterocolitica</i>	47
C	Eigene Untersuchungen	49
1	Ziel der Arbeit	49
2	Herkunft der Stämme	50
2.1	Humane <i>Yersinia</i> Stämme	50
2.2	Übrige <i>Yersinia</i> Stämme	50
3	Kultivierung und Identifizierung von <i>Yersinia enterocolitica</i>	53
3.1	Humanstämme	53
3.2	Lebensmittelstämme	53
4	Lagerung bestätigter Stämme	55
5	Untersuchungsmethode	56
6	Verwendetes Untersuchungsmaterial	58
D	Ergebnisse	59
1	Isolierung von <i>Yersinia</i> aus Humanproben	59
1.1	Isolierungsrate und jahreszeitliche Verteilung	59
1.2	Ergebnisse der Speziescharakterisierung	60
1.3	Demographische Verteilung	61

1.4	Symptomatik der Erkrankung	61
1.5	Isolierungsrate anderer, lebensmittelassoziierter Krankheitserreger	62
2	Ergebnisse der PFGE	64
2.1	Charakterisierung von <i>Yersinia enterocolitica</i> des Bioserovars 4/O:3	64
2.1.1	Ergebnisse der Restriktion mit drei verschiedenen Enzymen	64
2.1.2	Unterscheidung von verschiedenen Genotypen	68
2.2	Charakterisierung von anderen <i>Yersinia</i> Spezies und anderen Bioserovaren von <i>Yersinia enterocolitica</i>	69
2.3	Vergleich der Genotypen von Humanstämmen mit Nichthumanstämmen	71
E	Diskussion	75
1	<i>Yersinia</i> Spezies in humanen Stuhlproben	74
1.1	Beurteilung der Isolierungsergebnisse	75
1.2	Weitere Charakterisierung der Stämme	76
1.3	Saisonale und demographische Abhängigkeiten der Isolierungsrate	77
1.4	Symptomatik der Erkrankung	78
1.5	Andere Enteritiserreger	78
2	Charakterisierung von Yersinien mittels Pulsfeldgelelektrophorese	79
2.1	Bewertung der Methode	79
2.2	Bewertung der verschiedenen Restriktionsenzyme	80
2.3	Vergleichbarkeit der Genotypen von Mensch und Schwein	81
2.3.1	Gemeinsame Genotypen	81
2.3.2	Nicht gemeinsame Genotypen	82
3	Präventivmassnahmen zum gesundheitlichen Verbraucherschutz	85
F	Zusammenfassung	87
G	Summary	89
H	Anhang	91
1	PFGE-Protokoll	91
2	Nährmedien und Reagenzien	96
2.1	Isolierung und Identifizierung von humanpathogenen <i>Yersinia</i> Spezies	96
2.2	Anreicherung und Konzentrierung von Stämmen für die PFGE	97

2.3	Einbetten in Agarose	97
2.4	Zelllysis	97
2.5	Deproteinisierung	98
2.6	Restriktionsverdau	98
2.7	Gelherstellung und Gelladung	99
2.8	Gelauswertung	100
3	PFGE-Rezepte für Puffer und Stammlösungen	101
3.1	Puffer	101
3.2	Stammlösungen	103
4	Geräte und Laborbedarf	104
4.1	Laborgeräte-Grundausrüstung	104
4.2	Spezialanschaffungen für die PFGE	106
4.3	Glaswaren und Verbrauchsmaterial	107
5	Übersichtstabellen zu den Untersuchungsergebnissen	108
I	Literaturverzeichnis	113

Abkürzungsverzeichnis

ail	Attachment invasin locus
AK	Antikörper
β	Beta
BOS	Bile-Oxalat-Sorbose
Bp	Basenpaare
BSG	Bundesseuchengesetz
CAL	Cellobiose-Arginin-Lysin
CHEF	Contour clamped homogenous electric fields
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
cm	Zentimeter
CRMOX	Congo Red-Magnesium-Oxalat
ddATP	didesoxyadenosintriphosphat
dCTP	didesoxycytosintriphosphat
dGTP	didesoxyguanintriphosphat
DDR	Deutsche Demokratische Republik
ddTTP	didesoxythiamintriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym linked immunosorbent assay
FIGE	Feldinversionsgelelektrophorese
h	Stunde
H-Ag	Geißelantigen
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPI	High Pathogenicity Island
IfSG	Infektionsschutzgesetz

Ig	Immunoglobulin
inv	Invasin-Gen
ISO	Internationale Organisation zur Standardisierung
ITC	Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat
Kb	Kilobase
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetz
Mb	Megabase
MHC	Major Histocompatibility Complex
mm	Millimeter
MRB	Modifizierte Rappaport Bouillon
NaCl	Natriumchlorid
NFCA	Nordic Committee on Food Analysis
O-AG	Oberflächenantigen
OFAGE	Gelelektrophorese in orthogonal-alternierenden Feldern
ON	Over night
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PBSSB	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung mit Sorbit und Galle
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pYV	Plasmid for <i>Yersinia</i> Virulenz
REAC	Restriktionsenzymanalyse chromosomaler DNS
REAP	Restriktionsenzymanalyse des Plasmids
RKI	Robert-Koch-Institut
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
SSDC	Salmonella-Shigella-Agar mit Natriumdesoxycholat und Calciumdichlorid

TBE	Tris Borsäure EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSB	Trypticase-Soja-Bouillon
TSH	Thyreoidea stimulierendes Hormon
USA	United States of America
V	Volt
VYE	Virulent <i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>
YadA	<i>Yersinia</i> Adhäsion A
Yop	<i>Yersinia</i> outer protein
Ysc	<i>Yersinia</i> secretion system
Yst	<i>Yersinia</i> heat-stable enterotoxin
µm	Mikrometer
z.B.	zum Beispiel

A EINLEITUNG

Die humane Yersiniose, verursacht durch das Bakterium *Yersinia enterocolitica*, stellt eine ernst zu nehmende Erkrankung in der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland dar. Dies verdeutlichen ansteigende Fallzahlen der Yersiniose seit Einführung der detaillierten Meldepflicht im Jahr 2001. Im Jahr 2001 wurden allein im Bundesland Bayern 594 Fälle von Erkrankungen an *Y. enterocolitica* registriert, im Jahr 2002 waren es bereits 632 Fälle. Die Erregerisolate gehörten dabei am häufigsten dem Bioserovar 4/O:3 an.

Im Rahmen dieser Studie sollen diesen Zahlen eigene Untersuchungsergebnisse gegenübergestellt werden. Stuhlproben an Enteritis Erkrankter aus dem Großraum München werden dafür auf das Vorhandensein von *Y. enterocolitica* untersucht, jahreszeitliche Schwankungen der Nachweisrate, die Alters- und demographische Verteilung der Yersiniose soll ermittelt und anhand früherer Studienergebnisse diskutiert werden.

Es stellt sich die Frage nach der Infektionsquelle. Neben der direkten Übertragung scheint vor allem die alimentäre Übertragung eine wichtige Rolle zu spielen, *Y. enterocolitica* wird deshalb auch zu den sogenannten "food-borne pathogens" gezählt. Das Schwein, das in Deutschland am häufigsten zur Lebensmittelgewinnung dienende Tier, ist ein Hauptreservoir. Humanpathogene *Y. enterocolitica* des Bioserovars 4/O:3 können sehr häufig auf den Tonsillen und im Kot der Tiere nachgewiesen werden ohne dass klinische Symptome zu beobachten wären.

Fall-Kontroll-Studien, sowie molekularbiologische Studien aus skandinavischen Ländern belegen den Zusammenhang zwischen kontaminiertem Schweinefleisch und an Yersiniose erkrankter Menschen. In Deutschland wurden bisher keine vergleichbaren Studien durchgeführt. Doch auch hierzulande kann *Y. enterocolitica* des Bioserovars 4/O:3 sehr häufig in Schweinen nachgewiesen werden, die Erregerisolierung gelang an Schlachthöfen, in fleischverarbeitenden Betrieben sowie auf Einzelhandelsebene.

Ziel dieser Studie war es, gesammelte *Y. enterocolitica*-Stämme des Bioserovars 4/O:3 aus Stuhlproben des Menschen, sowie aus Schweinefleisch und Schlachtnebenprodukten des Schweines mit Hilfe einer molekularbiologischen Methode näher zu charakterisieren. Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) stellte sich dabei bereits in früheren Arbeiten als die am

besten dafür geeignete Methode heraus. Die erzeugten Bandenmuster sollen verglichen werden, um eventuell vorhandene, gemeinsame Genotypen bei Humanstämmen und Lebensmittelstämmen festzustellen. Schweinefleisch, sowie Erzeugnisse daraus würden dann auch in Deutschland eine wichtige Infektionsquelle für die Yersiniose des Menschen darstellen.

Desweiteren soll die Anwendbarkeit der PFGE bewertet werden, in der Umwelt weit verbreitete, apathogene Yersinien von pathogenen Vertretern dieser Spezies abzugrenzen. Auch die Diskriminierungsfähigkeit der Methode zwischen verschiedenen pathogenen *Yersinia* Spezies, sowie zwischen verschiedenen Bioserovaren von *Y. enterocolitica* soll im Rahmen dieser Studie untersucht werden.

B Literatur

1 *Yersinia* als Krankheitserreger

1.1 Für den Menschen bedeutsame Spezies

Yersinia ist eine Gattung innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* und umfasst derzeit elf verschiedene Spezies: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia mollaretii*, *Yersinia bercovier*, *Yersinia aldova*, *Yersinia rohdei* und *Yersinia ruckeri* (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Aufgrund von ähnlichen Eigenschaften werden *Y. bercovier* und *Y. mollaretii* oft unter dem Begriff "*Y. enterocolitica*-like" Bakterien zusammengefasst (WAUTERS et al. 1988b), sie waren ehemals als Biovar 3A und 3B in die Spezies *Y. enterocolitica* eingegliedert.

Als Krankheitserreger für den Menschen spielen *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* eine Rolle (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). *Y. pestis*, der Erreger des "schwarzen Todes", einer Infektion, die im Mittelalter epidemisch auftrat, ist heute aus unseren Breitengraden verschwunden (KAYSER et al. 1993), während *Y. pseudotuberculosis* und vor allem *Y. enterocolitica* als Erreger der menschlichen Yersiniose in den letzten Jahren zunehmende Bedeutung erlangt haben (BOTTONNE 1999). *Y. enterocolitica* ist jedoch nicht nur ein humanpathogener Erreger, neben pathogenen Vertretern dieser Spezies existieren noch eine Reihe von apathogenen Umweltkontaminanten die diagnostisch abgegrenzt werden müssen (NEUBAUER et al. 2001a).

Alle weiteren Spezies haben in der Regel nur differentialdiagnostische Bedeutung. Sie sind in der Umwelt weit verbreitet und können deshalb häufig aus Lebensmitteln isoliert werden. Nur gelegentlich werden sie mit Einzelerkrankungen in Zusammenhang gebracht, als sogenannte opportunistische Krankheitserreger (VARNHAM und EVANS 1991, BAUMGART 1999). Bei *Y. ruckeri* handelt es sich um einen fischpathogenen Erreger, der für die sogenannte Enteric Redmouth Disease bei Forellen und anderen Salmoniden verantwortlich gemacht wird (BISPING und AMTSBERG 1988).

1.2 Das Krankheitsbild beim Menschen

Y. enterocolitica Stämme, die mit menschlichen Erkrankungsfällen in Verbindung gebracht werden, gehören meistens folgenden Bioserovaren an: 4/O:3, 2/O:9, 2/O:5,27, 1B/O:8, 3/O:3. Stämme des Biovars 1A werden aufgrund eines fehlenden Plasmids als apathogene Vertreter betrachtet (ZHENG und XIE 1996).

BURNENS et al. (1996) berichten von einer nicht vernachlässigbaren Anzahl an Isolierungen von Biotyp 1A, die mit Gastroenteritis assoziiert waren. Eine klinische Relevanz wird gemäß BOTTONE (1997) nur dann angenommen, wenn entsprechende Stämme mehrmals aus einund demselben Patienten isoliert werden können, andere enteropathogene Erreger ausgeschlossen werden können und ein Nachweis von Pathogenitätsfaktoren gelingt.

Beim Menschen werden meist Einzelfälle beobachtet, gelegentlich erkrankt auch eine größere Gruppe an Personen. Verlässliche Angaben über die zur Erkrankung notwendige Infektionsdosis fehlen bisher (DEDIÉ et al. 1993).

Durch *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* werden pathologisch-anatomische Veränderungen des lymphoretikulären Systems hervorgerufen, so dass auch vom klinischen Erscheinungsbild Ähnlichkeiten vorhanden sein können (BAUMGARTEN et al. 1977). Durch beide Erreger verursachte Krankheiten werden als Yersiniosen zusammengefasst (DEDIÉ et al. 1993). Die Prävalenz von *Y. enterocolitica* ist jedoch um ein Vielfaches höher. Einer großangelegten Studie von AHVONEN (1972) an 6.030 Patienten zufolge war *Y. enterocolitica* zehnmal häufiger an einem Krankheitsgeschehen beteiligt als *Y. pseudotuberculosis*.

Die klinischen Erscheinungen der Yersiniose des Menschen lassen sich in drei verschiedene Verlaufsformen einteilen:

1. Enterale Verlaufsform
2. Extraabdominelle Organmanifestationen und septische Verläufe
3. Immunpathologische Verlaufsform.

Die Virulenz des Erregerstammes, die Infektionsdosis, genetische Faktoren sowie Alter und Immunstatus des Erkrankten haben dabei Einfluss auf den Krankheitsverlauf (BOTTONE 1997).

1.2.1 Enterale Verlaufsformen

Je nach Krankheitsbild können die enteritische und pseudoappendizitische Verlaufsform unterschieden werden.

Enteritische Verlaufsform

Gastroenteritis ist das prädominierende Symptom einer Infektion mit *Y. enterocolitica* beim Menschen, über 70 % der klinisch manifesten Infektionen mit diesem Erreger entwickeln dieses Krankheitsbild (HOOGKAMP-KORSTANJE und de KONING 1990). Die Krankheit beginnt mit leichtem Fieber, Bauchschmerzen und Diarrhoe. Die Stühle sind dünnbreiig bis wässrig, Blut- und Schleimbeimengungen weisen auf eine Beteiligung des Dickdarms hin (DEDIÉ et al. 1993). Auch Erbrechen kann auftreten, wenn dies auch nicht das Leitsymptom ist (CORNELIS et al. 1987).

Die enteritische Verlaufsform ist ein häufiges Krankheitsbild bei Kindern unter sechs Jahren und bei Erwachsenen (HEIN und KNAUFF 1978, BOTTONE 1999). Schwere Verlaufsformen beim Erwachsenen sind beschrieben worden, vor allem Infektionen mit dem Bioserovar 1B/O:8 verursachen nekrotisierende Enterocolitis und hämorrhagische Enteritis mit ulzerierenden Läsionen in Ileum und Colon, die unter Umständen eine Perforation und Peritonitis bedingen können (CORNELIS et al. 1987, ZHANG et al. 1997).

Die Erkrankung ist in der Regel selbst limitierend und klingt bei komplikationslosem Verlauf nach wenigen Tagen, seltener nach einigen Wochen ab (HEIN und KNAUFF 1978, TAUXE et al. 1987). Jedoch auch von chronischen Krankheitsgeschehen, bei denen die Symptome über Jahre hinweg anhielten und die häufig durch immunpathologische Komplikationen begleitet wurden, ist berichtet worden (AHVONEN 1972, VAN DE PITTE et al. 1973, HOOGKAMP-KORSTANJE et al. 1986). Dass es sich hierbei um persistierende Infektionen handelte konnte dadurch bewiesen werden, dass der Erreger jederzeit mit Hilfe indirekter Immunofluoreszenz aus Biopsieproben der Lymphknoten nachweisbar war (HOOGKAMP-

KORSTANJE et al. 1988). Auch symptomlose Dauerauscheider kommen vor (WUTHE et al. 1982, VAN NOYEN et al. 1987). In der ehemaligen DDR konnten nach Einführung der Meldepflicht für Yersiniose knapp 5% der Keimisolierungen nicht mit einer Erkrankung in Verbindung gebracht werden (KIESEWALTER 1992).

Pseudoappendizitische Verlaufsform

Diese Verlaufsform wird durch eine akute terminale Ileitis und mesenteriale Lymphadenitis hervorgerufen und ist ein häufiges Krankheitsbild bei Infektionen mit *Y. pseudotuberculosis*. Seltener findet man diese Symptomatik auch bei Infektionen mit *Y. enterocolitica*, dann sind vor allem heranwachsende Kinder und Jugendliche betroffen (AHVONEN 1972, HOOGKAMP-KORSTANJE und DE KONING 1990, BOTTONE 1999).

Ein plötzlicher Beginn mit Fieber und Erbrechen begleitet von Druckschmerz im rechten Unterbauch bestimmen dieses Krankheitsbild, die ausgeprägte Symptomatik führt gewöhnlich zu einem operativen Vorgehen (DEDIÉ et al. 1993). Intraoperative Befunde sind vergrößerte Mesenteriallymphknoten und eine akute terminale Ileitis bei meist unauffälliger Appendix (BEYER 1979).

1.2.2 Extraintestinale Verlaufsformen

Sepsis

Vor allem das hoch pathogene Bioserovar 1B/O:8, ein ehemals nur in den USA verbreitetes Bioserovar, kann systemische Erkrankungen verursachen (WORMSER und KEUSCH 1981). Patienten mit gleichzeitig bestehenden Grunderkrankungen, wie chronischer Hepatitis, Diabetes oder Neoplasien und dadurch geschwächtem Immunsystem sind für eine septische Erkrankung prädisponiert (DEDIÉ et al. 1993).

Auch eine medikamentöse oder krankheitsbedingte Eisenüberladung des Organismus können Auslöser einer Sepsis sein, denn hohe Serumeisenspiegel ermöglichen auch anderen pathogenen Bioserovaren ohne Siderophore (alle außer 1B/O:8) eine systemische Erregerausbreitung. Eine Behandlung mit Eisenchelatbildnern (z.B. Deferoxamin) oder Erkrankungen des hämatologischen Systems wie die Thalassämie oder die Sichelzellenanämie spielen in

diesem Zusammenhang eine Rolle (BLEI und PUDER 1993, COVER und ABER 1989). Nicht nur die orale Erregeraufnahme kann Auslöser einer Sepsis sein, von Erkrankungen nach Bluttransfusionen ist ebenfalls berichtet worden. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass Blutspender mit asymptomatischer Bakteriämie vorkommen (STROBEL et al. 2000).

Klinisch äußert sich die septische Verlaufsform durch Fieber, schweres Krankheitsgefühl mit Kopf- und Gliederschmerzen, häufig begleitet von Schüttelfrost, Übelkeit und Erbrechen, eine abdominelle Symptomatik muss dabei einer Sepsis nicht zwingend vorangehen (HEIN und KNAUFF 1978, DEDIÉ et al. 1993).

Andere extraintestinale Manifestationen

Weitere schwere, wenn auch seltene extraintestinale Verlaufsformen von *Y. enterocolitica* Infektionen stehen oftmals im Zusammenhang mit einer vorausgegangenen Sepsis. Generalisierte Lymphadenitis, Hepatitis und Splenomegalie kommen vor, fokale septische Metastasen können Meningitis, Lungen- und Leberabszesse, Arthritis, Osteomyelitis oder Endokarditis verursachen (DEDIÉ et al. 1993, BOTTONE 1999). Dabei handelt es sich oftmals um persistierende Infektionen, die über Jahre hinweg nachweisbar sind und immer wiederkehrende, akute Krankheitsschübe bedingen (HOOGKAMP-KORSTANJE et al. 1988).

Von Zusammenhängen zwischen einer *Y. enterocolitica* Infektion und einer autoimmunen Erkrankung der Schilddrüse (Grave's disease) ist berichtet worden (WENZEL et al. 1988). HEYMA et al. (1986) konnten TSH-Rezeptoren auf *Y. enterocolitica* nachweisen, die von TSH Antikörpern im Rahmen einer autoimmunen Erkrankung erkannt wurden.

Auch eine exsudative Pharyngitis mit Halsschmerzen ist häufig mit einer Yersiniose assoziiert (TAUXE et al. 1987) und kann als ein klinisches Kriterium für die Diagnose herangezogen werden (TACKET et al. 1983). Auswertungen von Meldestatistiken aus der ehemaligen DDR ergaben, dass Racheninfekte zusammen mit Durchfall als zweithäufigstes Symptom einer Yersiniose zu finden war und in 8,7% der Erkrankungsfälle mit *Y. enterocolitica* vorkam (DIESTERWEG 1992).

1.2.3 Immunpathologische Verlaufsformen

Immunpathologische Krankheitsgeschehen treten häufig als Folgeerscheinung nach durchgemachter enteralen Symptomatik auf (GRANFORS et al. 1980), und können den Charakter eines eigenständigen Krankheitsbildes annehmen (DEDIÉ et al. 1993). Sie stehen meist im Zusammenhang mit *Y. enterocolitica* Infektionen mit Bioserovar 4/O:3 oder 2/O:9 (NESBAKKEN 1992) und waren deshalb in der Vergangenheit vor allem in den Skandinavischen Ländern weit verbreitet (WINBLAD 1981).

Reaktive Arthritis

Hierbei handelt es sich um eine postinfektiöse, nichtseptische Arthritis, die durch eine extraartikuläre Infektion ausgelöst wird und bei der der ursächliche Erreger nicht lebend im Gelenk nachweisbar ist (PSCHYREMBEL 1994). Die Pathogenese dieses Krankheitsbildes ist noch weitgehend ungeklärt, eine genetische Prädisposition im Zusammenhang mit HLA-B27, einer Variante der körpereigenen Gewebeantigene, die auch mit Auftreten von Spondylitis ankylosans assoziiert ist, wird angenommen (DEQUEKER et al. 1980). Betroffen sind vorwiegend Hand-, Zehen- und Kniegelenke, seltener Ellenbogen-, Schulter-, Sternoklavicular- und Kiefergelenke. Auffallend ist, dass mehrere Gelenke zeitlich nacheinander betroffen sein können (HEIN und KNAUFF 1978). Symptomatisch äußert sich das Krankheitsgeschehen in einem typischen Entzündungsgeschehen: Rötung, Schwellung, Schmerzen, eingeschränkte Funktion, Fieber und bisweilen auch Gelenkserguss werden beobachtet (DEDIÉ et al. 1993). Meist flaut die Symptomatik innerhalb eines Zeitraums von drei Monaten wieder ab, aber auch chronische Krankheitsbilder und Rezidive kommen vor (AHVONEN 1972). Auch von Augenentzündungen in Form von Iritis, Uveitis und Conjunctivitis im Zusammenhang mit einer Arthritis ist berichtet worden, man spricht dann vom sogenannten „Reiter's Syndrom“. Augenentzündungen können aber auch solitär auftreten (AHVONEN 1972, HOOGKAMP-KORSTANJE et al. 1988).

Erythema nodosum

Dieses Krankheitsbild tritt vor allem bei Frauen auf. Einer Studie von AHVONEN (1972) zufolge waren bei fast 95 % der auftretenden Fälle Frauen betroffen. Das Erythema nodosum, auch Knotenrose genannt, ist eine akut-entzündliche Hauterkrankung der Subkutis mit

perivaskulärer Infiltration und sekundärer Granulombildung. Die klinischen Symptome sind rote, bis 5 cm große, unscharf begrenzte und nur gering erhabene druckschmerzhafte Knoten von teigig derber Konsistenz, die symmetrisch an Unterschenkelstreckseiten, Knie- und Fußgelenk, seltener auch Unterarmen und Gesäß auftreten können. Das Krankheitsbild wird häufig von einem allgemeines Krankheitsgefühl, Kopf- und Gelenkschmerz, und mäßigem Fieber begleitet. Eine Rückbildung der Knoten erfolgt innerhalb von drei bis sechs Wochen, Rezidive sind selten, aber möglich.

Pathogenetisch handelt es sich um eine allergische Hautreaktion in Form einer Immunkomplexvaskulitis und zellvermittelter Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV Allergie), die auch durch andere Krankheitserreger, wie Streptokokken, Toxoplasmen und Mykobakterien ausgelöst werden kann (PSCHYREMBEL 1994).

1.3 Das Krankheitsbild beim Tier

1.3.1 Schwein

Auch wenn *Y. enterocolitica* häufig auf Schweinetonsillen nachweisbar ist, gehört der Erreger nicht zur normalen Rachenflora, dies ist anhand von Untersuchungen an spezifisch pathogen freien Tieren belegt (CHRISTENSEN 1980). Die Infektion erfolgt in der Regel latent, zu einer Erkrankung kommt es erst dann wenn ungünstige Umwelt- oder Haltungsbedingungen hinzukommen, in Form einer sogenannten Faktorenerkrankung. Plötzlicher Futterwechsel, einseitige Ernährung, zu große Tierzahlen in beengten Raum können den Erreger aktivieren (WEIDENMÜLLER 1968). Jungtiere mit Darmparasitosen oder bei nasskalter Witterung sind besonders gefährdet, die klinische Yersiniose tritt deshalb überwiegend als Jungtiererkrankung auf. NATTERMANN et al. (1985, 1986) berichten über natürliche Krankheitsausbrüche in Schweinebeständen: bei Ferkeln wurden katarrhalische Enteritis, Serositis und Arthritis sowie Pneumonien beobachtet, bei Sauen kam es zu Fruchtbarkeitsstörungen und zu Aborten. Eine Infektion mit *Y. enterocolitica* 4/O:3 war die Ursache für eine systemische Erkrankung eines American Minipig-Ferkels mit letalem Ausgang. Pathologisch anatomisch konnten eine nekrotisierende Ileitis und Typhlocolitis mit gleichzeitig nekrotisierenden Veränderungen der regionalen Lymphknoten festgestellt werden, auch an Leber und Milz konnten pathologische Befunde erhoben werden, der Erregernachweis gelang aus allen genannten Organen. Ein Zusammenhang mit einer

vorangegangenen prophylaktischen Eisenapplikation wurde als Auslöser für die systemische Erkrankung angenommen (BRÜGMANN et al. 2001).

Experimentelle Infektionen von gnotobiotischen, neugeborenen Ferkeln führten bei einem Teil der Tiere zu Enteritis und Enterokolitis (TZIPORI et al. 1987). Ferkel, die mit hohen Dosen von *Y. enterocolitica* oral infiziert wurden, entwickelten auch purulente Meningoenzephalitis und nekrotisierende Entzündungen der Tonsillen (NAJDENSKI et al. 1998). Auch wenn die Tiere symptomlos waren, so schieden sie den Erreger in hohen Keimzahlen über mehrere Wochen hinweg mit der Faeces aus (NIELSEN et al. 1996). THIBODEAU et al. (1999) stellten fest, dass trotz der zeitlich limitierten Erregerexkretion mit dem Kot eine Besiedelung der Tonsillen bestehen bleibt. Bei einer feingeweblichen Untersuchung von Tonsillen klinisch gesunder, aber keimtragender Schlachtschweine stellten SHIOZAWA et al. (1991) bei allen untersuchten Tieren eine Tonsillitis mit Mikroabszessen fest.

1.3.2 Andere Haustiere

Auch Hund und Katze können an pathogenen *Y. enterocolitica* erkranken. Klinisch werden abdominale Zysten, blutig schleimiger Durchfall, Infektion der Analdrüsen und mesenteriale Adenitis beschrieben, häufig scheint die Infektion jedoch auch klinisch symptomlos zu verlaufen. Ähnlich wie bei der Situation beim Menschen erkranken Welpen häufiger als erwachsene Tiere (FUKUSHIMA et al. 1984, FANTASIA et al. 1993, FENWICK et al. 1994, HAYASHIDANI et al. 1995).

Sporadische Erkrankungen von Chinchillas stehen im Zusammenhang mit Infektionen mit Biovar 3 und Serovare O:3, O:1, oder O:2. Die Bedeutung dieser Bioserovare für den Menschen ist bis heute nicht geklärt. Die Chinchillas erkranken an einer fibrinösen Enterokolitis und Granulombildung auf den inneren Organen die einer Infektion mit *Y. pseudotuberculosis* ähnelt (WUTHE und ALEKSIC 1992).

Kleine Wiederkäuer, Hasen und Kaninchen können an diversen Serovaren des Biovars 5 erkranken, auch dieses Bioserovar spielt jedoch für die Erkrankung des Menschen keine wichtige Rolle.

1.4 Pathomechanismen und Virulenz des Erregers

Alle drei humanpathogenen *Yersinia* Spezies besitzen ein 70 Kilobasen (Kb) großes Virulenzplasmid mit der Bezeichnung pYV (Plasmid for *Yersinia* Virulenz) (GEMSKI et al. 1980), das eine gleiche Funktion erfüllt und in hohem Maße Homologie in den DNS Sequenzen aufweist (HEESEMAN et al. 1983). Durch Plasmidübertragungsversuche konnte gezeigt werden, dass wichtige Pathogenitätsfaktoren plasmidcodiert sind (HEESEMAN et al. 1984, PORTNOY und MARTINEZ 1985).

Bei der Expression plasmidcodierter Pathogenitätsmerkmale kann eine Temperatur- und Calciumabhängigkeit beobachtet werden. Bei Temperaturen von +37°C und der Abwesenheit von Calciumionen, wie das im Inneren der Wirtszelle der Fall ist, wird das Bakterienwachstum eingestellt. Stattdessen erfolgt dann die Expression von plasmidcodierten Proteinen, die für die Virulenz des Erregers verantwortlich sind. Calciumabhängiges Wachstum ist deshalb eine Eigenschaft von plasmidhaltigen Erregerstämmen (MURIANA 2002).

Ein wichtiges plasmidcodiertes Oberflächenprotein ist das *Yersinia* Adhäsion A (YadA), das durch *yadA* codiert wird und unter anderem an der Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszelle beteiligt ist (HEESEMAN und GRÜTER 1987), außerdem verhindert es die Phagozytose des Bakteriums durch neutrophile Granulozyten (RUCKDESCHEL et al. 1996) und ist verantwortlich für die sogenannte Serumresistenz, bei der die Bildung eines Membran-Angriff-Komplexes verhindert wird (HEESEMAN et al. 1983). Dadurch wird die Überlebensfähigkeit und weitere Ausbreitung des Erregers im Wirtsorganismus gewährleistet (BOTTONNE 1999). *Yersinia* Adhäsion A assoziierte Eigenschaften, wie Autoagglutination (LAIRD und CAVANAUGH 1980) und Hämagglutination (KAPPERUD et al. 1987) können zum Nachweis des Virulenzplasmids im Labor herangezogen werden.

Desweiteren werden verschiedene plasmidcodierte Proteine gebildet die sezerniert werden, als sogenannte Yops (*Yersinia* outer proteins). Diese Proteine können mit Hilfe des sogenannten Typ III Sekretionsapparates Ysc, einem Tunnel aus zahlreichen Proteinen, die ebenfalls plasmidcodiert sind, direkt in die Wirtszelle injiziert werden, wo sie dann körpereigene unspezifische Abwehrmechanismen wie Phagozytose durch Makrophagen und die Produktion verschiedener Cytokine als Ausdruck interzellulärer Kommunikation verhindern können (CORNELIS 1998). Yops haben eine sehr hohe Antigenität und werden deshalb auch zur De-

tektion von *Yersinia* spezifischen Antikörpern in Patientenserum herangezogen (MILENIA-BIOTECH 1999).

Zur vollen Ausprägung der Virulenz sind zusätzliche, chromosomal lokalisierte Gene notwendig. MILLER und FALKOW (1988) identifizierten zwei verschiedene Genloci, das Invasionsgen (*inv*) und das Attachment invasin locus (*ail*), die beide an der Invasion des Bakteriums beteiligt sind. Sowohl *Y. pseudotuberculosis*, als auch *Y. enterocolitica* besitzen ein bei beiden Arten homologes Gen *inv*, dessen Proteinprodukt Invasin eine gewebeunabhängige Invasion ermöglicht. Dieses *inv* Gen ist auch bei nicht pathogenen Stämmen von Yersinien nachweisbar, auch diese Stämme sind damit in der Lage, wenn auch verlangsamt, die Peyerschen Platten zu besiedeln (PEPE und MILLER 1993). Stämme ohne Virulenzplasmid werden nach der Invasion jedoch durch eine Invasin induzierte Phagozytose eliminiert (DEDIÉ et al. 1993). Daneben existiert das gewebespezifische Protein Ail, das nur bei pathogenen Spezies von *Yersinia* zu finden ist.

Bioserovar 1B/O:8 besitzt ein zusätzliches, chromosomales DNS Fragment, das sogenannte "high pathogenicity-island" (HPI), das für die hohe Pathogenität dieses Bioserovars verantwortlich ist (CARNIEL et al. 1992). Es codiert für das Yersiniabactin, einem Siderophor (Eisenträger), das es diesem Bioserovar ermöglicht, Eisenionen einzufangen und mit Hilfe der Siderophorrezeptoren intrazellulär aufzunehmen (HEESEMANN 1987). Dadurch wird eine systemische Erregerausbreitung möglich. Auch bei *Y. pseudotuberculosis* (BUCHRIESER et al. 1998) und *Y. pestis* (DE ALMEIDA et al. 1993) gibt es HPIs.

Die Bedeutung eines chromosomal-codierten, hitzestabilen Enterotoxins (Yst) von *Y. enterocolitica* ist bisher nicht restlos geklärt. Es wird in vitro nur bei Temperaturen unter 30°C gebildet und kann deshalb bei der Pathogenese einer Enteritis im Menschen keine Rolle spielen. Eine Toxinproduktion in Lebensmitteln, die dann zu einem Intoxikationsgeschehen, analog dem *Staphylococcus aureus* Enterotoxin führen kann, ist denkbar (BAUMGART 1999).

Der Ort an dem *Y. enterocolitica* seine krankmachende Wirkung entfaltet, ist das terminale Ileum (BOTTONNE 1999). Der Erreger überwindet die Epithelbarriere der Darmschleimhaut über die sogenannten M-Zellen. Dies sind spezialisierte Epithelzellen, die keinen Bürstensaum aufweisen, zur Phagozytose befähigt sind (AUTENRIETH und FIRSCHING

1996, HOF und DÖRRIES 2002) und eine rezeptorvermittelte Endozytose ermöglichen (HANSKI et al. 1989). An der Anheftung und Invasion des Bakteriums sind chromosomale (Inv und Ail), sowie plasmidcodierte (Yad A) Oberflächenproteine beteiligt (HEESEMANN und GRÜTER 1987, MILLER und FALKOW 1988).

Es folgt die Ansiedelung in den Peyerschen Platten, einer Ansammlung von Lymphfollikeln, die Bestandteil des sogenannten Gut Associated Lymphoid Tissue sind. Hier vermehrt sich *Y. enterocolitica*, meistens extrazellulär, nur eine kleiner Prozentsatz vermehrt sich in den Phagozyten (HANSKI et al. 1989). Das Vorhandensein eines Virulenzplasmids ist dann Voraussetzung dafür, dass Yersinien im Wirtsorganismus überleben können. Apathogene *Yersinia* Spezies, welche dieses Virulenzplasmid nicht besitzen, werden nach erfolgreicher Invasion in die Peyerschen Platten durch eine Invasin induzierte Phagozytose eliminiert (DEDIÉ et al. 1993).

Pathogene Yersinien können sich in der *Lamina propria mucosae* ausbreiten und ein unspezifisches Entzündungsgeschehen mit diffuser lympho-plasmazellulärer Infiltration und Zerstörung von Epithelzellen auslösen (HOOGKAMP-KORSTANJE und DE KONING 1990). Nach lymphogener Streuung in die mesenterialen Lymphknoten sind auch diese vergrößert und entzündet. Eine weitere Ausbreitung der Erreger auf dem Lymph- und Blutweg in andere Organe ist in Abhängigkeit von der Resistenzlage des Patienten möglich (DEDIÉ et al. 1993) (**Abbildung 1**).

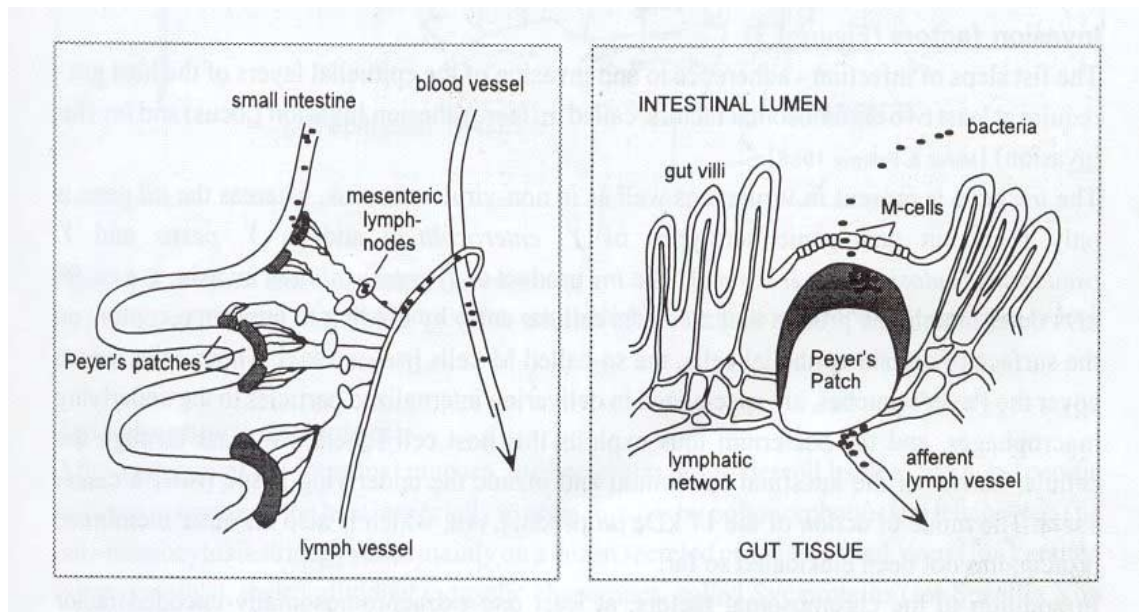


Abbildung 1: Eintrittspforte von *Y. enterocolitica* und weitere Ausbreitung im menschlichen Organismus (nach GOVERDE 1999)

Die pathogenetische Grundlage der gelegentlich auftretenden reaktiven Arthritis ist bisher unzureichend geklärt, eine genetische Prädisposition im Zusammenhang mit HLA-B27, einer Variante der körpereigenen Gewebeantigene, die auch mit Auftreten von Spondylitis ankylosans assoziiert ist, wird angenommen (DEQUEKER et al. 1980). Einer Theorie von WUORELA et al. (1997) zufolge soll eine Antigenpräsentation über MHC-Moleküle durch Monozyten nach einer Phagozytose von *Y. enterocolitica* verhindert werden, eine T- bzw. B-Zellaktivierung somit ausbleiben, und die Infektion in den Gelenken persistieren. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zu einer Veränderung dieser MHC-Moleküle die somit nicht mehr als körpereigen erkannt werden und zu einer autoimmunassoziierten reaktiven Arthritis führen.

1.5 Behandlung der Yersiniose

Die Behandlung der Yersiniose beim Menschen ist von der Schwere des Krankheitsbildes abhängig. Bei den zumeist leichten Verläufen mit guter Selbstheilungstendenz beschränkt man sich auf symptomatische Maßnahmen, klinische und experimentelle Studien weisen auf die Ineffektivität einer Antibiose bei gastroenteritischer Symptomatik hin (AHVONEN 1972, BEYER 1979, PAI et al. 1984).

Eine antibiotische Therapie ist bei schweren Krankheitsformen, insbesondere bei Sepsis und septischen Komplikationen indiziert. Zur Anwendung kommen Trimethoprim-Sulfmethoxazol, Amoxicillin, Doxycyclin, Ciprofloxacin, Gentamycin und Tetrazykline (HOOGKAMP-KORSTANJE und STOLK-ENGELAAR 1995). ZHANG et al. (1997) zeigte anhand von Ratten als Modelltier, dass eine reaktive Arthritis durch eine frühe antibiotische Intervention mit Ciprofloxacin verhindert werden kann.

Y. enterocolitica ist *in vitro* empfindlich gegenüber Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Gentamycin, Tetracykline und Trimethoprim (PHAM et al. 1991), sowie gegen Amoxicillin, Cefuroxim, Ceftazidim und Cotrimoxazol (HOOGKAMP-KORSTANJE und STOLK-ENGELAAR 1995). Der Erreger produziert β -Lactamase und ist deshalb resistent gegenüber Penicillinen, wie Penicillin, Ampicillin, Carbenicillin und Cephalosporinen der ersten Generation wie Cefazolin (DEDIÉ et al. 1993).

2 Epidemiologie

2.1 Vorkommen und Verbreitung beim Menschen

2.1.1 Geographische Verteilung

Die Yersiniose des Menschen ist weltweit verbreitet. Sie kommt in den gemäßigten und subtropischen Klimazonen Europas, Nord- Südamerikas, in Nord- und Ostasien, sowie in Australien und Südafrika vor. Nicht zu finden ist die Erkrankung in tropischen Gebieten Afrikas und Südostasiens (DEDIÉ et al. 1993).

Y. enterocolitica Stämme, die mit menschlichen Erkrankungsfällen in Verbindung gebracht werden, gehören folgenden Bioserovaren an: 4/O:3, 2/O:9, 2/O:5,27, 1B/O:8, 3/O:3.

Diese Bioserovare zeigen eine unterschiedliche geographische Verbreitung. In Europa, Japan, Canada und den USA wird vor allem Bioserovar 4/O:3 als Auslöser der humanen Yersiniose verantwortlich gemacht (BOTTONE 1999). FUKUSHIMA et al. (1984), sowie ZHENG und XIE (1996) berichten von einer weiten Verbreitung von 3/O:3 in Ostasien (Japan und China), Bioserovar 2/O:9 wird am häufigsten in Europa isoliert, während Bioserovar 2/O:5,27 weit verbreitet ist. Geographische Grenzen scheinen sich jedoch immer mehr zu verwischen. Das Vorkommen von 1B/O:8 war in der Vergangenheit weitgehend auf die USA beschränkt, und bis 1983 das dort vorherrschende Bioserovar. Danach wurde es immer mehr von Bioserovar 4/O:3 verdrängt (BOTTONE 1999), während das Bioserovar 1B/O:8 inzwischen auch in europäischen Ländern isoliert wurde (HOOGKAMP-KORSTANJE et al. 1986).

2.1.2 Die Yersiniose in Europa und anderen Kontinenten

Inzwischen rangiert *Yersinia* in vielen Ländern auf Platz 3 der Durchfallerreger, nach *Salmonella* und *Campylobacter*. Warum die Zahl der Yersiniosefälle zunimmt ist nicht vollständig geklärt. Die Intensivhaltung von Nutztieren, die industrielle Fleisch- und Nahrungsmittelproduktion mit komplexen Distributionswegen sowie langen Kühlketten und Lagerzeiten, die eine Anreicherung kälteliebender Bakterien möglich machen, sowie die Globalisierung des Tier-, Fleisch- und Lebensmittelhandels werden als mögliche Ursachen diskutiert (NEUBAUER et al. 2001c).

Da dieser Krankheit in nur wenigen Ländern Beachtung geschenkt wird, sind globale Inzidenzen nur sehr unvollständig. Trotzdem lassen sich gewisse Tendenzen erkennen. Vor allem in den kühleren europäischen Ländern wie Skandinavien und Belgien ist *Y. enterocolitica* endemisch verbreitet. Eine mittlere Yersiniose-Inzidenz (Anzahl der Erkrankten/ Einwohner) findet man in Norwegen, den Niederlanden und Großbritannien. In Zentral- und Südeuropa scheint die Yersiniose weniger stark verbreitet zu sein (GOVERDE 1999).

In manchen Regionen der USA und Kanadas ist *Yersinia* nach *Salmonella* der zweithäufigste Erreger von bakteriellen Enteritiden (LEE et al. 1991), Yersinien werden deshalb staatlicherseits als "emerging foodborne pathogen" betrachtet und das Vorkommen von Yersiniosen detailliert dokumentiert (OSTROFF 1995).

2.1.3 Die Yersiniose in Deutschland

Bioserovar 4/O:3 ist in Nordeuropa am weitesten verbreitet bei Menschen mit gastroenteralen Beschwerden (BORCH et al. 1996) und wird auch in Deutschland am häufigsten isoliert. Dieses Bioserovar machte im Jahr 2001 89,9% aller gemeldeten Yersiniosefälle in Deutschland aus, desweiteren wurden pathogene *Y. enterocolitica* des Bioserovars 2/O:9 (5,8%) und 2/O:5,27 (0,7%) mit menschlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2002b). Das ROBERT KOCH INSTITUT (2002a) berichtet über das erstmalige Auftreten einer *Y. enterocolitica* Infektion ausgelöst durch das Bioserovar 1B/O:8 im Oktober 2001. Dieses Bioserovar war bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht in Deutschland aufgetreten.

Organisation der statistischen Erfassung

Bereits im vergangenen Jahrhundert wurde zum Zwecke des schnellen Erkennens einer Epidemie und wirkungsvollen Bekämpfung und Krankheitsüberwachung durch verschiedene Länder eine Meldepflicht für bestimmte übertragbare Krankheiten eingeführt. In Deutschland bestand erstmals 1835 für Cholera, Typhus, Ruhr und Pocken Meldepflicht, die im Seuchengesetz des Deutschen Reiches 1900 auf weitere übertragbare Krankheiten ausgedehnt wurde. Die Meldungen sollen vor allem kurzfristig einsetzende Maßnahmen der Krankheitsbekämpfung ermöglichen, liefern zugleich aber auch wichtige epidemiologische Informationen

zur Verbreitung der betreffenden Krankheit. Das entscheidende Problem der auf ärztlicher Meldung beruhenden Statistik in Hinblick auf ihre epidemiologische Aussagekraft ist ihre Vollständigkeit (HEINEMANN und SINNECKER 1994). Meldungen sind in diesem Sinne staatlich vorgeschriebene Informationen über das Auftreten von Fällen bestimmter Infektionskrankheiten von allgemeiner Bedeutung an die zuständige lokale Gesundheitsbehörde. Die erlassenen Meldevorschriften sind Ausdruck der staatlichen Verantwortung für die Verhütung und Bekämpfung wichtiger Infektionskrankheiten.

Jedes Meldesystem für übertragbare Krankheiten ist laut KIEHL (1994) hierarchisch gegliedert und arbeitet auf 4 Ebenen:

1. Kommunale Gesundheitsbehörde (Ort/Kreis des Auftretens der Krankheit, Sammlung von Basisdaten)
2. Gesundheitsbehörde des Verwaltungsbezirkes (Bundesland)
3. Nationale Gesundheitsbehörde (Gesundheitsministerium und direkt nachgeordnete Fachorgane)
4. Internationale Gesundheitsbehörden (Hauptquartier, Regionalbüro oder Referenzzentren der WHO)

Für darmpathogene *Y. enterocolitica* ist eine namentliche Meldung des direkten oder indirekten Labornachweises gemäß § 7 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) vorgeschrieben.

Die Meldung erfolgt an das Gesundheitsamt der Hauptwohnung des namentlich gemeldeten Erkrankten und wird von dort wöchentlich an die zuständige Landesbehörde weitergeleitet. Die Landesbehörde übermittelt die gesammelten Daten dann weiter an das Robert-Koch-Institut (§11 IfSG).

Auf nationaler Ebene fließen die gesammelten Daten im Robert-Koch-Institut zusammen. Dies ist die zentrale Forschungs- und Referenzeinrichtung des Bundesministeriums für Gesundheit auf dem Gebiet der biomedizinischen Wissenschaften, insbesondere der Infektionskrankheiten. Dem Institut fällt sowohl die Beobachtung des Auftretens von Krankheiten und relevanten Gesundheitsgefahren in der Bevölkerung zu, als auch das Ableiten und wissenschaftliche Begründen der erforderlichen Maßnahmen zum wirkungsvollen Schutz der Gesundheit der Bevölkerung (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2002c). Meldungen werden wöchentlich (aktuelle Statistik), vierteljährlich (Quartalstatistik) und jährlich (Jahresbericht) veröffentlicht, und erlauben Aussagen bezüglich der Inzidenz des Erregers in den einzelnen

Bundesländern (geographische Verteilung) und Gesamtdeutschland, Alters- und Geschlechtsverteilung der Erkrankten (demographische Verteilung), sowie saisonale Schwankungen des Erregers.

Die Inzidenz des Erregers in Deutschland

Die von 1978-1989 bestehende Meldepflicht für *Y. enterocolitica* in der ehemaligen DDR gibt durch die Auswertung der Meldungen einen guten Überblick über die damalige Verbreitung von *Y. enterocolitica*, die kulturellen und serologischen Nachweisraten, sowie Altersverteilung, jahreszeitlicher Verlauf und Symptome der Erkrankung (DIESTERWEG 1992). Yersinien wurden hier bereits in die mikrobiologische Routinediagnostik mit einbezogen und lagen im Bezug auf die Nachweishäufigkeit im Vergleich mit anderen Durchfallerregern nach Salmonellen, Shigellen und Campylobacter an vierter Stelle. Auch hier kam dem Serovar O:3 die größte Bedeutung zu.

Für die Jahre 1992 bis 2000 liegen dem Robert-Koch-Institut nur Zahlen aus einzelnen Bundesländern vor, aus Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen, Brandenburg, sowie aus Berlin, Bremen, Hamburg, Hessen, Saarland und Nordrhein-Westfalen (Robert-Koch-Institut und statistisches Bundesamt 2002) (**Abbildung 2**).

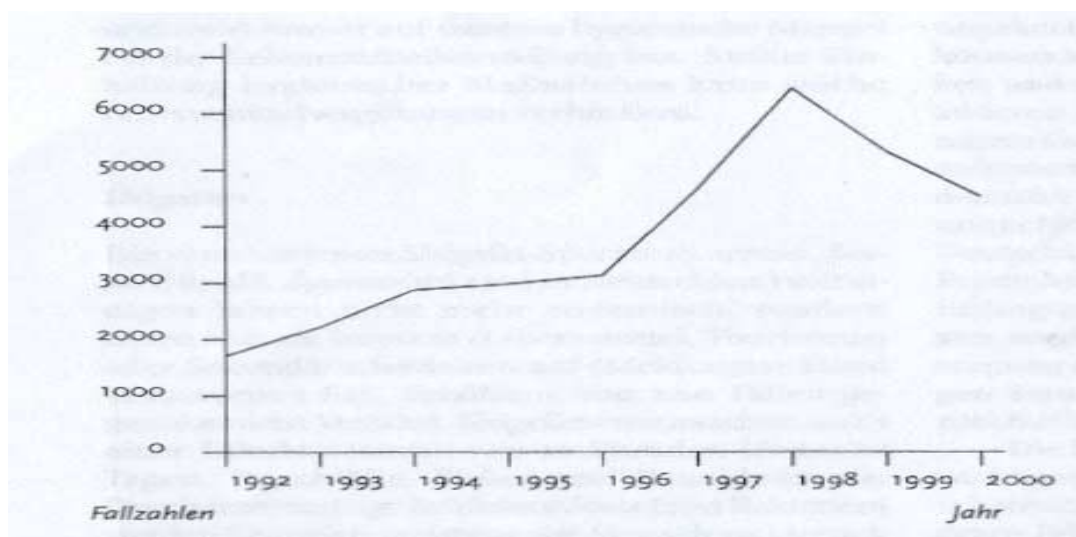


Abbildung 2: *Yersinia* Infektionen 1992-2000 aus einigen Bundesländern (RKI und STATISTISCHES BUNDESAMT 2002)

In den restlichen Bundesländern wurden Meldungen im Rahmen des ehemals geltenden Bundesseuchengesetz (BSG) lediglich unter der zusammenfassenden Meldekategorie "Enteritis infectiosa - übrige Formen" erfasst (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2002b).

Y. enterocolitica Infektionen wurden in Deutschland mit der Einführung des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) im Jahre 2001 erstmals namentlich meldepflichtig. Gemeldete Fälle werden dabei verschiedenen Falldefinitionen zugewiesen: nur klinisch-labordiagnostisch und klinisch-epidemiologisch erfasste Yersiniose Fälle gehen als sogenannte Referenzdefinition in die Jahresstatistik der Yersiniosen ein. Ist von einem gemeldeten Yersiniosefall beispielsweise nur die labordiagnostische Erregerisolierung bekannt, nicht aber das klinische Krankheitsbild, so wird dieser Fall nicht in der Jahresstatistik berücksichtigt (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2002b).

Humanpathogene *Y. enterocolitica* Stämme sind in Deutschland die dritthäufigsten bakteriellen Erreger von Nahrungsmittelinfektionen. Im Jahr 2000 wurden 4500 Fälle gemeldet, für das Jahr 2001 liegen insgesamt 7186 Meldungen von *Y. enterocolitica* Infektionen vor (ROBERT-KOCH-INSTITUT und STATISTISCHES BUNDESAMT 2002). Meldezahlen vor 2001 sind jedoch nicht vergleichbar, da bis dato keine spezifische Meldepflicht für den Erreger bestand und der Erreger deshalb nur in einigen wenigen Bundesländern statistisch erfasst wurde. Auch diese Zahlen sind nur eingeschränkt verwertbar, da ehemalige Meldungen keinen Falldefinitionen unterlagen (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2002b).

Die Inzidenz der Yersiniose in Deutschland zeigt starke regionale Unterschiede. Am häufigsten wurde sie in Thüringen registriert (26.9 Fälle pro 100 000 Einwohner), am seltensten in Bayern (4.9 pro 100 000 Einwohner) (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Inzidenz der Yersiniose in Deutschland

Bundesland	2000		2001	
	Gesamtzahl der Fälle	Pro 100 000 Einwohner	Gesamtzahl der Fälle	Pro 100 000 Einwohner
Baden-Württemberg	k.A. ^a	k.A.	566	5.4
Bayern	k.A.	k.A.	594	4.9
Berlin	58	1.7	253	7.4
Brandenburg	72	2.8	313	12.0
Bremen	16	2.4	48	6.9
Hamburg	35	2.1	189	11.1
Hessen	83	1.4	364	6.1
Mecklenburg-Vorpommern	63	3.5	343	19.1
Niedersachsen	k.A.	k.A.	670	8.5
Nordrhein-Westfalen	344	1.9	1133	6.3
Rheinland-Pfalz	k.A.	k.A.	351	8.9
Saarland	23	2.1	74	6.7
Sachsen	258	5.8	722	16.0
Sachsen-Anhalt	125	4.7	591	21.9
Schleswig-Holstein	k.A.	k.A.	229	8.2
Thüringen	116	4.7	673	26.9
Summe			7113	8.7

^a k.A. keine Angaben

Wie HOOBKAMP-KORSTANJE et al. (1986) mit einer Studie zeigten, ist die Inzidenz von *Y. enterocolitica* zu einem großen Anteil davon abhängig, wie viel Interesse diesem Erreger geschenkt wird. Wurde in einem Labor routinemäßig auf *Y. enterocolitica* untersucht, so waren fast doppelt so viele positive Befunde zu verzeichnen als wenn die Untersuchung nur auf Aufforderung des einsendenden Arztes hin durchgeführt wurde. Diese Studie macht auch deutlich, dass Kliniker diesen Erreger nur selten in ihre differentialdiagnostischen Überlegungen mit einbeziehen. Es bestehen zudem keine einheitlichen Untersuchungsmethoden, auch dies hat unterschiedliche Nachweisraten zur Folge. Dass die tatsächliche Infektionsrate mit *Y. enterocolitica* höher als die Zahl der gemeldeten Fälle ist, lassen auch Studien zur Seroprävalenz des Erregers vermuten: gemäß MÄKI-IKOLA et al. (1997) wird die Prävalenz von *Y. enterocolitica* O:3/O:9 spezifischen Antikörpern in deutschen Blutspendern mit 43 % angegeben.

2.2 Infektionsquellen

2.2.1 Tiere

Schon seit langem nahm man an, dass Tiere ein wichtiges Erregerreservoir für die menschliche Yersiniose darstellen, in zahlreichen Studien wurde deshalb versucht *Y. enterocolitica* aus Tieren zu isolieren (NATTERMANN et al. 1986, COVER und ABER 1989, FANTASIA et al. 1993). Auch wenn es dabei gelang zahlreiche *Y. enterocolitica* Stämme zu isolieren, so unterschieden sich diese Isolate meist biochemisch und serologisch von den Stämmen, die als Auslöser der menschlichen Yersiniose von Bedeutung sind.

Aus Schweinen jedoch wurden häufig humanpathogen relevante Bioserovare nachgewiesen, Schweine sind in unterschiedlicher Häufigkeit, meist latent mit *Y. enterocolitica* infiziert und scheiden den Erreger unter anderem mit dem Kot aus. Schweinefäces dürfte aber als Kontaminationsquelle nur eine untergeordnete Rolle spielen. Die Nachweisraten humanpathogener Serogruppen in Schweinefäces liegen in Deutschland zwischen 0,1% und 5,1%, in anderen Ländern zwischen 0% in England und 19% in Kanada (BÜLTE et al. 1991). Vor allem die Tonsillen und die Zunge des Schweines werden als wichtigste Kontaminationsquellen für die menschliche Yersiniose angesehen, dem Bioserovar 4/O:3 kommt dabei die größte Bedeutung zu (CHRISTENSEN 1987, SCHIEMANN 1989, BORCH et al. 1996, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000a, 2001a, BUCHER 2001).

In einem Untersuchungszeitraum von 1981 bis 2001 berichten verschiedene Autoren von ganz unterschiedlichen Untersuchungsergebnissen, in Deutschland wurden zwischen 6,1% und 60% *Y. enterocolitica* positive Tonsillenproben nachgewiesen (BOCKEMÜHL und ROTH 1978, WEBER und LEMBKE 1981a, HUGENBERG 1999, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a). Unterschiedliche Nachweisverfahren dürften dabei einen direkten Vergleich dieser

Ergebnisse schwierig machen. Untersuchungen in anderen Ländern ergaben, dass die Tonsillen durchschnittlich zu 27,4% besiedelt waren, wobei die Werte zwischen 0,0% in England und 61,1% in Belgien schwankten (BÜLTE et al. 1991).

Auch Rinder können Träger pathogener *Y. enterocolitica* Isolate sein und scheiden diese mit der Fäces aus. Das Bioserovar 2/O:9 scheint dabei vorherrschend zu sein (ALEKSIC und

BOCKEMÜHL 1996). Serologische Bestandsuntersuchungen in Frankreich und Belgien erbrachten eine Seroprävalenz von 10% aller Tier (WEYNANTS et al. 1996). In Deutschland untersuchte BUCHER et al. (2002) das Vorkommen pathogener Yersinien bei Kälbern und Jungriedern und konnte weder aus Faeces noch aus den Tonsillen pathogene Yersinien isolieren, apathogene Yersinien waren jedoch nachweisbar.

Hunde und Katzen stehen aufgrund ihres engen Kontaktes zum Menschen im Verdacht als Erregerreservoir für den Menschen eine Rolle zu spielen (SCHIEMANN 1989), zahlreichen Autoren gelang es bereits das Bioserovar 4/O:3 zu isolieren (FUKUSHIMA et al. 1984, FENWICK et al. 1994, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001c). Aus Deutschland berichten WEBER und LEMBKE (1981b) über erfolgreiche Isolierungen humanpathogener Yersinien, weitreichende epidemiologische Studien fehlen jedoch bisher.

2.2.2 Umwelt

Während sich apathogene *Y. enterocolitica* des Bioserovars 1A offensichtlich in der Umwelt und unabhängig von einem belebten Wirtsorganismus vermehren können, trifft dies für die pathogenen Bioserovare wahrscheinlich nicht zu (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Doch auch pathogene Bioserovare können in der Außenwelt überleben, wobei dann kontaminierte Oberflächengewässer, Vegetation oder Boden zu einer Infektionsquelle für Mensch und Tier werden können. In Südbayern konnten sowohl aus zentralen als auch aus Einzel-Trinkwasserversorgungsanlagen *Y. enterocolitica* Stämme isoliert werden (SCHINDLER 1984), die auf eine fäkale Verunreinigung zurückzuführen waren. Bei Umgebungsuntersuchungen an einem Schweineschlachthof wurden ebenfalls pathogene Yersinien nachgewiesen, kontaminierte Geräte und auch das Schlachthofpersonal können somit als Kontaminationsquelle für Schweineschlachtkörper eine Rolle spielen (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000b). KOCH (2002) wies pathogene Yersinien auf Arbeitsflächen sowie an Kettenhandschuhen einer Metzgerei nach.

2.2.3 Lebensmittel

Das Schwein ist das am häufigsten zur Lebensmittelerzeugung dienende Tier welches pathogene Stämme von *Y. enterocolitica* beherbergt (DE BOER et al. 1986, SCHIEMANN 1989, BUCHER et al. 2001). Sind primär nur der Kot und die Tonsillen mit pathogenen Yersinien

besiedelt, so führen einzelne Verfahrensschritte im Schlachtprozess und bei der Verarbeitung zu einer Keimverschleppung auf den Schlachtkörper und auf sämtliche innere Organe (ANDERSEN 1988, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000b, BUCHER 2001). Auf Einzelhandelsebene gelang der Nachweis von *Y. enterocolitica* aus Schweinefleisch nur selten (NESBAKKEN et al. 1985, ASPLUND et al. 1990, FUKUSHIMA et al. 1997), einer unveröffentlichten Studie von Wauters aus den 80er Jahren in Belgien zufolge waren 20,7 % untersuchter Hackfleischproben O:3 positiv (TAUXE et al. 1987). HANK (2002) konnte bei ihren Untersuchungen in Deutschland in 9% aller untersuchten Hackfleischproben pathogene Yersinien nachweisen, in Muskelfleischproben waren es 7,4 %. Mittels moderner Nachweismethoden konnte die Nachweisrate aus Hackfleisch gegenüber dem kulturellem Verfahren von 2% auf 25% gesteigert werden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999b).

Y. enterocolitica konnte in zahlreichen anderen Lebensmitteln nachgewiesen werden, u.a. aus Fisch, Geflügel, Eiprodukten, Obst und Gemüse (DELMAS und VIDON 1985, NATTERMANN et al. 1985, de BOER et al. 1986). Diese Studien müssen jedoch kritisch beurteilt werden: zu der Spezies *Y. enterocolitica* gehörten bis 1988 auch die heute als apathogen bezeichneten Spezies *Y. molaratii* und *Y. bercovier*. Unvollständige Typisierung (nur Serotypisierung) war ebenfalls in der Vergangenheit üblich, weit verbreitete Umweltstämme könnten diese Ergebnisse somit verfälscht haben. In einer neueren Studie (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001d) war der Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* aus Fisch und Hähnchen stets negativ, trotz Anwendung einer sensitiveren Methode wie der PCR.

Milch wird immer wieder als Kontaminationsquelle für Infektionen mit *Y. enterocolitica* erwähnt (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990, BLACK et al. 1978, BARRETT 1986). In allen berichteten Fällen konnte jedoch keine originäre Besiedelung der Milch festgestellt werden, sondern es war immer eine Sekundärkontamination erfolgt. Milch diene somit nur als Vehikel, dessen Milieu eine Überlebensfähigkeit von *Y. enterocolitica* positiv beeinflusst.

2.2.4 Mensch

An einer akuten Yersiniose Erkrankte scheiden den Erreger mit dem Stuhl aus und stellen so eine Infektionsquelle für Kontaktpersonen dar. Jedoch auch symptomlose Dauerauscheider

kommen vor (WUTHE et al. 1982, VAN NOYEN et al. 1987) an der sich Mitmenschen anstecken können.

Indirekt kann eine Übertragung über kontaminierte Bluttransfusionen erfolgen. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass Blutspender mit symptomloser Bakteriämie vorkommen, sich das Bakterium auch bei 4°C (Lagertemperatur von Spenderblut) noch vermehren kann, und alternde Erythrozyten eine hervorragende Eisenquelle darstellen, welche *Yersinien* sich mittels Eisenrezeptoren zunutze machen (BOTTONNE 1999).

2.3 Übertragungswege

Die Übertragung von *Y. enterocolitica* bei Mensch und Tier erfolgt überwiegend oral alimentär, dafür sprechen gemäß DEDIÉ et al. (1993) der häufige Erregernachweis aus Tonsillen und Kot von Keimträgern, der Sitz des Primäraffektes in der Darmschleimhaut und die nicht seltene Mischinfektionen mit anderen enteropathogenen Keimarten. Im Wesentlichen werden drei verschiedene Wege diskutiert, wie es zu einer *Y. enterocolitica* Infektion kommen kann.

2.3.1 Lebensmittel

Von den bisher in der Literatur beschriebenen *Y. enterocolitica* Erkrankungen, die auf den Genuss von kontaminierten Lebensmitteln oder Wasser zurückzuführen waren, ist eine lückenlose Aufklärung der epidemiologischen Zusammenhänge nur selten befriedigend gelungen. Die in der Regel recht lange Inkubationszeit von sieben bis zehn Tagen erschwert zudem in den meisten Fällen die retrospektive Ermittlung der Infektionsursache (DEDIÉ et al. 1993). Die geringen Erfolge bei der Erregerisolierung aus Lebensmitteln dürften auch darauf zurückzuführen sein, dass apathogene Umweltstämme von *Yersinia* Spezies in der Umwelt weit verbreitet sind und damit die Diagnostik von pathogenen Vertretern erschwert wird (SCHIEMANN 1989).

Immer wieder wurde in der Vergangenheit von größeren Krankheitsausbrüchen berichtet. AULISIO et al. (1982) berichtet von einem Krankheitsgeschehen in dem drei nordamerikanische Staaten involviert waren und annähernd tausend Menschen erkrankten. Die meisten aufgeklärten Fälle werden aus den USA berichtet (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Lebensmittel-assoziierte Krankheitsausbrüche durch *Yersinia enterocolitica*
(nach COVER und ABER 1989, BOTTONE 1999)

Jahr	Ort	Serotyp	Anzahl Fälle	Vehikel
1971	Eine Schule in der Tschechoslowakei	O:3?	15	Unbekannt
1972	Eine Schule in Japan	O:3	198	Unbekannt
1976	Kanada	O:5,27	138	Rohe Milch?
1976	High school in New York	O:8	228	Schokoladenmilch
1980	Japan	O:3	1051	Milch
1981	Sommercamp in New York	O:8	159	Milchpulver
1981-2	Washington	O:8	50	Tofu, Brunnenwasser
1982	3 Staaten in den USA	O:13a, 13b	172	Pasteurisierte Milch?
1983	Ungarn	O:3	8	Schweinefleisch (Wurst)
1989	Haushalt in Georgia	O:3	15	Chitterlings
1990	Atlanta, zahlreiche Ausbrüche	O:3	?	Chitterlings
1995	Vermont, New Hampshire	O:8	10	Pasteurisierte Milch, Schwein

Fallstudien in Belgien, dem Land mit der höchsten Inzidenzrate an *Y. enterocolitica*, belegen den Bezug zu rohem Schweinefleisch (TAUXE et al. 1987). Im Zuge einer 1985 durchgeführten Fall-Kontrollstudie konnte der Verzehr von rohem oder nicht vollständig durcherhitztem Schweinefleisch oder -produkten als der wichtigste Faktor für das Auftreten klinischer Yersiniosen des Menschen identifiziert werden. Als Ursache für die Kontamination von Fleisch wurden einzelne Verfahrensschritte beim Schlachtprozess und bei der Verarbeitung ermittelt die eine Erregerstreuung ausgehend von den Tonsillen ermöglichten. Mit der Rohware gelangt dann der Erreger in die Küche. Bei Vernachlässigung hygienischer Grundregeln kann es zu Kreuzkontaminationen mit anderen Speisen kommen. Nicht ausreichend durcherhitztes Schweinefleisch und das Verkosten von rohem Hackfleisch stellen weitere Infektionsrisiken dar (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a, NEUBAUER et al. 2001b). Durch landesweite Aufklärungsaktionen in den Medien, ergänzt durch gezielte Veränderungen im Schlachtablauf konnte die Gesamtzahl der in Belgien registrierten humanen Yersiniosen in einem Zeitraum von 1986 bis 1996 halbiert werden (VERHAEGEN et al. 1998).

In den USA waren mehrere Ausbrüche von Yersiniose auf den Verzehr von "chitterlings" zurückzuführen, einem Traditionsgericht von Afroamerikanern, das aus rohen Schweinedärmen zubereitet wird (LEE et al. 1991). Auch in Deutschland ist der Verzehr von Produkten mit rohem Schweinefleisch in Form von Schweinemett oder Hackepeter weit verbreitet. Demgegenüber stehen Beobachtungen in moslemischen Ländern, in denen Infektionen mit *Y. enterocolitica* selten sind (SAMADI et al. 1982).

2.3.2 Tiere

Schweine werden als Hauptinfektionsquelle für menschliche Infektionen mit Bioserovar 4/O:3 diskutiert. Die Erregerübertragung zwischen den Tieren erfolgt über erregerhaltigen Kot und die damit kontaminierte Umgebung wie Ställe, Ausläufe und Oberflächengewässer (DEDIÉ et al. 1993), auch eine Infektion über Futtermittel tierischer Herkunft, vor allem aus der Schweinefleischverarbeitung ist denkbar (NIELSEN et al. 1995). Die Ausbreitung von *Y. enterocolitica* in den Schweinebeständen in den 70er und 80er Jahren wird durch den Wandel der Schweinehaltungsformen hin zu Großmastanlagen erklärt (VERHAEGEN et al. 1998). Regional unterschiedliche Inzidenzen bestehen aufgrund unterschiedlicher landwirtschaftlicher Praktiken, so war die extrem hohe Inzidenz in dänischen Schweinepopulationen auf offene Herdenmanagementsysteme zurückzuführen. Durch den Zukauf von bereits infizierten Ferkeln wurde der Bestand in kürzester Zeit durchseucht (CHRISTENSEN 1980). Der Hygienestandard nimmt ebenfalls Einfluss auf die Erregerausbreitung und dürfte der Grund dafür sein, dass verschiedene Herden eines gleichen geographischen Gebietes sehr unterschiedliche Infektionsraten aufweisen (VARNHAM und EVANS 1991).

Untersuchungen an Schlachthofangestellten und Schweinebauern in Finnland haben gezeigt, dass diese Berufsgruppen zweimal häufiger erhöhte Antikörperspiegel gegen *Y. enterocolitica* O:3 aufwiesen als Getreide- oder Obstbauern (SEURI und GRANFORS 1992).

Auch Hunde und Katzen kommen als Erregerüberträger der menschlichen Yersiniose in Frage, humanpathogene Yersinien wurden aus Fäces von Hund und Katze isoliert. Ähnlich wie beim Menschen dürfte rohes und nicht vollständig durcherhitztes Schweinefleisch eine Rolle spielen, welches von Tierbesitzern verfüttert wird (CHRISTENSEN 1987). Diese Vermutung wird gestützt durch die Beobachtung, dass zumeist das Bioserovar 4/O:3 isoliert wurde. Mittels Pulsfeldgelelektrophorese konnten zudem identische Pulstypen aus Hunde-

Katzenfäces und Schweinematerial (Leber, Herz, Ohren, Nieren, Hackfleisch) ermittelt werden. Vorberichtlich gaben die Tierbesitzer an, ihre Tiere mit diesen Organen gefüttert zu haben (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001c).

Der Nachweis von humanpathogenen *Y. enterocolitica* bei Hunden und Katzen könnte ein Anhaltspunkt dafür sein, dass die Yersiniose häufig bei kleinen Kindern vorkommt, da der Kontakt zwischen Haustieren und Kleinkindern meistens recht eng ist (DIESTERWEG 1992). GUTMAN et al. (1973) berichtet von einem Krankheitsausbruch durch Serovar O:8 innerhalb einer Familie der im Zusammenhang stand mit Hundewelpen. Die an Durchfall erkrankten Welpen starben in der gleichen Woche in der auch der erste Erkrankungsfall in der Familie auftrat, danach fand nach und nach eine Übertragung auf die einzelnen Familienmitglieder statt. Gemäß einer Studie von KIST und PELZ (1979) zur Yersiniose in Deutschland gaben 33% der Erkrankten an Kontakt zu Hunden zu haben, neuere Untersuchungsergebnisse fehlen bisher.

2.3.3 Mensch

Für eine Infektion Mensch zu Mensch sprechen kleinere, epidemische Ausbrüche in Familien, Kindergärten oder Krankenhäuser in einer Reihenfolge die der Inkubationszeit des Erregers entspricht. Im Gegensatz dazu treten bei einer Lebensmittel assoziierten Erkrankung die Symptome bei allen Beteiligten ungefähr gleichzeitig nach Ablauf der Inkubationszeit auf (DIESTERWEG 1992). Auch beim Menschen muss angenommen werden, dass asymptomatische Ausscheider zur Verbreitung der Erkrankung beitragen. In Kontrollgruppen klinisch gesunder Probanden aus der Normalbevölkerung waren pathogene *Y. enterocolitica* nachweisbar (WUTHE et al. 1982, VAN NOYEN et al. 1987, KIESEWALTER 1992).

KIST et al. (1980) schildert die Ausbreitung einer *Y. enterocolitica* Infektion in einem Krankenhaus: als Infektionsquelle konnte ein Dialysepatient ermittelt werden, der aufgrund einer Yersinia Sepsis stationär behandelt wurde und mit dem Stuhl massenhaft Yersinien ausschied. Über gemeinsame sanitäre Einrichtungen bzw. über das behandelnde Personal wurden fünf weitere Personen infiziert. Auch von kleineren epidemiologischen Ausbrüchen in Kindergärten und Schulen wurde berichtet (ZEN-YOJI et al. 1973, COVER und ABER 1989).

Kontaminierte Blutkonserven waren immer wieder Auslöser einer *Y. enterocolitica* Sepsis, seit der erstmaligen Beschreibung eines Transfusionszwischenfalls 1975 in den Niederlanden sind über fünfzig Fallbeispiele weltweit publiziert worden, eine Übersicht dazu findet sich in BOTTONE (1999).

3 Diagnostik von *Yersinia enterocolitica*

3.1 Eigenschaften des Erregers

Mikroskopisch sind *Yersinia* Spezies nicht zu unterscheiden, nach Gramfärbung erkennt man gramnegative, ovoide oder längliche, pleomorphe Stäbchen von 1,0 -5,0 µm Länge und 0,5-0,8 µm Breite, die weder eine Kapsel noch Sporen ausbilden. Geißeln werden in der Regel nur bei Wachstumstemperaturen unter +30°C ausgebildet (BERCOVIER und MOLLARET 1984).

Kulturell sind Yersinien anspruchslose Bakterien und wachsen als fakultative Anaerobier auf Nährböden mit einfacher Zusammensetzung. Yersinien sind mesophile Bakterien, zur Anzucht eignet sich am besten eine Bebrütungstemperatur von +22°C bis +28°C (BAUMGART 1999). Auch bei +4°C können sie sich noch vermehren, diese psychrotrophe Eigenschaft macht man sich zu selektiven Zwecken bei der Kälteanreicherung zunutze (BRANDIS und OTTE 1984).

Y. enterocolitica unterscheidet sich von anderen *Yersinia* Spezies durch eine Reihe biochemischer Merkmale. Die Verstoffwechslung verschiedener Zucker, Decarboxylierung von Ornithin, Citratverwertung, Voges-Proskauer Reaktion und Indolbildung werden häufig zur Differenzierung herangezogen (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Doch auch *Y. enterocolitica* verhält sich nicht biochemisch einheitlich, es können deshalb verschiedene Biovare unterschieden werden (BERCOVIER et al. 1978, KAPPERUD und BERGAN 1984), von denen das Biovar 1A als apathogen angesehen wird.

Serovare werden aufgrund von Antigen (AG)-Eigenschaften der Bakterienoberfläche oder -geißeln unterschieden. Demnach werden die Oberflächenantigene "O-AG" und die Geißelantigene "H-AG" genannt (NICOLET 1985). *Y. enterocolitica* kann aufgrund der O-Antigene in mindestens 28 Serovare eingeteilt werden (O:3, O:9, usw.) und aufgrund von H-Antigenen in mindestens 18 Serovare (a, b, usw.); bei Kombination der beiden Antigene können weitere Serogruppen gebildet werden (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990).

Zwischen den verschiedenen Sero- und Biovaren von *Y. enterocolitica* kann ein Zusammenhang festgestellt werden. So gehören dem Biovar 4 stets nur *Y. enterocolitica* Stämme des

Serovars O:3 an, diese Isolate werden häufig mit Erkrankungsfällen beim Menschen in Verbindung gebracht. Umgekehrt kann das Serovar O:3 jedoch auch in anderen Biovarien, z.B. Biovar 1A vertreten sein, die keine pathogene Relevanz besitzen (**Tabelle 3**). Diese Zusammenhänge machen deutlich, dass eine Bio- und Serotypisierung stets parallel durchgeführt werden muss, um das pathogene Potential eines Isolates abschätzen zu können.

Tabelle 3: Verteilung und Pathogenität verschiedener Bioserovare von *Yersinia enterocolitica* (modifiziert nach VARNHAM und EVANS 1991)

Biovar	Zugehörige Serovare	Verbreitung	Pathogenität für den Menschen
1B (American)	O:4, O:8, O:13a, b, O:20, O:21, etc.	Mensch (Nordamerika)	Ja
2	O:9, O:5,27	Mensch (Europa und Japan), symptomlose Schweine, möglicherweise Rinder	Ja
3	O:1, O:2, O:3, O:5,27	Chinchillas	Möglicherweise
4	O:3	Menschen (Europa, Japan) Symptomlose Schweine	Ja
5	O:2, O:3	Hasen, Ziegen	Nein
1A	Zahlreiche	Wasser, Boden, Lebensmittel, Fäces von Mensch und Tier	Nein

3.2 Kulturelle Nachweisverfahren

3.2.1 Anzucht aus Untersuchungsmaterial

Welches kulturelle Untersuchungsverfahren zur Anwendung kommt ist abhängig vom Untersuchungsmaterial. Soll der Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* aus Lebensmitteln gelingen, so sind in der Regel spezifische Anreicherungsverfahren notwendig um die massive Begleitflora zu unterdrücken und das Wachstum von *Y. enterocolitica* optimal zu fördern (DEDIÉ et al. 1993). Da der Gesetzgeber keine Untersuchungsmethode gemäß der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren § 35 LMBG zur Diagnostik von *Y. enterocolitica* aus Lebensmitteln vorschreibt und Isolierungen aus Lebensmitteln zudem selten gelingen, existieren eine Vielzahl von Verfahren, die einen Vergleich von Ergebnissen schwierig

machen (BAUMGART 1999). In Europa existieren derzeit zwei standardisierte Methoden, eine Methode der Internationale Organisation zur Standardisierung (ISO 1994), sowie eine Methode des Nordic Comitee on Food Analysis (NCFA 1996).

Der Nachweis von *Y. enterocolitica* aus klinischem Untersuchungsmaterial gelingt dagegen meist bereits durch einen Direktaustrich auf festem Selektivnährboden (PAI et al. 1979, VAN NOYEN et al. 1980). In normalerweise sterilem Blut ist der Erreger bei einer Sepsis leicht zu isolieren, an einer Enteritis Erkrankte scheiden den Keim in hohen Keimzahlen mit dem Stuhl aus und die normale Darmflora ist reduziert. Zum Nachweis geringer Keimzahlen, wie bei symptomlosen Dauerauscheidern ist eine Kälteanreicherung sinnvoll. Diese sollte deshalb bei epidemiologischen Fragestellungen sowie bei der Hygieneüberwachung angewendet werden, nicht jedoch bei Patienten mit klinischem Krankheitsbild, um eine Überwucherung des Nährbodens mit apathogenen Yersinien zu verhindern (PAI et al. 1979, VAN NOYEN et al. 1980).

Das klassische Kälteanreicherungsverfahren nutzt die psychrotrophe Eigenschaft von *Y. enterocolitica* aus, hierbei erfolgt eine Inkubation bei 4°C für 21Tage in einer nichtselektiven, phosphatgepufferten NaCl-Lösung (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990) oder in einer PBS-Bouillon mit Sorbitol und Bile (Galle)- PBSSB (MEHLMAN et al. 1978, NCFA 1996). Für Lebensmittel hat sich dieses Anreicherungsverfahren nicht bewährt (BUCHER 2001, HANK 2003) Wegen der weiten Verbreitung von apathogenen *Yersinia* Spezies in Lebensmitteln, die zahlenmäßig häufig überlegen sind, wird der Nachweis von *Y. enterocolitica* bei diesem Verfahren eher erschwert (BAUMGART 1999). Auch ein Wachstum von anderen Umweltkeimen, wie Pseudomonaden können bei diesem Verfahren nicht ausgeschlossen werden (BOCKEMÜHL et al. 1979).

Verschiedene Selektivanreicherungen die das Wachstum von *Y. enterocolitica* aus kontaminierten Lebensmitteln und Umweltmaterial begünstigen sollen, sind entwickelt worden (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Selektivnährmedien für *Yersinia enterocolitica*

Name	Quelle
BOS (Bile Oxalat Sorbose)	SCHIEMANN 1982, WALKER und GILMOUR 1986
ITC (Irgasan-Ticarcillin -Kaliumchlorat-Medium)	WAUTERS et al. 1988a
MRB (modifizierte Rappaport Bouillon)	WAUTERS 1973

BOS Medium hat sich vor allem für die Anzucht von pathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen des Bioserovars 1B/O:8 bewährt (WALKER und GILMOUR 1986), während die beiden anderen genannten Selektivanreicherungen vor allem für die Dedektion der weit verbreiteten, humanpathogenen Bioserovare 4/O: 3 und 2/O:9 als die geeignetsten angesehen werden (WAUTERS et al. 1988a). BUCHER (2001) stellte in einer Arbeit verschiedene Anreicherungsverfahren gegenüber, durch Kombination mehrerer Verfahren konnte die Nachweisrate erhöht werden, hierbei erwies sich der parallele Einsatz zweier verschiedener Selektivanreicherungen am effektivsten (Modifiziertes Rappaport Medium und Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Nährbouillon).

3.2.2 Isolierung von *Yersinia enterocolitica*

Anfangs wurden für die *Y. enterocolitica* Diagnostik gängige Selektivnährböden wie sie für die Isolation von *Enterobacteriaceae* üblich waren verwendet, und einige davon wie zum Beispiel der MacConkey Agar finden immer noch breite Anwendung. Bevorzugt werden heute jedoch Nährmedien die nur das Wachstum von *Y. enterocolitica* anzeigen sollen (VARNHAM und EVANS 1991). Beispiele hierfür sind der Cellobiose-Arginin-Lysin-Agar (CAL) (DUDLEY und SHOTTS 1979) und das "Y" Medium (SOLTESZ et al. 1980). Sehr häufig kommen der modifizierte Salmonella-Shigella-Agar mit Natriumdesoxycholat u. Calciumdichlorid (SSDC) (WAUTERS 1973), sowie der von SCHIEMANN (1979) entwickelte Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar (CIN) zum Einsatz, die von allen größeren Nährbodenherstellern kommerziell vertrieben werden. Die zugesetzten Hemmstoffe Kristallviolett, Natriumdesoxycholat und die Antibiotika Cefsulodin, Irgasan, Novobiocin in diesem Nährboden unterdrücken selektiv das Wachstum anderer, unerwünschter Keime. Mannit wird von *Yersinia* Spezies fermentiert, die dabei entstehende Säure bewirkt einen

Farbumschlag des Indikators Neutralrot und erklärt die rote Färbung im Zentrum der Kolonien ("Kuhaugen"). *Enterobacter*-, *Aeromonas*-, *Proteus*- und *Citrobacter*-Kolonien können allerdings ähnliche Koloniemorphologie aufweisen (DE BOER und SELDMAN 1987).

Eine Weiterentwicklung stellt der "Virulent *Y. enterocolitica* Agar" (VYE) von FUKUSHIMA (1987) dar, diesem Nährmedium ist Äsculin zugesetzt und ermöglicht somit eine Unterscheidung pathogener von apathogenen Bioserovaren. Biovar 1A, als nicht virulentes Biovar besitzt die Fähigkeit mit Hilfe einer Hydrolase Äsculin zu spalten und dadurch den Nährboden dunkel zu färben. Dieser Nährboden wird jedoch nicht kommerziell vertrieben.

3.2.3 Identifizierung auf Speziesebene

Biochemische Eigenschaften von *Y. enterocolitica* werden am besten mit miniaturisierten, kommerziell erhältlichen Identifikationskits erfasst, dadurch kann *Y. enterocolitica* von anderen *Yersinia* Spezies unterschieden werden, eine Kolonie ist somit eindeutig als *Y. enterocolitica* identifiziert.

Durch Bio- und Serotypisierung kann eine weitere Diskriminierung innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* vorgenommen werden, damit wird eine Unterscheidung zwischen pathogenen und apathogenen Vertretern dieser Spezies möglich (BAUMGART 1999). Eine Vielzahl von biotypisierenden Schemata sind beschrieben worden (BRENNER 1981, SWAMINATHAN et al. 1982, KAPPERUD und BERGAN 1984). In sehr vielen Studien kommt ein modifiziertes Biotypisierungsschema nach WAUTERS et al. (1987) (**Tabelle 5**) zur Anwendung (NESBAKKEN 1992, ZHENG und XIE 1996, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001d).

Tabelle 5: Modifiziertes Biotypisierungsschema für *Yersinia enterocolitica*
(nach WAUTERS et al. 1987)

Parameter	Biovar						
	1A	1B	2	3	4	5	6*
Lipase (Tween-Esterase)	+	-	-	-	-	-	-
Aesculin 24 h	+/-	-	-	-	-	-	-
Salicin 24 h	+/-	-	-	-	-	-	-
Indol	+	+	(+)	-	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	-	V	+
Trehalose/ NO ₃ -Reduktion	+	+	+	+	+	-	+
Pyrazinamidase	+	-	-	-	-	-	+
B-D-Glucuronidase	+	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	(+)	-
Prolinpeptidase	v	-	-	-	-	-	+

+ positive Reaktion

- keine Reaktion

v variable Reaktion

+/- verzögert positive Reaktion

(+) leicht positiv ein nachträglicher Vorschlag beinhaltet die Aufspaltung des Biovars 6 in zwei Spezies: *Y. bercovier* und *Y. mollaretii* (WAUTERS et al. 1988)

Die Serotypisierung kann mit kommerziell erhältlichen Agglutinationsseren durchgeführt werden.

3.2.4 Pathogenitätsnachweis

Ein erster Anhaltspunkt für die Pathogenität liefert bereits die Koloniemorphologie auf dem Nährboden. Apathogene Stämme von *Y. enterocolitica* (Biotyp 1A) wachsen in größeren, stets gleichaussehenden Kolonien, während pathogene Stämme kleiner und in unterschiedlicher Kolonieform wachsen (VARNHAM und EVANS 1991). Da diese Interpretation jedoch in hohem Maße subjektiv geprägt ist, sollte sie nur unter Vorbehalt herangezogen werden (SCHIEMANN 1989).

Chromosomal codierte Pathogenitätsmerkmale, und damit die potentielle Pathogenität eines Isolates werden bereits durch die Biotypisierung erfasst in Form der Pyrazinamidase Aktivität, der Salicin Fermentation und der Äsculinhydrolyse (FARMER III et al. 1992).

Um das Krankheitsbild der "Yersiniose" zu verursachen sind zusätzliche, plasmidcodierte Merkmale des Erregerstammes Voraussetzung. YadA assoziierte Eigenschaften, wie die Autoagglutination können dafür herangezogen werden. Hierzu werden zwei Röhrchen VP-Medium mit dem zu prüfenden Stamm beimpft, und parallel über Nacht bebrütet, einmal bei Raumtemperatur und einmal bei +37°C. Virulenzplasmid-haltige Stämme wachsen bei Raumtemperatur mit homogener Trübung, wohingegen es bei +37°C zu klebriger, feinflockiger Sedimentbildung kommt (ALEKSIC et al. 1988). Auch calciumabhängiges Wachstum bei +37°C (GEMSKI et al. 1980) und Kongorot-Bindungsfähigkeit bei +37°C (BHADURI et al. 1987) sind an das Vorhandensein eines Plasmids gebunden, ein gemeinsamer Nachweis dieser beiden Eigenschaften gelingt mit dem Congo-Red-Magnesium-Oxalat-Agar (CRMOX-Agar) von RILEY und TOMA (1989). Die zu testende Kolonie wird auf den Nährboden aufgebracht und für 24 h bei +37°C bebrütet. Plasmidhaltige Stämme wachsen in runden, konvexen, roten, opaken pinpoint-Kolonien, Stämme ohne Plasmid (keine Kongorotbindung) sind größer, flach und farblos.

3.3 Immunologische Nachweisverfahren einer Yersiniose

Eine Infektion mit *Y. enterocolitica* führt stets zur Bildung von humoralen Antikörpern gegen Zellwand Antigene (O-Antigene), sowie gegen lösliche Proteine (Yops) und YadA.

Somit können humorale Antikörper für die Diagnostik herangezogen werden, lassen aber keine Schlüsse zu über das Vorliegen einer Immunität, denn diese ist zellvermittelt (DEDIÉ et al. 1993).

Bei der Widal Reaktion mit agglutinierenden Antikörpern handelt es sich um ein Verfahren, bei dem mit Hilfe von Oberflächenantigenen (O-Antigene) gegen die Serovare O:3 und O:9 agglutinierende Antikörper im Patientenserum nachgewiesen werden können (PSCHYREMBEL 1994). Agglutinationstiter über 1:160 sind diagnostisch als positiv zu werten (HEESEMAN et al. 1986a) und können typischerweise vom 3. bis 7.Tag nach Auftreten klinischer Symptome gemessen werden (BOTTONE 1999). Signifikante Titer können in der Regel nur während der akuten Phase der Erkrankung nachgewiesen werden, sie nehmen dann innerhalb von drei Monaten ab (HOOGKAMP-KORSTANJE et al. 1988). Chronische Erkrankungen weisen keine signifikanten Agglutinationstiter mehr auf und können somit nicht erfasst werden (HEESEMAN et al. 1986a). Unspezifische

Kreuzreaktionen zwischen Bioserovar 2/O:9 und Bakterien der Gattung *Brucella* sind möglich (DEDIÉ et al. 1993).

Als sicherster diagnostischer Nachweis von spezifischen Anti-*Yersinia* Antikörpern gilt der Nachweis von humoralen Antikörpern (IgM, IgA, und IgG-AK) gegen Plasmid assoziierte Proteine, den sogenannten Yops. Das Besondere ist nicht nur ihre starke Antigenität und ihre hohe Spezifität (bisher bei keinen anderen Bakterien nachgewiesen) sondern auch ihre hohe Kreuzreaktivität innerhalb der Gruppe der humanpathogenen Yersinien (serotyp- und speziesunabhängige Antigene) (HEESEMAN et al. 1986b). Somit können alle humanpathogenen Yersinien erfasst werden, Aussagen zur Spezieszugehörigkeit (*Y. enterocolitica* oder *Y. pseudotuberculosis*) oder zum Serotyp sind jedoch nicht möglich. Die Diagnostik plasmidassoziierter Antikörper erfolgt mit Hilfe eines ELISAs oder eines Immunoblots.

IgM, IgA und IgG Antikörper sind während der akuten Phase einer *Yersinia* Infektion nachweisbar (HEESEMAN et al. 1984). IgM verschwinden nach etwa 3 Monaten, ihr Nachweis spricht deshalb für eine vor kurzem durchgemachten Infektion (GRANFORS et al. 1980), spezifische IgG Antikörper persistieren dagegen über Jahre hinweg und können auch dann noch nachgewiesen werden (HEESEMAN et al. 1984). Chronische Darmerkrankungen und durch *Yersinia* induzierte Gelenkserkrankungen können mit diesem Verfahren ebenfalls nachgewiesen werden und sind charakterisiert durch anhaltend hohe IgA Titer (GRANFORS und TOIVANEN 1986, LARSEN et al. 1985) (**Abbildung 3**).

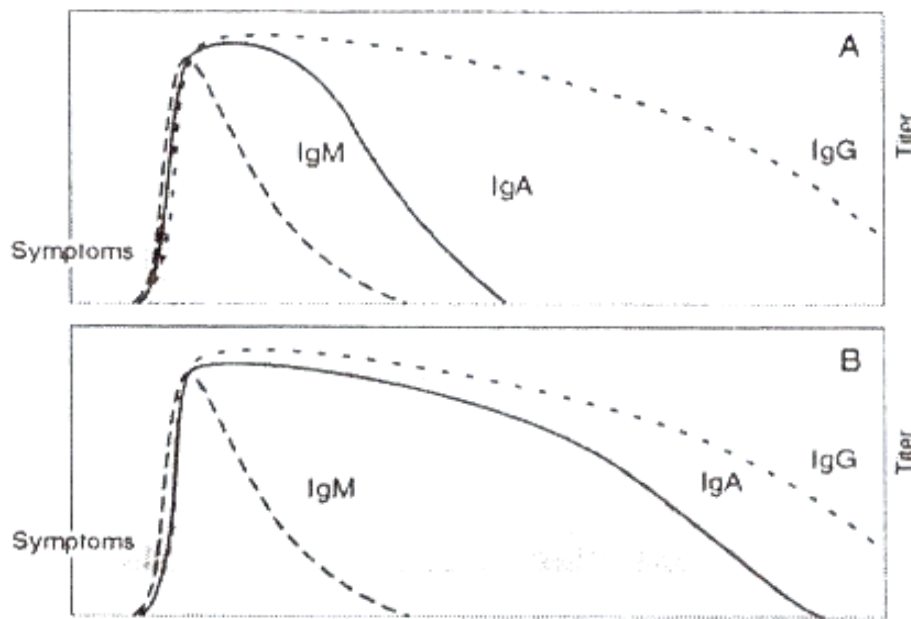


Abbildung 3A: Titer-Verlaufskurve von *Yersinia*-spezifischen Antikörpern im Falle einer akuten und komplikationslosen Yersiniose wie Enteritis, Pseudoappendicitis, Yersinia Colitis, Sepsis und Lymphadenopathie (nach MILENIA-BIOTECH 1999).

Abbildung 3B: Titer-Verlaufskurve von *Yersinia*-spezifischen Antikörpern im Falle von immunpathologischen Komplikationen und chronischer Yersiniose wie Reaktive Arthritis, Erythema nodosum, Ileitis und Lymphadenopathie (nach MILENIA-BIOTECH 1999).

Eine weitere diagnostische Methode ist die Indirekte Immunfluoreszenz (HOOGKAMP-KORSTANJE et al. 1985), damit können antigene Komponenten von *Y. enterocolitica* in Biopsiematerial nachgewiesen werden und die kulturelle Anzucht ersetzen. Der Nachweis erfolgt serovarunspezifisch unter Verwendung von polyvalentem Kaninchenserum (HOOGKAMP-KORSTANJE 1986). Im Rahmen eines immunpathologischen Krankheitsgeschehens ist diese Methode auch geeignet um antigene Komponenten des Erregers in Gelenken nachzuweisen, eine kulturelle Anzucht aus Synovialflüssigkeit verläuft in solchen Fällen stets erfolglos (GRANFORS et al. 1989).

3.4 Molekularbiologische Nachweisverfahren

Genotypische Methoden haben den Vorteil, dass sie nicht auf eine phänotypische Expression von gattungsspezifischen Merkmalen angewiesen sind, welche häufig eine Temperaturabhängigkeit aufweisen (ITEMAN et al. 1996).

Die PCR ist ein hoch sensitives und hoch spezifisches diagnostisches Werkzeug, das 1989 eingeführt wurde. Durch ihren Einsatz können die gesuchten Bakterien direkt aus dem Untersuchungsmaterial detektiert werden, eine PCR auf Basis plasmidcodierter Gene ersetzt gleichzeitig den Pathogenitätsnachweis. Falsch negative Ergebnisse nach Plasmidverlust sind jedoch möglich (NEUBAUER et al. 2000). Eine Vielzahl von Methoden auf Basis chromosomaler und plasmidassoziierter Gene sind für die Detektion von *Y. enterocolitica* entwickelt worden (NEUBAUER et al. 2001a), auch eine in-situ Hybridisierung mit fluoreszenz markierten Oligonucleotiden ist möglich (TREBESIUS et al. 1998).

4 Methoden zur Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge

4.1 Fall-Kontroll-Studien

Hierbei handelt es sich um epidemiologische Studien die sich zum Ziel machen Faktoren zu identifizieren, von denen vermutet wird, dass sie kausal an der Krankheitsentwicklung beteiligt sind. Es wird von Personen mit bereits eingetretener Krankheit ausgegangen und rückblickend nach ursächlich beteiligten Faktoren gesucht. Dazu werden Personen mit manifester Krankheit (Fälle) solchen Personen gegenübergestellt die die Krankheit nicht haben (Kontrollen), und es wird geprüft, ob sich die Gruppen hinsichtlich bestimmter, interessierender Variablen unterscheiden. Wichtig dabei ist, dass beide Gruppen vergleichbar sind, in bestimmten Parametern also Übereinstimmungen zeigen. Alter, Geschlecht, sozioökonomischer Status (Bildung, Zahl der Kinder, Einkommensklasse, Lebensstil) und ethnische Zugehörigkeit sind solche Parameter. Wegen ihrer einfachen Durchführbarkeit werden Fall-Kontrollstudien häufig eingesetzt. Wesentlich beeinträchtigt wird die Aussagekraft solcher Studien durch den retrospektiven Charakter der Datenerhebung: während die Krankheit schon besteht, versucht man im nachhinein Informationen über Faktoren zu finden die zu ihrer Entstehung geführt haben. Erinnerungslücken, unzureichende Dokumentation und das Wissen um die eingetretene Krankheit schränken die Zuverlässigkeit der Daten ein (HEINEMANN et al. 1994a, b).

Mit Hilfe solcher Fall-Kontrollstudien konnte ein Zusammenhang zwischen der humanen Yersiniose und Schweinefleisch eindeutig festgestellt werden. Den Fällen (an einer enteralen Yersiniose Erkrankte mit positiver Stuhlkultur) wurden Kontrollgruppen (keine Yersiniose in der Krankheitsgeschichte) gegenübergestellt, Alter, Geschlecht und Wohnort beider Gruppen stimmten überein. Standardisierte Fragebögen führten zu eindeutigen Diskrepanzen zwischen den beiden Gruppen. So gaben Erkrankte häufiger an Schweinefleisch und Schweinefleischprodukte verzehrt zu haben, nicht durchgegartes Fleisch wurde zudem bevorzugt und auch bezüglich der Küchenhygiene war diese Gruppe nachlässiger. Eine Diskrepanz beider Gruppen hinsichtlich Kontakt zu Haus- oder Nutztieren konnte nicht festgestellt werden (OSTROFF et al. 1993). Zu ähnlichen Ergebnissen führten Fall-Kontroll-Studien in Neuseeland (SATTERTHWAITE et al. 1999) und Belgien (TAUXE et al. 1987).

4.2 Molekularmethoden

Im Laufe der vergangenen Jahre wurden für die Bakterientypisierung klassische Methoden aus der Immunologie, Biochemie und Genetik übernommen und für Untersuchungen im Rahmen von epidemiologischen Fragestellungen mit dem Terminus "Molekulare Epidemiologie" bedacht. Theoretisch wird für jedes Typisierungssystem vorausgesetzt, dass epidemiologisch verwandte Bakterien-Isolate, die im Rahmen der klonalen Expansion aus einem einzigen Vorläuferstamm hervorgegangen sind, charakteristische Eigenschaften teilen, die sie von anderen, epidemiologisch nicht verwandten Isolaten unterscheidet. Die Verwendung spezieller, charakteristischer Eigenschaften hängt dabei von der Stabilität dieser Eigenschaften innerhalb des Stammes und der Diversität innerhalb der Spezies ab. Diese Diversität reflektiert die evolutionäre genetische Divergenz, die durch zufällige, nicht letale Mutationen entsteht, welche im Laufe der Zeit akkumulieren. Solche Mutationen sind nachweisbar, wenn sie an Stellen auftreten, für die mit den heutigen Methoden Detektionsmöglichkeiten bestehen (MASLOW et al. 1993a, SCHMITZ et al. 1995).

4.2.1 Restriktionsenzymanalyse des Plasmids (REAP)

Plasmide sind extrachromosomale Strukturen, die in der Bakterienzelle als zirkuläre, doppelsträngige DNS-Moleküle vorliegen und z. B. für Antibiotika-Resistenzen oder für die Produktion von Toxinen verantwortlich sind. Plasmide können selbstständig durch Konjugation, mit Hilfe eines Transferfaktors oder durch Bakteriophagen zwischen Bakterien ausgetauscht werden (PSCHYREMBEL 1994).

Bei der Plasmid-Profil-Analyse werden Bakterienplasmide isoliert und anschließend separiert um ihre Zahl und Größe zu ermitteln. Zusätzliche Informationen gewinnt man durch die anschließende Restriktionsenzymanalyse des Plasmids bei der die DNS des Plasmids mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen gespalten wird und anschließend Zahl und Größe der entstandenen Restriktionsfragmente verglichen werden. Die Diskriminationsfähigkeit dieser Methode ist bei denjenigen Stämmen verständlicherweise gering, die über keine bzw. nur ein oder zwei Plasmide verfügen. Die Durchführbarkeit dieser Methode ist einfach, auch die Ergebnisinterpretation bereitet keine Schwierigkeiten (MASLOW et al. 1993a, SCHMITZ et al. 1995).

4.2.2 Restriktionsendonukleasen-Analyse chromosomaler DNS (REAC)

Restriktionsendonukleasen spalten enzymatisch DNS an definierten Stellen bestimmter Nukleinsäuresequenzen. Die Anzahl und Größe der so gewonnenen Restriktionsfragmente spiegelt die Frequenz und Verteilung dieser zu schneidenden Nukleinsäuresequenzen wider. Bei der REAC werden Endonukleasen mit einer hohen Zahl an Schnittstellen eingesetzt, so dass teilweise Hunderte von Fragmenten mit einer Länge von 0,5-50 Kb entstehen. Diese Fragmente werden anschließend mittels Agarose-Gel-Elektrophorese separiert. Unterschiedliche Stämme der gleichen Bakterienspezies sollten voneinander zu diskriminierende Bandenmuster aufweisen, da DNS Sequenzen verschiedener Bakterienstämme variierende Restriktionsschnittstellen besitzen. Das Hauptproblem dieser Methode liegt in der sehr schwierigen Interpretation der komplexen Bandenmuster die aus hunderten von teilweise nicht getrennten bzw. einander überlappenden Banden bestehen können. Sie ist jedoch einfach und schnell durchführbar (MASLOW et al. 1993a).

4.2.3 Ribotypisierung

Die Ribotypisierung nutzt das Prinzip der "Southern Blot" Analyse. Nach Enzymrestriktion chromosomaler DNS und Auftrennung der Restriktionsfragmente mit Hilfe der Gelelektrophorese wird das die DNS enthaltende Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Zur Erkennung von bestimmten Gensequenzen setzt man radioaktiv oder enzymatisch markierte Nukleinsäureabschnitte, sogenannte Gensonden ein, die an komplementäre Nukleinsäureabschnitte der Probe binden. Bei der Ribotypisierung verwendet man dabei Sonden zum Nachweis von Genen, die ribosomale RNS (rRNS) codieren, solche Gene werden auch Operone genannt und kommen in mehreren Kopien im Bakteriengenom vor (MASLOW et al. 1993a). rRNS ist ein Bestandteil der Ribosomen, dem Ort, an dem die Proteinbiosynthese der Zelle stattfindet. Sie kommt bei allen Bakterienspezies vor und ist hochgradig konserviert.

Das Ribosom von *Escherichia coli* ist sehr gut untersucht, die rRNS besteht aus 16S, 23S und 5S großen Sequenzen, diese werden als gängige Gensonden verwendet. Da die Gene für rRNS in mehreren Kopien im Genom vorliegen, können Bakterien 5-7 Operone enthalten, die jeweils auf unterschiedlich großen Restriktionsfragmenten liegen können. Mit Hilfe der Ribotypisierung gelingt dann die Darstellung von typischerweise 10-15 Banden, so dass eine

unkomplizierte Interpretation der Ergebnisse möglich ist. Auch eine gute Reproduzierbarkeit ist bei dieser Methode gegeben, nachteilig ist der hohe Zeitaufwand (SCHMITZ et al. 1995).

4.2.4 Analysen mittels random amplified polymorphic DNS (RAPD)

Normalerweise ist die Kenntnis der DNS-Sequenz an den Enden des gewünschten Fragments eine Voraussetzung für die PCR Amplifikation, für die spezifische Primer benötigt werden. Es können aber auch mit Hilfe einer durch einen einzelnen, kurzen, unspezifischen Primer gestarteten Polymerase-Kettenreaktion, z.B. mit der Gesamt-DNS eines Organismus als Ziel-DNS, Fragmente amplifiziert werden. Fingerprint-Muster mit einer Auflösung, die die Unterscheidung verschiedener Stämme einer Spezies von Organismen erlaubt, können so erzeugt werden. Als Primer für die PCR wird ein einziges Oligonukleotid verwendet, die Sequenz dieses Primers ist dabei beliebig. Bei der PCR-Amplifikation werden DNS-Regionen aus dem Genom, die zwischen jeweils zwei entgegengesetzt orientierten Primerbindungsstellen liegen, exponentiell angereichert. Nach Auftrennen der Amplifikationsprodukte durch Elektrophorese auf einem Agarosegel zeigt sich nach Anfärben mit Ethidiumbromid das Fingerprint-Bandenmuster verschiedener Stämme (TICHY und SIMON 1994). Bei der RAPD handelt es sich um eine sehr schnelle Methode, die Technik ist jedoch schwierig zu standardisieren und hat eine schlechte Reproduzierbarkeit (OLIVE und BEAN 1999).

4.2.5 Sequenzierung

Mit Hilfe der DNS-Sequenzierung kann die Primärstruktur des Bakteriengenoms entschlüsselt werden, sie ergibt sich durch die Bestimmung der Reihenfolge der Nukleotide im DNS-Strang. Zu ihrer Durchführung bewährt hat sich die enzymatische Methode nach Sanger. Der konzeptionelle Kern liegt in der Fähigkeit der DNS-Polymerase, einzelsträngige DNS von einem doppelsträngigen Startpunkt (Primer) ausgehend durch Einbau von komplementären Nukleotiden zu einem Doppelstrang zu ergänzen. Diese DNS-Polymerase kann aber auch natürlicherweise nicht vorkommende Nukleotide als Substrat verwenden, bei Verwendung von zweifach desoxygenerter Ribose als Bestandteil des Nukleotids (Didesoxynukleotid) kommt es zum Abbruch der weiteren Kettenverlängerung da eine Verknüpfungsstelle verloren geht.

In vier parallelen Ansätzen wird bei dieser Methode eine DNS-Replikation gestartet, die dann durch die Anwesenheit eines der vier möglichen Didesoxynukleotids (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) gestoppt wird. Es entstehen dabei DNS-Ketten unterschiedlicher Länge, die elektrophoretisch aufgetrennt werden und aufgrund einer radioaktiven Markierung sichtbar gemacht werden können. Aus der Kettenlänge im Zusammenhang mit dem verwendeten Didesoxynukleotid ergibt sich der relative Abstand der einzelnen Basen zum Primer. Handelt es sich bei der am weitersten gewanderten Bande beispielsweise um eine Reaktion, die durch den Zusatz eines ddTTP gestoppt wurde, so lässt dies den Rückschluss zu, dass sich das komplementäre Nukleotid APT in unmittelbarer Nachbarschaft zum Primer befinden muss und deshalb die Replikation frühzeitig durch ddTTP abgebrochen werden konnte (HENTZE et al. 1990). Mit Hilfe der Sequenzierung sind alle Bakterienarten mit guter Reproduzierbarkeit typisierbar.

4.2.6 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Prinzip

Bei der konventionellen Gelelektrophorese in konstanten Feldern wandern die negativ geladenen DNS Moleküle in einer Richtung zur Anode (SCHMITZ et al. 1995), dies ist die gebräuchlichste Technik zur Trennung von DNS Molekülen bis zu einer Größe von 50 Kb (Kilobasenpaare), und entspricht etwa dem Genom des *Escherichia coli*-Phagen Lambda. Größere DNS Moleküle richten ihre Längsachse parallel zu den elektrischen Feldlinien aus und wandern somit schlangenartig durch die Poren des Gels, da die Porengröße im Agarosegel für eine horizontale Wanderung zu klein ist. Dies hat zur Folge, dass alle DNS Moleküle, die größer als circa 50 Kb sind, in einer Bande wandern. Eine Auftrennung oder Größenbestimmung dieser Moleküle ist somit nicht möglich (WINTER und DRIESEL 1988).

Der entscheidende Schritt zur Überwindung dieses physikalischen Phänomens gelang SCHWARTZ und CANTOR (1984) mit der Entwicklung der neuen Technologie der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Hierbei werden von in einem bestimmten Winkel angeordneten Elektroden alternierende elektrische Felder erzeugt, d.h. die Richtung der Feldlinien verändert sich in einem bestimmten Zeitintervall. Daher müssen die DNS Moleküle ihre Ausrichtung und Konformation ständig ändern, um sich in Feldrichtung zu orientieren (SCHMITZ et al. 1995). Die Modellvorstellung besagt, dass große Moleküle zur

Reorientierung längere Zeit brauchen als kleinere, so dass die Nettowanderungsgeschwindigkeit der kleineren Moleküle größer ist (WINTER und DRIESEL 1988). Mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese können somit auch größere DNS Fragmente mit einer Größenordnung von 50 Kb bis 1000 Kb aufgetrennt werden. Das gesamte Genom einer Bakterienzelle wird somit darstellbar (METZ et al. 1996).

Um alternierende elektrische Felder zu erzeugen sind zahlreiche Apparaturen entwickelt worden, die sich sowohl in der Geometrie der Elektrophoresekammer als auch in der Form, Anzahl, und Stellung der Elektroden unterscheiden und die hier nur namentlich erwähnt sein sollen. WINTER und DRIESEL (1988) haben diese Verfahren ausführlich beschrieben. Heute kommen die Gelelektrophorese in orthogonal-alternierenden Feldern (OFAGE), Feldinversionsgelelektrophorese (FIGE), die Rotaphor Apparatur, PFGE in rotierenden Gelen und die Elektrophorese im transvers-alternierenden elektrischen Feld zur Anwendung. Häufig wird die sogenannte CHEF-PFGE, contour clamped homogeneous electric field PFGE benutzt. 24 Elektroden sind hier in einer Elektrophoresekammer hexagonal zueinander angeordnet, die beiden sich gegenüberliegenden Seiten des Sechsecks werden abwechselnd aktiviert. Der Strom wird dabei in einem Winkel von 120° zur Nettolaufrichtung der DNS in kurzen Impulsen aus wechselnder Richtung angelegt.

Die Pulszeit und die Stärke des elektrischen Feldes sind dabei die entscheidenden Parameter, die den Molekulargewichtsbereich der auftrennbaren DNS Fragmente festlegen: je länger die Pulszeiten sind, desto größere Moleküle können aufgetrennt werden. Man kann die Pulszeit auch linear ansteigen lassen, so dass während eines Laufes sowohl kleinere als auch größere Fragmente aufgetrennt werden (Metz et al. 1996). Desweiteren haben auch die Konfiguration und Winkel des elektrischen Feldes, Temperatur und Ionenkonzentration des Gels sowie des verwendeten Puffers und Konzentration der eingesetzten Agarose Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit (SCHMITZ et al. 1995).

Probenvorbereitung

DNS Fragmente über 200 Kb sind sehr empfindlich gegenüber mechanischen Einwirkungen und können leicht brechen. Zu untersuchende Bakterienzellen werden deshalb zunächst in Agarose Blöcke eingebettet, das intakte Bakterienchromosom ist somit gegen Scherbruch geschützt, notwendige Detergentien und Enzyme zur Aufbereitung der DNS können in die

Agaroseblöcke hineindiffundieren (SCHMITZ et al. 1995). Mit Hilfe von Restriktionsenzymen wird das genetische Material dann in Fragmente von definierter Länge und Anzahl geschnitten.

Restriktionsenzyme, auch Restriktionsendonukleasen oder Cutter genannt, erkennen spezifische DNS-Sequenzen innerhalb eines Genoms und zerschneiden an dieser Zielsequenz den DNS Strang. Um das gesamte Bakteriengenom analysieren zu können ist es notwendig große DNS Fragmente zu erzeugen, dazu verwendet man selten schneidende Restriktionsenzyme (rare cutter), die eine Erkennungssequenz von 6 oder 8 Basenpaaren besitzen. Statistisch gesehen schneiden 4-cutter alle 256 Bp, 6-cutter alle 4096 Bp und 8-cutter nur alle 65536 Bp (MÜHLHARDT 2002).

Die Größe des Erbgutes verschiedener Bakterienstämme reicht von 0,5 bis 10 Mb. Abhängig vom Bakteriengenom und verwendeten Enzym entstehen 6 bis 40 Fragmente mit einer Größe von 5 bis 2000 Kb (METZ et al. 1996).

5 Anwendung der Pulsfeldgelelektrophorese für *Yersinia enterocolitica*

ITEMAN et al. (1996) bewerteten drei verschiedene Typisierungsverfahren hinsichtlich ihrer Diskriminierungsfähigkeit innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica*, Plasmid-Profil-Analyse (REAP), Ribotypisierung und Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) kamen dafür zur Anwendung. Sowohl die REAP als auch die Ribotypisierung erwiesen sich zwar als geeignetes Werkzeug um verschiedene Bioserotypen voneinander abzugrenzen, sie stellen somit eine Alternative zur Bio- und Serotypisierung dar, die beide den Nachteil haben von der phänotypischen Merkmalsausprägung abhängig zu sein. Die Diversität innerhalb einzelner Bioserotypen war jedoch nicht ausreichend um diese beiden Methoden für epidemiologische Studien heranziehen zu können. Nicht mehr als 5 (REAP) bzw. 10 (Ribotypisierung) verschiedene Bandenmuster konnten insgesamt identifiziert werden. Die PFGE erwies sich dagegen als eine hervorragende Methode um epidemiologische Erkenntnisse abzuleiten, mit ihrer Hilfe konnten insgesamt 43 verschiedene Pulstypen erzeugt werden, vor allem innerhalb des Bioserotyps 4/O:3 konnte dabei ein hohes Maß an Diversität festgestellt werden, 11 verschiedene Subtypen waren unterscheidbar. Auch FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999a) stuften die Ribotypisierung im Vergleich mit der PFGE als nicht geeignet ein um innerhalb des Bioserovars 4/O:3 verschiedene Subtypen zu diskriminieren.

Die PFGE fand in zahlreichen Studien zur Feintypisierung von *Y. enterocolitica* Anwendung (BUCHRIESER et al. 1994a, NAJDENSKI et al. 1994, ASPLUND et al. 1998, BEE 2000, FILETICI et al. 2000, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a). Obwohl spontane Mutationen vorkommen, die das Restriktionsmuster verändern können, ist dies bei dieser Spezies ein seltenes Ereignis (NAJDENSKI et al. 1995). BUCHRIESER et al. (1994b) konnten bei 24 Stämmen der gleichen Region während eines Zeitraums von acht Jahren identische PFGE-Muster nachweisen.

Häufig eingesetztes Restriktionsenzym ist *NotI* (BUCHRIESER et al. 1994b, NAJDENSKI et al. 1994, ITEMAN et al. 1996). Durch den parallelen Einsatz von zusätzlichen Enzymen kann der diskriminatorische Index weiter erhöht werden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001b). 35 verschiedene Enzyme wurden im Rahmen einer Pilotstudie auf ihre Brauchbarkeit für die Typisierung von *Y. enterocolitica* geprüft. Die besten Ergebnisse wurden durch eine Kombination der Enzyme *NotI*, *ApaI* und *XhoI* erzielt (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999a). Pulstypen desselben Bioserovars weisen sehr ähnliche Bandenmuster auf, was auf

eine enge Verwandtschaft dieser Stämme schließen lässt (BUCHRIESER et al. 1994a, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999a). Auch wenn mit Hilfe der PFGE eine Vielzahl verschiedener Pulstypen identifiziert werden können, so gibt es häufig einige wenige dominierende Typen die in einer Vielzahl von Proben anzutreffen sind, die anderen treten dagegen zahlenmäßig zurück und sind manchmal auch in nur einer einzigen Probe nachweisbar (BUCHRIESER et al. 1994a, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000a, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a). Auch zur Aufklärung von epidemiologischen Zusammenhängen bei größeren Krankheitsausbrüchen mit *Y. enterocolitica* ist diese Methode erfolgreich angewendet worden (SWAMINATHAN et al. 2001).

C Eigene Untersuchungen

1 Ziel der Arbeit

Wie bereits in der Literatur dargestellt (**Punkt 2.1.3**) nimmt die Zahl an einer Yersiniose Erkrankter in der Bevölkerung Deutschlands stetig zu. Dieser Trend soll durch eigene Untersuchungen erfasst werden und dabei Altersstrukturen, Geschlechterverteilung sowie saisonale Schwankungen der humanen Yersiniose mit früheren Ergebnissen verglichen und diskutiert werden.

Es stellt sich zudem die Frage nach der Infektionsquelle. Neben der direkten Übertragung scheint der alimentäre Weg eine wichtige Rolle zu spielen. Das Schwein, ein häufiger und zudem symptomloser Träger von pathogenen Yersinien, wurde immer wieder als ein potentieller Hauptüberträger der menschlichen Yersiniose diskutiert. In dieser Arbeit sollen deshalb gesammelte *Yersinia* Stämme von Menschen, sowie Stämme die aus Schweinefleisch, aus Schlachtnebenprodukten, sowie aus der unmittelbaren Umgebung der Schlachttierverarbeitung isoliert wurden, näher charakterisiert und verglichen werden. Zusätzlich sollen auch nicht pathogene Stämme von *Yersinia* mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese charakterisiert werden und die erhaltenen Bandenmuster diskutiert werden.

2 Herkunft der Stämme

2.1 Humane *Yersinia*-Stämme

Während eines Zeitraumes von November 2001 bis Dezember 2002 wurden alle *Yersinia* - Stämme, die in einem humanmedizinischen Diagnostiklabor in München isoliert wurden, gesammelt. Die Stämme stammten aus Stuhlproben von Patienten mit enteralen Beschwerden, die auf Anforderung des behandelnden Arztes auf pathogene Keime untersucht wurden. Einsender waren niedergelassene Ärzte sowie Kliniken aus ganz Bayern, die meisten Proben stammten jedoch aus dem Großraum München. Insgesamt konnte *Yersinia* Spezies aus 61 Patienten isoliert werden, die Stämme von 36 Patienten wurden für die weitere Charakterisierung mit PFGE verwendet (**Tabelle 6** und **Tabelle 15** im Anhang H).

2.2 Übrige *Yersinia*-Stämme

Bei den anderen *Yersinia*-Stämmen, die mit den humanen Stämmen verglichen werden sollten, handelte es sich um bereits am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs vorhandene Stämme. Dies waren in erster Linie Stämme vom Schwein (Schweinefleisch, Schlachtnebenprodukte und Umgebungsproben), die aus Einzelhandelsproben in München bzw. am Münchner Schlachthof in einem Zeitraum von 1999 bis 2001 isoliert wurden (**Tabelle 6**).

Tabelle 6: Zusammenstellung der verwendeten *Yersinia* Stämme

Proben	Jahr der Isolierung	Anzahl Stämme	Typisierung der Stämme (jeweilige Anzahl)
Schweineschlachthof	1999-2000		
Tonsillen		1	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
Faeces		2	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
Zunge		8	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
Lunge		7	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
Herz		6	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
Zwerchfell		3	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
Leber		3	<i>Y. enterocolitica</i> 1A (1) <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 (2)
Nieren		1	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
Fleischverarbeitender Betrieb	2000		
Schweineprodukte		11	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 (10) <i>Y. frederiksenii</i> (1)
Metzgereien	2001		
Schweinefleisch (Tierkörper und Nebenprodukte)		20	<i>Y. enterocolitica</i> 1A (1) <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 (14) <i>Y. kristensenii</i> (2) <i>Y. frederiksenii</i> (1) <i>Y. intermedia</i> (2)
Umgebungsproben		4	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 (1) <i>Y. kristensenii</i> (1) <i>Y. rohdei</i> (1) <i>Y. intermedia</i> (1)
Chinchilla	2002		
Faeces		2	<i>Y. enterocolitica</i> 3/O:3
Wasserschwein	2002		
Lunge		1	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
Humanstämme	2001-02		
Faeces		61	<i>Y. enterocolitica</i> 1A (2) <i>Y. enterocolitica</i> 2/O:9 (2) <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 (54) <i>Y. bercovier/mollaretii</i> (2) <i>Y. frederiksenii</i> (1)
Summe		130	

Die Stämme aus dem Einzelhandel stammten dabei aus verschiedenen Fleischteilen des Schlachtkörpers, aus inneren Organen und aus Hackfleischproben, einige Stämme waren aber auch aus der unmittelbaren Umgebung der Fleischverarbeitung, wie von Arbeitsflächen und von Werkzeugen isoliert worden (KOCH 2003). Die Schlachthofstämme wurden aus

Schweinekot, den Tonsillen, den Nieren, und dem Geschlinge(Zunge, Herz, Lunge, Zwerchfell, Leber) isoliert (BUCHER 2002). Weitere Stämme aus Schweineprodukten stammten von verschiedenen, fleischverarbeitenden Großbetrieben aus Bayern (HANK 2003).

Auch die Kotproben zweier an Enteritis erkrankter Chinchillas, sowie eines an akuter Yersiniose verendeten Wasserschweines aus dem Münchner Tierpark, wurden in diese Studie miteinbezogen.

Die größere Zahl dieser Stämme gehörte dem Bioserovar 4/O:3 an (55 von 69 Stämmen), weitere Bioserovare waren 3/O:3 (2) und das Biovar 1A (2). In geringerer Anzahl wurden auch weitere *Yersinia* Spezies gesammelt: *Y. frederiksenii* (2), *Y. kristensenii* (3), *Y. intermedia* (3), *Y. rohdei* (1), und *Y. pseudotuberculosis* (1). Insgesamt wurde mit 69 "nichthumanen" Stämmen eine PFGE durchgeführt (**Tabelle 6**). Die Stämme wurden wie unter **Punkt 4** beschrieben aufbewahrt.

3 Kultivierung und Identifizierung von *Yersinia*

3.1 Humanstämme

Neben der Untersuchung auf *Salmonella*, *Shigella*, enteropathogene *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Campylobacter* wurde auch eine Untersuchung auf *Yersinia* routinemäßig durchgeführt.

Zur Untersuchung auf *Yersinia* Spezies erfolgte ein Direktausstrich der fraglichen Stuhlprobe auf den selektiven Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Nährboden (CIN), der als Fertignährboden erworben wurde. Dafür wurde der Nährboden geviertelt und 5 µg der Probe mit einer sterilen Einmalöse aufgebracht und ausgestrichen. Die Bebrütung der Platten erfolgte bei +37°C für 24 h.

Eine verdächtige Kolonie wurde auf CIN-Nährboden subkultiviert, lag eine Reinkultur des verdächtigen Isolates vor, so schloss sich eine biochemische und serologische Bestätigung an. Dafür wurde ein kommerziell erhältliches, biochemisches Miniatursystem (Enterotube™) benutzt, die Seroagglutination erfolgte mit im Handel befindlichen Testseren O:3 und O:9. Als Negativkontrolle diente physiologische Kochsalzlösung.

Die Biotypisierung bestätigter Stämme wurde am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs durchgeführt.

3.2 Lebensmittelstämme

Die Isolierung von *Yersinia* Spezies erfolgte mit Hilfe zweier verschiedener Selektivaneicherungen. Zunächst erfolgte eine Voranreicherung der Proben in einer nicht selektiven Trypticase-Soja-Bouillon (TSB) für 16-18 h bei +25°C. Mit je 100 µl der Voranreicherung wurden dann die beiden selektiven Anreicherungsmedien Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Nährbouillon (ITC) und Modifizierte Rappaport-Bouillon (MRB) beimpft. Die Bebrütung dieser Bouillons erfolgte bei +25°C für 48 h, danach wurden jeweils 100 µl auf eine CIN-Platte übertragen und für 18-20 h bei +30°C bebrütet (BUCHER 2001).

Verdächtige Kolonien wurden auf ihre Fähigkeit Harnstoff zu spalten untersucht. Im positiven Fall folgte eine nähere biochemische Charakterisierung der Kolonie mit dem Api 20E-Test. War die Kolonie als *Y. enterocolitica* bestätigt, so schloss sich eine Biotypisierung gemäß dem modifizierten Biotypisierungsschema nach Wauters et al. (1987) an (**Tabelle 5**). Die Seroagglutination erfolgte mit den im Handel befindlichen Testseren O:3 und O:9.

Eine Auflistung der Einzelergebnisse zur Charakterisierung der im Rahmen dieser Studie verwendeten Stämme findet sich in **Tabelle 15** im Anhang H.

4 Lagerung bestätigter Stämme

Waren Stämme eindeutig als *Yersinia* identifiziert, so wurden sie bis zu ihrer weiteren Verwendung auf dem sogenannten Microbank-System® gelagert. Dazu wurde ein nicht selektiver Trypticase-Soja-Agar (TSA) mit einer typischen Kolonie beimpft und 24 h bei +37°C bebrütet. Am folgenden Tag wurden einige der gewachsenen Kolonien abgenommen und in das Microbank-Röhrchen verbracht. Desweiteren wurde nach den Herstellerangaben verfahren.

5 Untersuchungsmethode

Um das Genom verschiedener *Yersinia* Stämme vergleichen zu können kam die Pulsfeldgelelektrophorese zum Einsatz. Als Protokoll zur Probenaufbereitung diente ein bereits am Institut etabliertes Verfahren (STOCK 1999). Grundlage war die von MASLOW et al. (1993b) beschriebene Methode, sowie ein stark verkürztes Extraktionsverfahren das bei SPERNER et al. (1998) für die Typisierung von *Clostridien*-Spezies Anwendung fand. So konnte das PFGE-Protokoll von ehemals 7 Tagen auf nur noch 5 Tage verkürzt werden.

Nach einer Anreicherung bestätigter Bakterienkolonien über Nacht wurden die Zellen zunächst in einem Tris NaCl Puffer (PIV) gewaschen und anschließend konzentriert, jeweils 0,5 ml dieser Zellsuspension wurde in gleichen Anteilen einer niedrig schmelzenden Agarose eingebettet. Zu den erstarrten Agaroseblöcken wurde dann ein Lysispuffer mit zugesetzten Enzymen (RNase und Lysozym) gegeben, die Lysis der Bakterienzellwand erfolgte bei +37°C über Nacht unter Anwesenheit von EDTA um zelleigene DNAsen zu inhibieren. Daraufhin wurden die Agaroseblöcke in einer Mischung aus Detergentien (Lauroylsarkosin) und Proteasen (Proteinase K) inkubiert um störendes Protein zu entfernen, die sogenannte ESP Lösung wurde in Abständen von jeweils 2 Stunden zweimal gewechselt, eine dritte Inkubation in ESP erfolgte wiederum über Nacht, die Inkubationstemperatur war stets + 50°C.

Von den so präparierten Agaroseblöcken wurden Scheibchen von 1 mm Dicke hergestellt, die vor dem Restriktionsverdau einer viermaligen Waschung mit einem Tris-EDTA Puffer unterzogen wurden um Proteinase K Rückstände zu entfernen. Der Restriktionsverdau wurde mit den Enzymen *NotI* bzw. *XhoI* und *ApaI* nach Herstellerangaben (New England Biolabs®) durchgeführt. Zum Einsatz kamen 10 U bzw. 20 U Restriktionsenzym. Nach abgeschlossener Restriktion wurde das bereits vorbereitete 1 %-ige Elektrophoresegel mit den Agarose-scheibchen beladen und in die Elektrophoresekammer eingebracht. Als Elektrophoresepuffer kam ein Tris-Borsäure-EDTA Puffer (TBE) mit 4 Teilen Wasser verdünnt zum Einsatz.

Die Pulsfeldgelelektrophorese wurde nach dem Prinzip des in Kapitel 4.2.6 beschriebenen CHEF-Systems gemäß Herstellerangaben durchgeführt (Gene Navigator® von Pharmacia Biotech). Die Pulsbedingungen orientierten sich an Erfahrungswerten früherer Studien, linear ansteigende Pulszeiten von 1 s bis 18 s während einer Gesamtlaufzeit von 20 Stunden bei

200 V und +10°C wurden gewählt. Anschließend wurde das Gel zur Darstellung der DNS-Banden in Ethidiumbromid gefärbt und auf dem UV Transiluminator sichtbar gemacht.

Das Protokoll ist im Anhang H dargestellt.

Auswertung Da sich das Genom von *Y. enterocolitica* gegenüber Spontanmutationen als äußerst stabil erwies und sich deshalb über Jahre hinweg nicht verändern (NAJDENSKI et al. 1994), wurden bereits Restriktionsprofile die sich in nur einer DNS Bande voneinander unterscheiden als nicht identisch betrachtet. Bei der Auswertung der *NotI* und *XhoI*-Profile wurden nur Banden berücksichtigt die größer sind als 48.5 Kb, bei Restriktion mit *ApaI* wurden Fragmente ab einer Größe von 97.0 Kb für die Auswertung herangezogen.

6 Verwendetes Untersuchungsmaterial

Nährmedien und Reagenzien, sowie Rezepte, Geräte und Laborbedarf, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Anhang H aufgeführt.

D Ergebnisse

1 Isolierung von *Yersinia* Spezies aus Humanproben

Während eines Zeitraumes von November 2001 bis Dezember 2002 konnten *Yersinia* Spezies aus 61 Patienten isoliert werden.

1.1 Isolierungsrate und jahreszeitliche Verteilung

Im Jahr 2002 wurden insgesamt 22.835 Stuhlproben auf das Vorhandensein von pathogenen Keimen untersucht. *Yersinia* Spezies konnte dabei in 50 Fällen isoliert werden, die Isolierungsrate lag somit bei 0,21%.

Die prozentual höchsten Isolierungsraten waren in den Monaten Januar, Mai und November festzustellen, die Isolierungsraten lagen in diesen Monaten über 0,3%. September und Oktober waren die Monate mit den geringsten Isolierungserfolgen, hier lag die Isolierungsrate unter 0,1%. Während der warmen Jahreszeiten (Frühling und Sommer) wurden mehr *Yersinien* isoliert, als während der kalten Jahreszeiten im Herbst und Winter, insgesamt waren saisonale Schwankungen jedoch eher gering (**Abbildung 4**).

Die Verteilung der einzelnen *Yersinia* Spezies- Funde über den gesamten Untersuchungszeitraum 2002 ist in **Tabelle 7** dargestellt.

Tabelle 7: Anzahl und Verteilung von *Yersinia* Spezies im Jahr 2002

Monat	Anzahl positiver Stämme / Untersuchte Stuhlproben	Prozentuale Isolierungsrate
Januar	6 / 1891	0,32%
Februar	2 / 1725	0,12%
März	3 / 1681	0,18%
April	6 / 2018	0,29%
Mai	6 / 1581	0,38%
Juni	5 / 1745	0,28%
Juli	5 / 2431	0,21%
August	5 / 1821	0,28%
September	2 / 2066	0,10%
Oktober	2 / 2138	0,09%
November	6 / 1996	0,30%
Dezember	2 / 1742	0,11%

1.2 Ergebnisse der Speziescharakterisierung

Die insgesamt 61 Stämme von *Yersinia* Spezies wurden biochemisch differenziert, 58 Stämme (95%) konnten als *Y. enterocolitica* identifiziert werden. Ein Stamm konnte als *Y. frederiksenii* (2%) identifiziert werden; bei zwei weiteren Sämmen handelte es sich um *Y. bercovier/Y. mollaretii* (3%).

Im Jahr 2002 waren 48 der insgesamt 50 isolierten Stämme *Y. enterocolitica* (96%), *Y. frederiksenii* und *Y. bercovier/Y. mollaretii* konnten jeweils einmal nachgewiesen werden und machten somit 1% aller isolierten Stämme aus.

Die *Y. enterocolitica*-Stämme wurden mit Hilfe der Bio-und Serotypisierung näher untersucht. Dabei konnten 54 Stämme dem Bioserovar 4/O:3 zugeordnet werden, dieses Bioserovar machte somit mit 93 % aller Stämme den größten Anteil aus. Das Bioserovar 2/O:9 konnte nur zweimal isoliert werden (3 %). Für Biovar 1A, das ebenfalls zweimal isoliert werden konnte (3 %), standen keine Testseren zur Serotypisierung zur Verfügung.

Im Jahr 2002 gehörten 44 der insgesamt 48 Stämme von *Y. enterocolitica* dem Bioserovar 4/O:3 an (92%), das Bioserovar 2/O:9 und 1A konnten jeweils zweimal isoliert werden (4%)

(Tabelle 8).

Tabelle 8: *Yersinia enterocolitica*-Stämme-Ergebnisse Bio-und Serotypisierung im Jahr 2002

Biovar	Serovar	Anzahl	(%)
4	O:3	44	(92)
2	O:9	2	(4)
1°		2	(4)
Insgesamt		48	(100)

1.3 Demographische Verteilung

Der größere Anteil der an einer Yersiniose Erkrankten betraf Frauen (62%), während Männer nur 38% der Erkrankungsfälle ausmachten. In den Altersgruppen der 6-20jährigen, sowie der 21-50jährigen war der Nachweis von Yersinien am häufigsten und lag bei 32% und 30% aller Erkrankten. Ältere bzw. jüngere Personen erkrankten seltener, in diesen beiden Altersgruppen lag die Erkrankungshäufigkeit jeweils bei 18% und 20% (Tabelle 9).

Tabelle 9: Alters- und Geschlechtsverteilung an Yersiniose erkrankter Personen

Geschlecht	Alter							
	<6	(%)	6-20	(%)	21-50	(%)	>50	(%)
Männlich	1	(2%)	7	(14%)	9	(18%)	2	(4%)
Weiblich	9	(18%)	9	(18%)	6	(12%)	7	(14%)

1.4 Symptomatik der Erkrankung

In der Mehrzahl der Fälle (46%) wurde von den einsendenden Ärzten eine Enteritis als Vorbericht angegeben, häufig hatten die Erkrankten auch Symptome einer Gastroenteritis (18%). Insgesamt wurden jedoch nur selten Angaben zur Symptomatik gemacht (siehe dazu Tabelle 14 im Anhang H.)

1.5 Isolierungsrate anderer, lebensmittelassoziierter Krankheitserreger

Neben *Y. enterocolitica* konnten folgende, andere pathogenen Keime isoliert werden, die ebenfalls mit dem Verzehr von Lebensmitteln in Verbindung gebracht werden: *Salmonella* Spezies 681 Stämme, (2,98% aller Proben), *Campylobacter* Spezies 805 Stämme (3,52%) *Shigella* Spezies 16 Stämme (0,07% aller Proben). Im Vergleich dazu lag die Isolierungsrate für *Yersinia* Spezies mit 0,21% an dritter Stelle (**Tabelle 10**). Die jahreszeitliche Verteilung der Nachweise dieser Krankheitserreger ist aus **Abbildung 4** ersichtlich. Für Salmonellen und *Campylobacter* ist eine Häufung positiver Befunde in den Sommermonaten festzustellen.

Tabelle 10: Isolierungsrate lebensmittelassoziierter Krankheitserreger 2002

Monat	Salmonella	Yersinia	Campylobacter	Shigella
Januar	41	6	49	0
Februar	35	2	29	2
März	30	3	46	0
April	28	6	51	4
Mai	27	6	74	0
Juni	83	5	145	1
Juli	40	5	37	2
August	134	5	123	0
September	92	2	66	4
Oktober	92	2	89	1
November	50	6	47	1
Dezember	29	2	49	1
Insgesamt	681	50	805	16

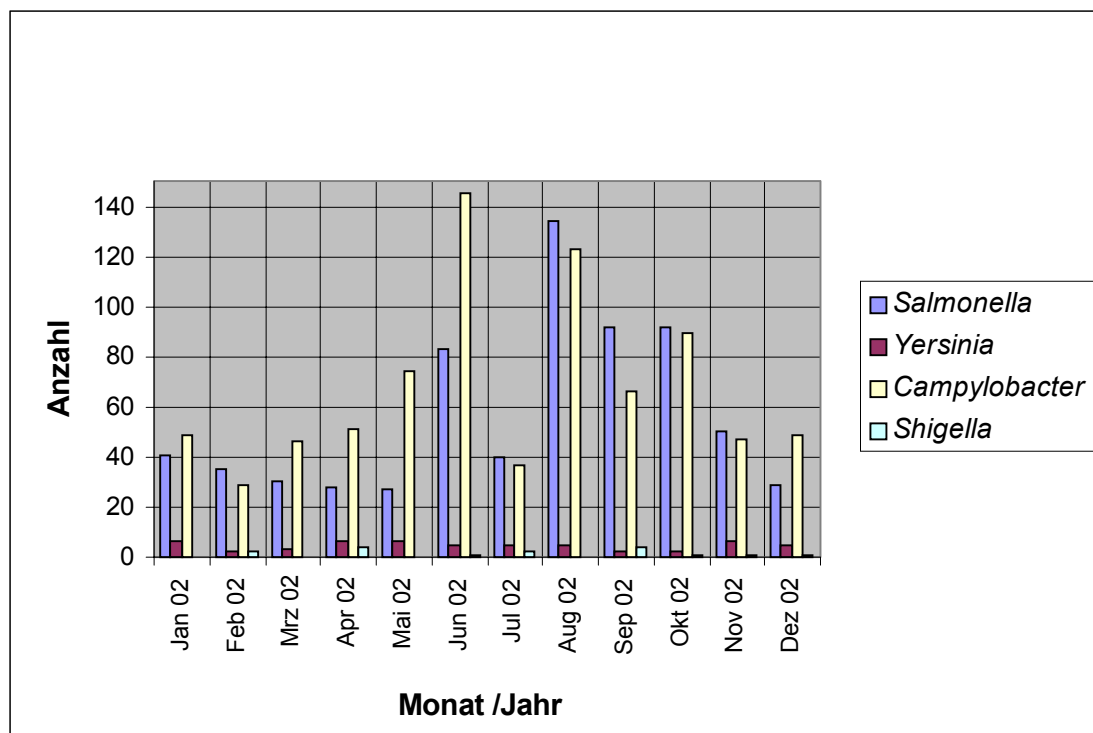


Abbildung 4: Jahreszeitlicher Verlauf Lebensmittel assoziierter Infektionen beim Menschen

2 Ergebnisse der PFGE

Insgesamt wurden 105 Stämme von *Yersinia* Spezies mittels PFGE untersucht. Dabei wurden Humanstämme mit den Nichthumanstämmen verglichen. Eine Übersicht der verwendeten Stämme sowie ihrer Charakterisierung findet sich in **Tabelle 16** im Anhang H.

2.1 Charakterisierung von *Yersinia enterocolitica* des Bioserovars 4/O:3

2.1.1 Ergebnisse der Restriktion mit drei verschiedenen Enzymen

Die Mehrzahl der Stämme dieser Studie gehörten dem Bioserovar 4/O:3 an. Insgesamt waren es 84 Stämme (80 %). Jeder Stamm wurde parallel mit den Enzymen *NotI*, *ApaI* und *XhoI* untersucht (**Abbildungen 5, 6 und 7**).

Bei Restriktion dieser Stämme mit dem Enzym *NotI* konnten pro Stamm 13 bis 16 Banden erzeugt werden, mit einer Größenordnung zwischen 48.5 Kb und 388.0 Kb. 17 verschiedene Pulstypen waren unterscheidbar, die Restriktionsmuster verschiedener Stämme waren sich dabei sehr ähnlich und unterschieden sich in 1 Bande (N1 und N3) bis maximal 10 Banden (N12 und N17).

Die Restriktion der Stämme mit dem Enzym *ApaI* ergab pro Stamm eine Bandenzahl von 10 bis 12 mit einer Größe zwischen 97.0 Kb und 388 Kb. Hier konnten ebenfalls 17 verschiedene Pulstypen unterschieden werden, auch mit diesem Enzym erzeugte Restriktionsprofile waren sich sehr ähnlich. Die Stämme unterschieden sich in voneinander in 2 (A16 und A17) bis maximal 11 Banden (A8 und A12). Vor allem die Banden im Größenbereich zwischen 242.5 Kb und 388 Kb waren bei 14 der insgesamt 17 Stämme nicht voneinander zu unterscheiden.

Wurde das Enzym *XhoI* angewandt, so konnten Banden mit einer Größe zwischen 38.5 Kb und 194.0 Kb erzeugt werden, abhängig vom Stamm waren 7 bis 11 unterschiedliche Banden erkennbar. Mit diesem Enzym konnten nur 11 verschiedene Pulstypen dargestellt werden, diese Pulstypen unterschieden sich voneinander in 1 Bande (X1 und X2) bis höchstens 7 Banden (X3 und X8). Auch diese Restriktionsmuster waren sich somit sehr ähnlich.

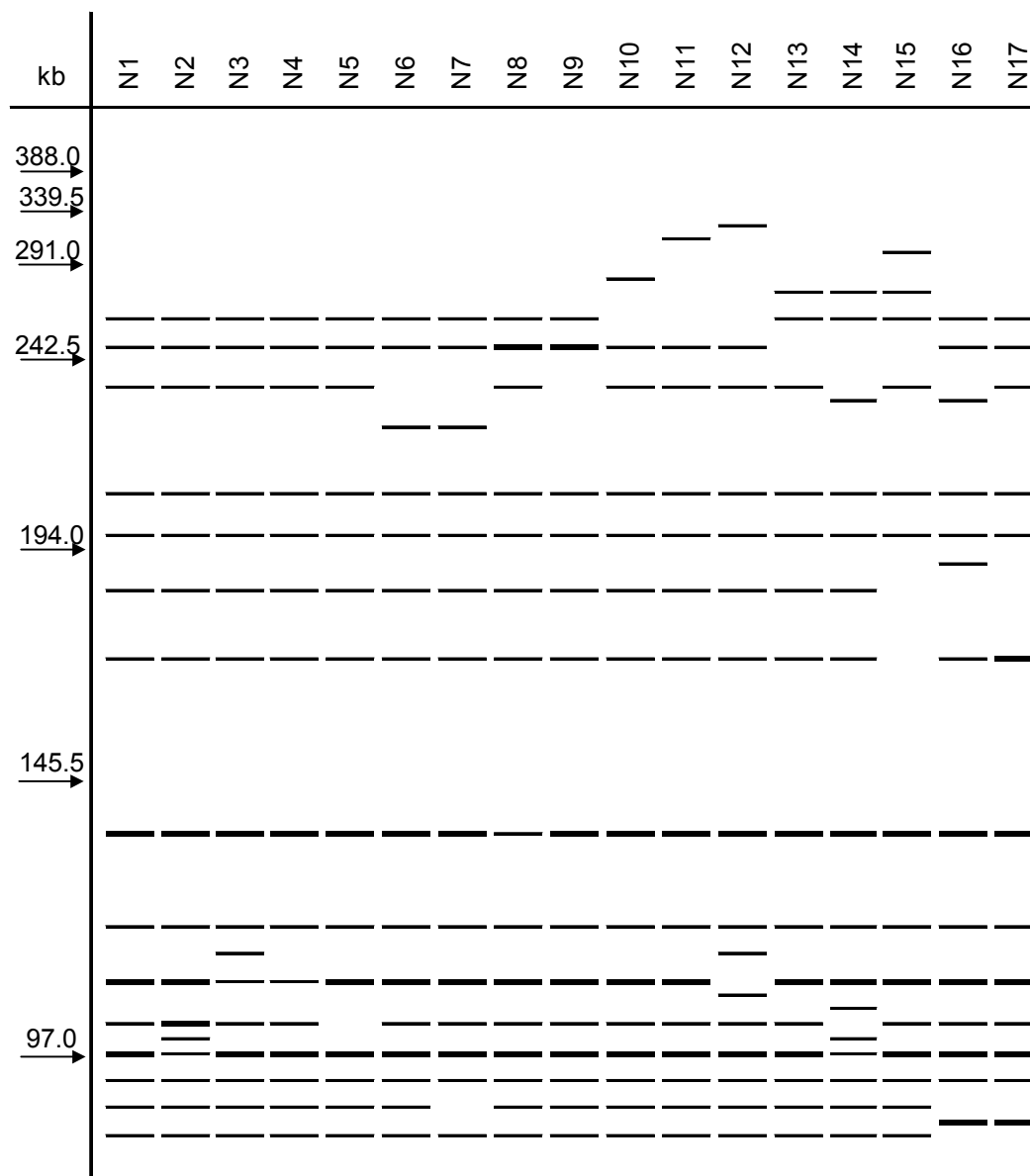


Abbildung 5: Unterscheidbare Restriktionsprofile des Bioserovars 4/O:3 nach Verdau mit *NotI*

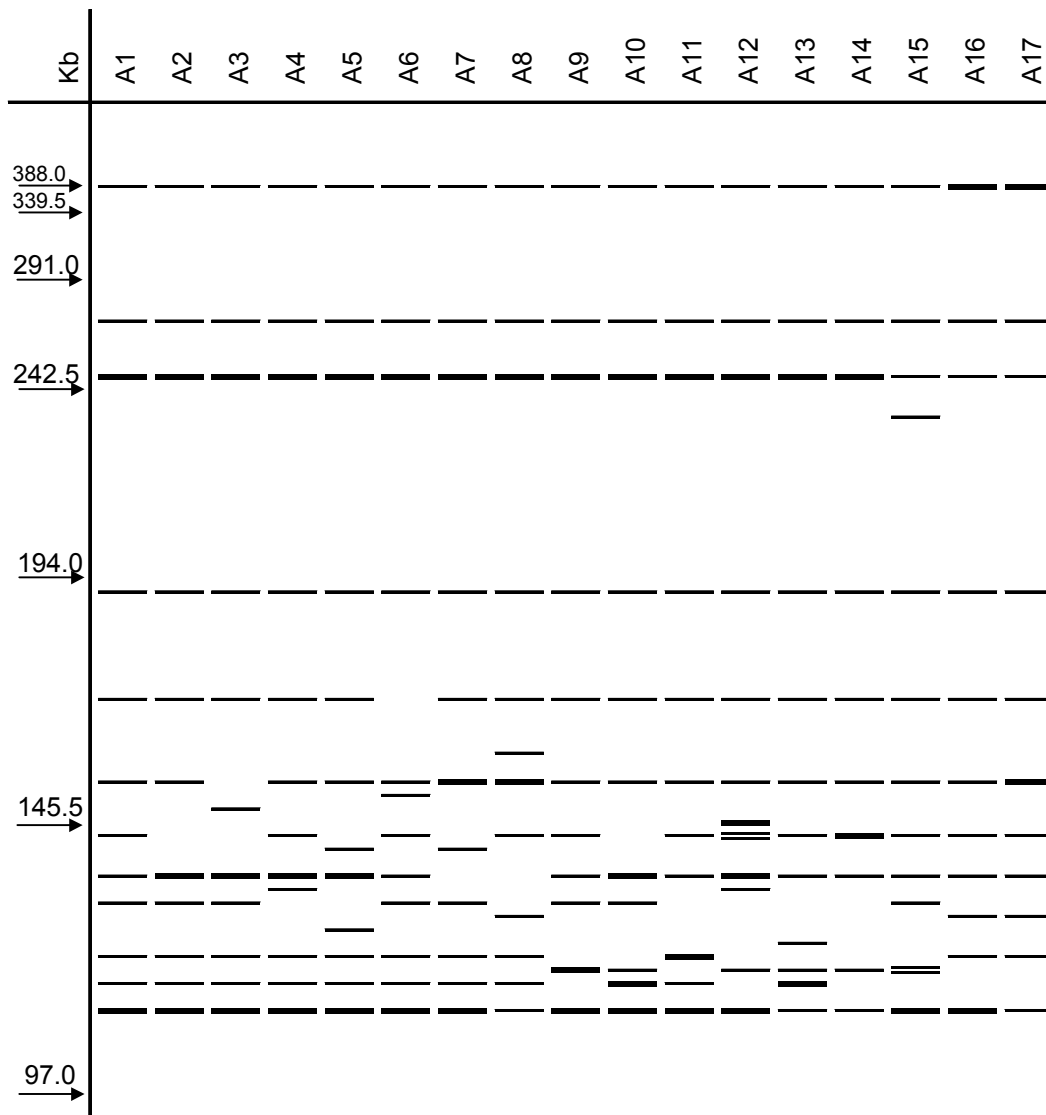


Abbildung 6: Unterscheidbare Restriktionsprofile des Bioserovars 4/O:3 nach Verdau mit *ApaI*

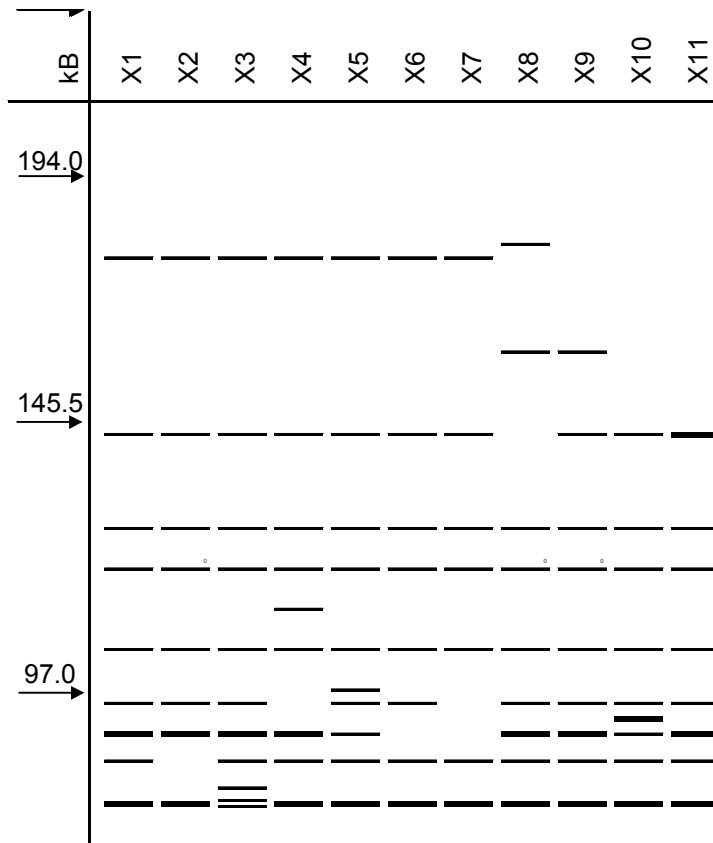


Abbildung 7: Unterscheidbare Restriktionsprofile des Bioserovars 4/O:3 nach Verdau mit *XhoI*

2.1.2 Unterscheidung von verschiedenen Genotypen

Durch Kombination der Pulstypen die mit den drei Enzymen *NotI*, *ApaI* und *XhoI* erzeugt worden waren, erhielt man 24 voneinander unterscheidbare Genotypen (**Tabelle 11**). Die einzelnen Pulstypen waren dabei unterschiedlich häufig in den verschiedenen Genotypen vertreten, so waren die Pulstypen N1, N4, N16, A1, A2 und X8 in zwei oder mehr Genotypen zu finden. Auffallend oft war der Pulstyp X1 anzutreffen, er war in 12 der 24 unterscheidbaren Genotypen vertreten.

Tabelle 11: Darstellung der verschiedenen Genotypen des Bioserovars 4/O:3 nach Restriktion mit den Enzymen *NotI*, *ApaI* und *XhoI*

Genotyp	Pulstypen		
	<i>NotI</i>	<i>ApaI</i>	<i>XhoI</i>
I	N1	A1	X1
II	N1	A2	X1
III	N1	A3	X3
IV	N1	A4	X4
V	N1	A10	X5
VI	N2	A1	X1
VII	N3	A1	X1
VIII	N4	A2	X1
IX	N4	A9	X1
X	N4	A12	X7
XI	N5	A1	X1
XII	N6	A11	X1
XIII	N7	A13	X9
XIV	N8	A2	X1
XV	N9	A14	X6
XVI	N10	A6	X2
XVII	N11	A1	X1
XVIII	N12	A1	X1
XIX	N13	A7	X8
XX	N14	A8	X8
XXI	N15	A5	X8
XXII	N16	A16	X11
XXIII	N16	A17	X10
XXIV	N17	A15	X1

2.2 Charakterisierung der übrigen *Yersinia* Spezies und anderer Bioserovare von *Yersinia enterocolitica*

21 weitere Stämme, die nicht dem Bioserovar 4/O:3 von *Y. enterocolitica* angehörten wurden ebenfalls mit Hilfe der PFGE charakterisiert, das Enzym *NotI* kam dafür zum Einsatz (**Abbildung 8**).

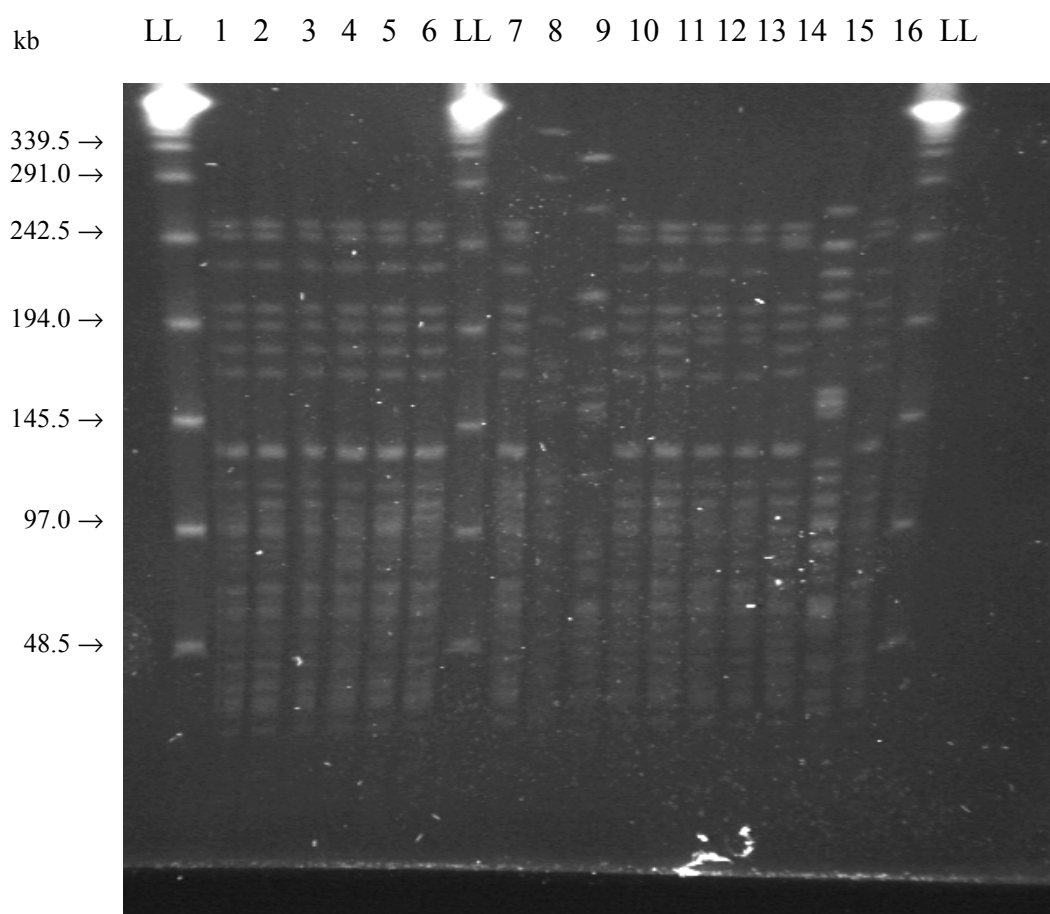


Abbildung 8: Verschiedene Restriktionsprofile nach Verdau mit *NotI*: **1:** N4, **2-3:** N1, **4-5:** N4, **6:** N2, **7:** N3, **8:** YF1, **9:** YI1, **10-11:** N1, **12-13:** N16, **14:** N9, **15:** YR und **16:** N7.

Abhängig vom Erregerstamm konnten 10 bis 16 Banden mit einer Größenordnung zwischen 48.5Kb und 388 Kb erzeugt werden. Bei Vergleich der verschiedenen *Yersinia* Spezies konnten keinerlei identische Bandenmuster ausgemacht werden, die verschiedenen Spezies unterschieden sich in mindestens 23 Banden voneinander (**Abbildung 9**). Auch Stämme die

der gleichen Spezies angehörten zeigten ein sehr inhomogenes Bild, so wiesen die vier untersuchten Stämme von *Y. enterocolitica* des Bioserovars 1A Restriktionsprofile auf die sich in 13 bis 23 Banden unterschieden (1A1:1A2, bzw. 1A1:1A3).

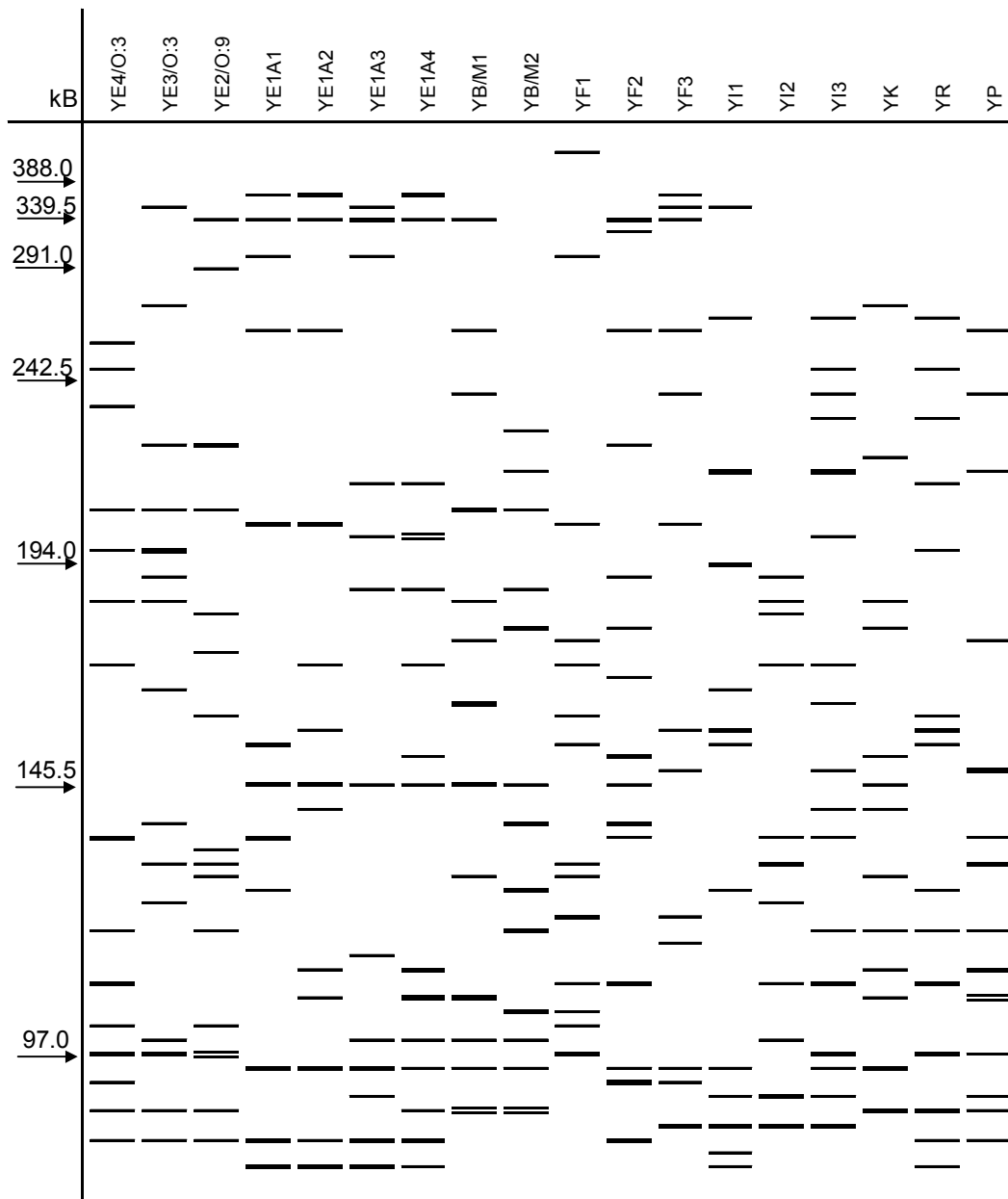


Abbildung 9: Darstellung verschiedener *Yersinia* Spezies, sowie der Bioserovare 2/O:9, 3/O:3 und Biovar 1A von *Yersinia enterocolitica*, Restriktion mit *NotI*

2.3 Vergleich der Genotypen von Humanstämmen mit Nichthumanstämmen

Die 84 Stämme des Bioserovars 4/O:3 setzten sich folgendermaßen zusammen: 29 Stämme waren aus humanen Stuhlproben isoliert worden, die restlichen 55 Stämme stammten größtenteils aus Schweinefleisch, sowie aus Schlachtnebenprodukten, und waren am Schlachthof, in fleischverarbeitenden Betrieben und in Metzgereien isoliert worden (Tabelle 6).

Von den 24 unterscheidbaren Genotypen stellten sich zwei Genotypen, I und II, als dominierend heraus (Tabelle 12).

Tabelle 12: Verteilung der verschiedenen Genotypen des Bioserovars 4/O:3 unter humanen und nichthumanen Stämmen

Genotyp	Anzahl der	
	Humanstämmen	Nichthumanstämmen
I	6	9
II	7	8
III		2
IV	2	2
V		1
VI	1	2
VII		1
VIII	2	2
IX	3	7
X		1
XI		1
XII		3
XIII		1
XIV	4	1
XV		1
XVI	2	
XVII		2
XVIII		3
XIX	1	2
XX		2
XXI		1
XXII	1	
XXIII		2
XXIV		1

Die Genotypen I und II waren bei 30 Stämmen zu finden, diese beiden Genotypen machten somit mehr als ein Drittel (35,7%) aller getesteten Stämme aus. Genotyp I und II waren die am häufigsten isolierten Genotypen aus den humanen Stuhlproben, bei 44,8% der Proben konnten sie festgestellt werden und auch bei den nichthumanen Stämmen waren diese beiden Genotypen häufig; 17 Proben und somit 30,9% der nichthumanen Stämme gehörten einem dieser beiden Genotypen an.

Genotyp I konnte sowohl aus unterschiedlichsten Organen am Schlachthof, aus Hackfleisch in den fleischverarbeitenden Betrieben als auch von Schweineteilstücken in der Metzgerei gefunden werden. Genotyp II war auf Organen im Schlachthof und in Hackfleisch der Fleischereibetriebe zu finden, nicht aber in den Metzgereien (**Tabelle 13**).

Ebenfalls sehr häufig und in 10 (11,9%) der untersuchten Proben anzutreffen war der Genotyp IX. Dieser war vor allem in den nichthumanen Proben häufig zu finden, die Nachweisrate lag bei 18%, Stämme dieses Genotyps konnten am Schlachthof und in den Metzgereien isoliert werden, nicht aber in den fleischverarbeitenden Betrieben. Immerhin 10,3% der Humanstämme gehörten diesem Genotyp an.

Seltener, nämlich 3mal bis maximal 5mal konnten die Genotypen IV, VI, VIII, XII, XIV, XVIII und XIX nachgewiesen werden. Fünf dieser sieben Genotypen waren sowohl aus humanen Stuhlproben als auch aus Schweineprodukten nachweisbar, sie machten zusammen 19 der insgesamt 84 Proben aus, daraus ergibt sich eine Nachweisrate für diese Genotypen von 22,6%; die beiden anderen Genotypen (XII und XVIII) wurden beim Menschen nicht gefunden: Genotyp XII war ausschließlich in den fleischverarbeitenden Betrieben verbreitet, Genotyp XVIII war nur aus Tonsillen und Fäces von Schweinen am Schlachthof isolierbar.

Die restlichen 14 Genotypen waren nur einmal bis maximal zweimal zu finden und machten zusammen 22,6% aller untersuchten Stämme aus. Die beiden Genotypen XVI und XXII waren dabei nur aus Humanproben darstellbar, alle weiteren Genotypen (III, V, VII, X, XI, XIII, XV, XVII, XX, XXI, XXIII und XXIV) waren nur aus nichthumanen Proben zu isolieren und stammten vom Schlachthof, aus den fleischverarbeitenden Betrieben oder aus den Metzgereien. Ein gemeinsamer Genotyp, der sowohl in Humanproben, als auch in den nichthumanen Proben vorkommt, fand sich hier nicht.

Tabelle 13: Verteilung der verschiedenen Genotypen auf die nichthumanen Stämme

GT	Schlachthof							Fleischverarbeitender Betrieb		Metzgerei			
	Zu	Hz	Lu	Zw	Ni	Le	T/F	Fleisch	Sch	Fl	Org	Umg	
I	1		1					4		3			
II		1	2	2		1		2					
III	1		1										
IV		1									1		
V									1				
VI					1					1			
VII									1				
VIII	1										1		
IX	3	1	1	1						1			
X											1		
XI									1				
XII								3					
XIII												1	
XIV	1												
XV										1			
XVI													
XVII	1	1											
XVIII							3						
XIX		1						1					
XX			2										
XXI		1											
XXII													
XXIII											2		
XIV						1							
XXV													
Summe	8	6	7	3	1	2	3	10	3	6	5	1	

GT	Genotyp	Le	Leber
Zu	Zunge	T/F	Tonsille/Fäces
Hz	Herz	Sch	Schlachtkörper
Lu	Lunge	Fl	Fleischteile
Zw	Zwerchfell	Org	Organe
Ni	Niere	Umg	Umgebung

Zusammenfassend wurden 8 unterscheidbare Genotypen des Erregers *Y. enterocolitica* Bioserovar 4/O:3 gefunden, die sowohl aus Untersuchungsmaterial des Menschen als auch aus Schweinematerial isoliert werden konnten, solche gemeinsamen Genotypen waren bei 70,2% aller untersuchten Stämme vorhanden. Bei 90% der untersuchten Humanstämme waren Genotypen zu finden, die auch aus Schweinematerial isoliert werden konnten, zwei weitere Genotypen waren dagegen in den Schweineproben nicht zu finden.

Stämme aus Schlachtproben vom Schwein waren nur zu 60% mit Humanstämmen identisch, solche gemeinsamen Genotypen fanden sich vor allem auf den inneren Organen des Schweins (Zunge, Herz, Lunge, Niere, Leber) und auch auf dem Zwerchfell. Hier wurden fast zwei Drittel aller gemeinsamen Stämme gefunden. Weitere gemeinsame Stämme waren aus Schweinefleisch zu isolieren. Von den Schlachthofproben waren 58% aller Stämme mit den Humanstämmen identisch, von den Stämmen aus den fleischverarbeitenden Betrieben und Metzgereien hatten jeweils 21% mit den Humanstämmen gemeinsame Genotypen. Daneben existierten beim Schwein eine Reihe von weiteren Genotypen (14) die nicht aus menschlichen Proben nachgewiesen werden konnten. Vor allem in den Metzgereien waren viele dieser Genotypen vertreten, wenn sie auch nur vereinzelt isoliert werden konnten.

E Diskussion

1 *Yersinia* Spezies in humanen Stuhlproben

1.1 Beurteilung der Isolierungsergebnisse

Der kulturelle Nachweis von *Yersinia* Spezies gelang mit 50 Fällen im Jahr 2002 häufig, *Y. enterocolitica* konnte dabei in 48 Fällen diagnostiziert werden. Die Probenanzahl des untersuchten Labors dürfte etwa 6 % aller in Bayern untersuchter Proben ausmachen, damit ergäbe sich bei Annahme einer gleichen Isolierungsrate für das gesamte Bundesland Bayern eine Zahl von 800 labordiagnostisch ermittelter Fälle von *Y. enterocolitica*, die aufgrund der 2001 eingeführten Meldepflicht der zuständigen Meldebehörde mitgeteilt worden sein müssten. Tatsächlich wurden im Jahr 2002 jedoch nur 632 Fälle von *Y. enterocolitica* in Bayern gemeldet (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2003), die veröffentlichte Meldezahl lag somit unter der Zahl, die im Rahmen dieser Studie erarbeitet wurde.

Eine Ursache dafür könnte sein, dass diesem Erreger in anderen Diagnostiklabors weniger Aufmerksamkeit geschenkt wird und eine Erfassung von *Y. enterocolitica* in der Routinediagnostik nicht immer vorgesehen ist. Die angewandte Untersuchungsmethode nimmt außerdem Einfluss auf die Isolierungsrate und kann somit ebenfalls zu niedrigeren Meldezahlen führen. So wird in manchen Labors statt eines Direktausstriches häufig eine Kälteanreicherung der Stuhlprobe angewandt, die sich negativ auf die Nachweisrate pathogener Yersinien auswirkt. In diesem Zusammenhang wäre es deshalb wünschenswert einen einheitlichen Untersuchungsgang in Form einer DIN-Norm festzulegen und damit Untersuchungsergebnisse vergleichbar zu machen. Zudem finden nicht alle gemeldeten Fälle in den Jahresstatistiken Berücksichtigung, sondern nur Fälle mit einer vollständigen Falldefinition. Ist von einem Isolat beispielsweise nur der labordiagnostische Nachweis vorhanden, das klinische Krankheitsbild aber unbekannt, so wird dieser Fall nicht in der Statistik berücksichtigt. Die Meldezahlen fallen somit niedriger aus als sie tatsächlich sind. Im Jahr 2001 waren es deutschlandweit immerhin 749 Fälle die aufgrund einer fehlenden Falldefinition nicht in die Statistik aufgenommen wurden. Andererseits wird dadurch vermieden, dass z.B. klinisch unauffällige Dauerauscheider, die ebenfalls vorkommen, die Statistik verfälschen.

Die tatsächliche Inzidenz dieses Erregers wird mit Sicherheit unterschätzt, darauf weist die hohe Seroprävalenz in der Bevölkerung hin. 43 % aller deutschen Blutspender haben Antikörper gegen *Y. enterocolitica* und haben sich somit schon einmal mit diesem Erreger aus-

einandergesetzt (MÄKI-IKOLA et al. 1997). Da die Erkrankung jedoch häufig mit nur milden Diarrhoen einhergeht, wird nur selten ein Arzt konsultiert, die Yersiniose wird somit nicht statistisch erfasst. Moderne Nachweisverfahren, die auf molekularbiologischen Methoden beruhen, kommen in der Routinediagnostik nicht zum Einsatz, dies dürfte ebenfalls ein Grund sein für die unterschätzte Nachweisrate.

1.2 Weitere Charakterisierung der Stämme

92% der gefundenen Stämme waren pathogene Bioserovare von *Y. enterocolitica*, apathogene Yersinien wurden somit nur selten gefunden. Dieses Ergebnis rechtfertigt das Vorgehen des Labors, auf weitere Untersuchungen wie Biotypisierung und Pathogenitätsnachweis zu verzichten. Für die Routinediagnostik im humanmedizinischen Bereich ist eine biochemische und anschließend serologische Bestätigung verdächtiger Isolate absolut ausreichend, zumal bereits der ärztliche Vorbericht „enterale Beschwerden“, die Reinkultur des Erregers nach der Anzucht und das Vorliegen der Kolonien in hohen Keimzahlen (Direktkultur) auf die Pathogenität des Isolates hinweisen. Im Gegensatz dazu kann in der Lebensmitteldiagnostik nicht auf eine weiterführende Typisierung verzichtet werden um pathogene Stämme von den hier weit verbreiteten apathogenen Umweltstämmen differenzieren zu können.

Innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* wurde das Bioserovar 4/O:3 am häufigsten nachgewiesen (92%), das Bioserovar 2/O:9 wurde dagegen nur selten gefunden (4%). Das ebenfalls in Deutschland verbreitete Bioserovar 2/O:5,27 konnte in dieser Arbeit nicht diagnostiziert werden. Die Isolierungsrate für 4/O:3 ist mit den aktuellen Zahlen des ROBERT-KOCH-INSTITUTS (2002b) vergleichbar, diesem Bioserovar gehörten im Jahr 2001 89,9% aller typisierten Stämme an. Die Nachweisrate für Bioserovar 2/O:9 lag hier mit 5,8% jedoch höher, und auch das Bioserovar 2/O:5,27 wurde, wenn auch selten, nachgewiesen (0,7%). Auch in anderen Studien war das Bioserovar 4/O:3 den anderen eindeutig überlegen, das Bioserovar 2/O:9 stand stets an zweiter Stelle (BOCKEMÜHL et al. 1978, WUTHE et al. 1982, STOLL 1988, ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1996). Für das Bioserovar 2/O:9 wirkt sich eine Kälteanreicherung förderlich aus (WUTHE et al. 1982), die im untersuchten Labor nicht zur Anwendung kam und die geringe Isolierungsrate dieses Bioserovars erklären könnte. Dass das Bioserovar 2/O:5,27 nicht nachgewiesen werden konnte, kann mit der geringen Zahl untersuchter Proben zusammenhängen. Die statistische Wahrscheinlichkeit dieses Bioserovars zu finden nimmt mit steigender Probenzahl zu.

1.3 Saisonale und demographische Abhängigkeiten der Isolierungsrate

Auch wenn die Isolierungsraten während der einzelnen Monate unterschiedlich waren, so konnten dennoch keine großen saisonale Schwankungen festgestellt werden, zu gleichen Ergebnissen führte auch die für 2001 erhobene Jahresstatistik für Gesamtdeutschland (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2002b).

KIESEWALTER (1992) hingegen, der Keimstatistiken aus der ehemaligen DDR während eines Zeitraumes von 1978-1989 auswertete, konnte eine jahreszeitliche Häufung positiver *Yersinia*-Funde in den Monaten September bis Januar feststellen. Auch in Belgien wurde eine saisonale Abhängigkeit der Isolierungsrate festgestellt, so war diese während der kälteren Jahreszeit stets höher (VERHAEGEN et al. 1998). NEUBAUER et al. (2001c) führen diese Saisonabhängigkeit auf eine haltungsbedingte erhöhte Erregerausscheidung durch resistenzgeminderte Schlachtschweine zurück, ansteigende Yersiniosezahlen in den Wintermonaten sind somit eine Folgeerscheinung der erhöhten Ausscheidungsrate durch das Reservoirtier. Gleichbleibende Isolierungsraten könnten Ausdruck einer bereits stattgefundenen Bestandsdurchseuchung sein.

In dieser Studie waren vor allem die Altersgruppe der 6-50jährigen von einer Yersiniose betroffen, damit fällt der Beginn steigender Erkrankungszahlen mit dem Einschulungsalter zusammen. Viele Kinder nehmen ab diesem Alter häufiger Mahlzeiten außer Haus ein, wie beispielsweise die Schulverpflegung. Die Altersgruppe der 21-50jährigen betrifft die Altersgruppe, die im Berufsleben steht. Auch hier ist es üblich seine Mahlzeiten außer Haus einzunehmen, auch diese Altersgruppe ist damit einem höheren Risiko ausgesetzt an Lebensmittelinfektionen zu erkranken, wenn hygienische Grundregeln vernachlässigt werden. Bisher stellte sich die Yersiniose stets als eine typische Erkrankung von Kleinkindern bis sechs Jahre dar (KIESEWALTER 1992, HOOBKAMP-KORSTANJE und STOLK-ENGELAAR 1995, ROBERT-KOCH-INSTITUTES 2002b). Dass sich im Rahmen dieser Studie eine ganz andere Altersverteilung ergibt konnte abschließend nicht geklärt werden.

1.4 Symptomatik der Erkrankung

Enteritis war in dieser Studie das Leitsymptom einer Yersiniose, diese Feststellung stimmt mit anderen Studien überein (KIESEWALTER et al. 1992, BURNENS et al. 1996), KIESEWALTER et al. (1992) konnten zudem anginöse Infekte als ein häufiges Krankheitsbild ausmachen. Dass anginöse Infekte hier nicht in den ärztlichen Vorberichten erwähnt wurden macht deutlich dass dieses Krankheitsbild nicht mit der Enteritis in Zusammenhang gebracht worden war und somit *Y. enterocolitica* immer noch viel zu selten in differentialdiagnostische Überlegungen mit einbezogen wird. So wurde auch bei keinen der an Enteritis erkrankten Patienten ein gezielter Verdacht auf eine Yersiniose angegeben.

Gemäß Literaturangaben geht eine Yersiniose meist mit milden, selbst limitierten Durchfällen einher, die Tatsache dass die hier untersuchten Patienten einen Arzt aufgesucht hatten, der eine bakteriologische Untersuchung veranlasste weist jedoch darauf hin, dass eine schwerere oder längere andauernde Erkrankung vorgelegen haben muss.

1.5 Andere Infektionserreger

Bei Vergleich der Isolierungsrate von *Y. enterocolitica* in der vorliegenden Studie mit derjeniger anderer Infektionserreger, die ebenfalls als sogenannte „food borne pathogens“ eine Rolle spielen, lag *Y. enterocolitica* an dritter Stelle. Dies stimmt mit den aktuellen Zahlen des ROBERT-KOCH-INSTITUTS überein (2003). Auch die in dieser Untersuchung beobachtete Häufung von positiven *Salmonella*- und *Campylobacter*- Funden in den Sommermonaten ist in der Literatur beschrieben (KIESEWALTER 1992) und hängt mit der optimalen Vermehrungstemperatur dieser Erreger zusammen. Auffallend ist jedoch die Tatsache, dass *Campylobacter* in diesen Untersuchungen die höchsten Isolierungsraten aufwies, dieser Erreger nahm sonst stets Platz zwei hinter den Salmonellen ein. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Zahlen an Salmonellose Erkrankter seit 1992 rückläufig sind (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2002) wozu staatlich reglementierte Bekämpfungsprogramme auf allen Ebenen der Lebensmittelproduktion und -vermarktung mit Sicherheit beigetragen haben. Dem Erreger *Campylobacter* wird hingegen im Hygienemonitoring immer noch zu wenig Beachtung geschenkt.

2 Charakterisierung von *Yersinien* mittels Pulsfeldgelelektrophorese

2.1 Bewertung der Methode

Die PFGE erwies sich als eine hervorragende Methode um das Bioserovar 4/O:3 eindeutig von anderen *Yersinia* Spezies zu unterscheiden. Während sich die Restriktionsmuster von Stämmen dieses Bioserovars untereinander sehr ähnlich waren, wiesen andere *Yersinia* Spezies eine Vielzahl von abweichenden Banden auf und waren auch untereinander deutlich divergierend. Die PFGE kann zwar eine kulturelle Identifizierung nicht ersetzen, da der Erreger in Reinkultur vorliegen muss und zudem die Spezieszugehörigkeit zunächst bestätigt werden muss. Die erzeugten Restriktionsprofile können aber dennoch einen Anhaltspunkt dafür geben, ob Ergebnisse plausibel sind oder ob eine Kontamination mit Fremdkeimen stattgefunden haben muss.

Als eine Alternative zur Bio- und Serotypisierung des Bioserovars 4/O:3 ist die PFGE durchaus verwendbar, da dieses Bioserovar stets sehr ähnliche Restriktionsmuster erzeugte. Inwieweit diese Aussage auch auf andere Bioserovare von *Y. enterocolitica* zutrifft, kann aufgrund zu wenig untersuchter Stämme nicht geklärt werden.

Das Vorhandensein eines Virulenzplasmids wurde in dieser Studie nicht untersucht, gemäß FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001b) ist dieses als 40 Kb große Bande darstellbar, die nur bei pathogenen Vertretern nachgewiesen werden kann und somit einen Pathogenitätsnachweis ersetzt. Die geringen genetischen Variationen innerhalb des pathogenen Bioserovars 4/O:3 waren jedoch ebenfalls ein Hinweis dafür, dass es sich um genetisch eng verwandte Stämme handeln muss, die im Laufe der Zeit aufgrund zufälliger Mutationen entstanden sind. Im Gegensatz dazu zeigten Umweltstämme oder Stämme ohne klinische Relevanz untereinander größere genetische Diskrepanzen.

Als Alternative für die Bio- Serotypisierung, sowie für den Pathogenitätsnachweis erwies sich die PFGE somit als geeignet, der Einsatz eines einzigen Restriktionsenzym ist dafür völlig ausreichend.

2.2 Bewertung der verschiedenen Restriktionsenzyme

Sehr ähnliche Restriktionsmuster erschwerten die Interpretation der Ergebnisse, da die Banden zum Teil sehr nahe beieinander lagen. Dies galt insbesondere nach Restriktion der Stämme mit dem Enzym *ApaI*. Das Enzym *NotI* erwies sich für die Diskriminierung verschiedener Bioserovare und verschiedener *Yersinia* Spezies als hervorragend geeignet. Auch für die Charakterisierung weiterer *Yersinia* Spezies war dieses Enzym gut geeignet.

Zur Diskriminierung innerhalb des Bioserovars 4/O:3 sollten mehrere Enzyme parallel zum Einsatz kommen (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001b). Zwei der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, nämlich *NotI* und *ApaI*, stellten sich als gleichwertig heraus. Mit beiden konnten gleich viele Pulstypen (17) produziert werden. Durch den parallelen Einsatz beider Enzyme konnte die Diskriminierung innerhalb des Bioserovars 4/O:3 um fast 30% erhöht werden. Die Kombination der mit diesen Enzymen erzeugten Pulstypen ergab 24 verschiedene Genotypen. Ein drittes Enzym, *XhoI*, erwies sich als weniger geeignet. Weniger Pulstypen (11) konnten erzeugt werden und dieses Enzym trug auch nicht dazu bei, weitere, noch nicht bekannte Genotypen festzustellen.

Die PFGE wurde bereits häufig zur weiteren Charakterisierung von *Y. enterocolitica* des Bioserovars 4/O:3 angewandt (BUCHRIESER et al. 1994a, NAJDENSKI et al. 1994, ASPLUND et al. 1998, BEE 2000, FILETICI et al. 2000, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a). Es wurden jedoch eine Vielzahl verschiedener Reagenzien angewandt und auch die Protokolle und Pulsbedingungen waren nicht einheitlich. Daraus resultieren Ergebnisse, die nicht miteinander vergleichbar sind. Auch die Namensgebung der verschiedenen Pulstypen wird sehr unterschiedlich gehandhabt. SWAMINATHAN et al. (2001) schlägt deshalb eine standardisierte Nomenklatur in Form eines zehnstelligen Codes vor. Dieser soll den Namen des Pathogens, das verwendete Restriktionsenzym und den Pulstyp beinhalten.

2.3 Vergleichbarkeit der Genotypen von Mensch und Schwein

2.3.1 Gemeinsame Genotypen

Gemeinsame dominierende Genotypen (I und II) waren bereits ein erster Hinweis dafür, dass ein Zusammenhang zwischen den Humanstämmen und den Stämmen von Schweinproben vorhanden sein muss. Diese Genotypen waren zahlenmäßig den anderen Pulstypen überlegen und zudem weit verbreitet. Auch in früheren Studien waren bereits dominierende Pulstypen aufgefallen (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001b). Auffallend war jedoch, dass der weit verbreitete Genotyp I zwar in den fleischverarbeitenden Betrieben, am Schlachthof und in Humanproben zu finden war, nicht aber in den Metzgereien. Ein Grund dafür könnte sein, dass aus den Metzgereien eine Vielzahl verschiedener Genotypen isoliert werden konnten, welche die Wiederfindung des Genotyps I erschwerten.

Die Genotypen fast aller Humanstämme (90%) von *Y. enterocolitica* Bioserovar 4/O:3 konnten auch aus den Proben von Schweinefleisch und Schlachtnebenprodukten isoliert werden. Diese Feststellung erlaubt den Rückschluss, dass Schweinefleisch und Schlachtnebenprodukte eine wichtige Infektionsquelle für den Menschen darstellen müssen. Verschiedene Übertragungswege sind möglich. Am effektivsten ist wohl eine Infektion über rohes, oder nicht durchgegartes Schweinefleisch. Auch wenn primär nur die Tonsillen des Schweines mit pathogenen Yersinien besiedelt sind, kommt es während des Schlachtprozesses zu einer Erregerstreuung auf sämtliche innere Organe. Begünstigt wird dies dadurch, dass am Münchner Schlachthof das Geschlinge (Zunge, Tonsillen, Trachea, Oesophagus, Lunge, Herz, Zwerchfell und Leber) en bloc entnommen wird. Dies erklärt, warum in dieser Arbeit vor allem aus den inneren Organen sehr häufig Stämme isoliert werden konnten, die mit den Humanstämmen identisch waren. Da die meisten untersuchten Organe aus dem Schlachthof stammten, war gerade hier die Isolierungsrate für identische Stämme am höchsten (58% aller gemeinsamen Stämme).

Nach dem Entfernen des Geschlinges können immer noch Reste der Tonsillen am Kopf verbleiben. Da bei der Schweineschlachtung der Kopf am Tier verbleibt ist eine sekundäre Kontamination des Schlachtierkörpers möglich. Durch manuelle Manipulationen während der Fleischuntersuchung besteht zudem die Gefahr, dass Reste der Tonsillen mit Messern, Händen oder Schutzkleidung in Berührung kommen. Eine weitere Verschleppung des Er-

regers ist somit unvermeidbar, vor allem dann, wenn hygienische Grundregeln vernachlässigt werden (NESBAKKEN 1988). Auch Schweinekot stellt, wenn auch seltener, eine Kontaminationsquelle für den Schlachttierkörper dar, wenn die Messer des Schlachtpersonals nach dem Umschneiden des Anus und der Entnahme des Darmes mit dem Schlachttierkörper in Berührung kommen.

Hat eine Kontamination der Schweineschlachtkörpers stattgefunden, kann sich das Bakterium auch in gekühltem Fleisch vermehren. Trotz Einhaltung der Kühlkette und minimaler Ausgangsbelastung können so hohe Keimzahlen erreicht werden, die als Infektionsdosis ausreichend sind (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Deshalb war es nicht verwunderlich, dass in dieser Studie auch in den fleischverarbeitenden Betrieben und auf Einzelhandelsebene Erregerstämme isoliert werden konnten, die mit den Humanstämmen identisch waren. Die Isolierungsrate für identische Stämme lag hier jeweils bei 21%.

Gelangt kontaminiertes Schweinefleisch in den Haushalt, so ist nicht nur der rohe Verzehr dieses Fleisches gefährlich. Während der Zubereitung besteht zudem die Gefahr der Kreuzkontamination anderer, bereits verzehrfertiger Speisen. Werden zwischen den einzelnen Arbeitsschritten die Hände nicht gewaschen, oder Arbeitsmaterial wie Bretter oder Messer nicht gewechselt, so ist das Risiko einer Keimverschleppung hoch.

Häufig wird rohes Schweinefleisch oder innere Organe wie Leber und Herz an Hunde und Katzen verfüttert, diese Tiere stellen dann ebenfalls eine Infektionsquelle für den Menschen dar. Auch wenn das Haustier selbst nicht erkrankt, werden pathogene Yersinien mit der Fäces ausgeschieden. Gerade Kinder mit engen Kontakt zu diesen Hautieren werden dadurch gefährdet (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001c).

2.3.2 Nicht gemeinsame Genotypen

Zwei weitere Genotypen konnten aus den Humanproben isoliert werden, die bei den Schweineproben nicht aufzufinden waren. Ihre Isolierungsrate war jedoch mit 10% aller Humanproben gering.

Hierbei könnte der unterschiedliche Untersuchungszeitraum der Humanproben und Nicht-humanproben eine Rolle spielen. Gemäß TENOVER et al. (1995) müssen die verdächtige In-

Infektionsquelle und der Erkrankte bei einem Krankheitsausbruch in einem geographischen und zeitlichen Zusammenhang stehen. Im Rahmen dieser Arbeit war ein geographischer Zusammenhang gegeben. Sowohl die Schweineproben als auch die Humanproben stammen aus dem Bundesland Bayern. Ein zeitlicher Zusammenhang war jedoch nicht gegeben. Dieser kann auch insofern vernachlässigt werden, da das Genom von Stämmen der Spezies *Y. enterocolitica* zu einem hohen Maß stabil ist und über Jahre hinweg von Mutationen unbeeinflusst bleibt (BUCHRIESER et al. 1994a). Es könnte aber auch sein, dass für diese Genotypen eine weitere, bisher unbekannte Infektionsquelle besteht, und diese Genotypen beim Schwein überhaupt nicht verbreitet sind. Denkbar wäre auch, dass es Genotypen gibt, die nur auf den Menschen adaptiert sind. Diese würden dann nur zwischenmenschlich übertragen werden, z.B. in Form von Schmierinfektionen oder Bluttransfusionen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass diese Genotypen einen anderen Verbreitungsgrad haben und die betroffenen Personen sich während einer Reise damit infiziert haben. Diese These wird gestützt durch die Beobachtung, dass in verschiedenen Regionen unterschiedliche Pulstypen anzutreffen sind.

Beim Schwein existierten eine Reihe von weiteren Genotypen (14), die nicht aus menschlichen Proben nachgewiesen werden konnten. Die Isolierungsrate für diese Genotypen war mit 40% aller Schweineproben hoch, die verschiedenen Genotypen konnten jedoch maximal dreimal isoliert werden. Dies könnte einmal zur Ursache haben, dass diese Genotypen generell nur beim Schwein vorkommen, die genetische Variabilität bei diesem Tier also höher ist als beim Menschen. Da Schweine selten an einer Yersiniose erkranken, sondern meist nur symptomlose Ausscheider sind, wäre auch denkbar dass diese Genotypen eine geringere Virulenz besitzen. Somit würden erst hohe Infektionsdosen zu einer Erkrankung des Menschen führen. Es könnte aber auch sein, dass zu wenige Humanproben untersucht wurden, um diese, nur vereinzelt vorkommenden Genotypen zu isolieren.

Vor allem in den Metzgereien waren viele dieser Genotypen zu finden (7). Eine Ursache hierfür könnte sein, dass auf Einzelhandelsebene Schweineprodukte aus zahlreichen Schlachthöfen aufeinandertreffen. Da jeder Schlachthof eigene Genotypen aufweist, kommt es hier zu einer Durchmischung zahlreicher Genotypen.

Auch Tonsillen und Fäces vom Schweineschlachthof wurden im Rahmen dieser Studie typisiert. Diese Genotypen waren in keinen der anderen Proben zu finden. Die Probenzahl

war jedoch zu gering (3), um Rückschlüsse ableiten zu können. Im allgemeinen sind Yersinien jedoch auf den Tonsillen und in der Fäces von Schweinen weit verbreitet und auch die genetische Variabilität ist hier hoch (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001b). Erst hohe Probenzahlen führen zu Isolierungserfolgen dieser Genotypen aus Schweineprodukten.

Humanstämme und Nichthumanstämme von *Y. enterocolitica* wurden bisher nur selten mit Hilfe der PFGE verglichen. Eine vergleichbare Studie führte FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001b) in Finnland an 212 Humanstämmen und 327 Nichthumanstämmen vom Schwein durch. Die Schweineproben stammten auch hier von Schlachthöfen und aus Metzgereien. 80% der finnischen Humanstämme hatten identische Genotypen mit den Stämmen, die aus Schweinen isoliert worden waren. Auch hier handelte es sich vor allem um Genotypen die auf den inneren Organen der Schweine (Zunge, Leber, Nieren und Herzen) gefunden worden waren. Diese Ergebnisse sind trotz der höheren Probenzahl mit den Ergebnissen dieser Studie (90% der deutschen Humanstämme waren identisch) vergleichbar.

3 Präventivmassnahmen zum gesundheitlichen Verbraucherschutz

Mit Hilfe dieser Arbeit konnte das Schwein eindeutig als wichtige Infektionsquelle für die menschliche Yersiniose identifiziert werden. Es müssen nun als Konsequenz Maßnahmen ergriffen werden die eine weitere Ausbreitung dieses Erregers eindämmen, um gesundheitlich unbedenkliche Lebensmittel erzeugen zu können. Damit muss bereits auf Tierbestandsebene begonnen werden. Bestandssanierungen ähnlich der Salmonellenbekämpfung wären auch hier denkbar und könnten umgesetzt werden durch die Schaffung von *Y. enterocolitica* freien Beständen. Separierung von Neuzugängen, regelmäßige Kontrolluntersuchungen sowie Desinfektionsmaßnahmen wären in diesem Zusammenhang zu nennen.

Die einzelnen Verfahrensschritte während der Schweineschlachtung werden maßgeblich für die breite Erregerstreuung verantwortlich gemacht. Die folgenden Verbesserungsvorschläge im Ablauf der Schlachtung wurden von BUCHER (2002) vorgeschlagen. Tonsillen sollten vom Geschlinge und vom Schlachtkörper entfernt werden, um die Keimverschleppung einzudämmen. Diese Maßnahme wird von der bestehenden Fleischhygieneverordnung bereits gefordert, wird aber am Münchner Schlachthof nur unzureichend umgesetzt. Im Rahmen der Bearbeitung des Schlachtierkörpers und der übrigen Schlachtprodukte ist auf eine strikte Einhaltung der allgemeinen Hygiene zu achten, um eine Übertragung des Erregers durch die Gerätschaften zu vermeiden. Schon alleine durch einen Messerwechsel und die Reinigung der Hände zwischen den einzelnen Tieren kann eine Keimverschleppung wirkungsvoll verhindern. In diesem Zusammenhang muss auch das Hygienebewusstsein des Personals verbessert werden. Der Anschnitt des Mandibularlymphknotens, wie es nach derzeitigen Bestimmungen vorgeschrieben ist, sollte überdacht werden. Zumindest sollte das Anschneiden dieses Lymphknotens als separater Arbeitsschritt durchgeführt werden um eine nachfolgende Erregerstreuung mit dem kontaminierten Messer zu vermeiden.

Eine weitere Möglichkeit zur Eindämmung der Kontamination ist das frühzeitige Absetzen des Kopfes vor dem Beginn der Ausschachtung. Durch den reduzierten Kontakt mit den stark kontaminierten Tonsillen kann somit eine Kontamination des Schlachtkörpers und der Innereien vermieden werden (CHRISTENSEN 1987). Auch über die Schweinefäces kann der Schlachtkörper mit pathogenen Yersinien kontaminiert werden (ANDERSEN 1988). Dies geschieht während des Umschneidens des Anus und der Entnahme des Darms, wenn die Messer des Schlachtpersonals nicht regelmäßig gereinigt werden. Wird das Rektum mit einem

Plastikbeutel verschlossen, führt dies zu einer deutlichen Kontaminationsminderung der Schlachttierhälften.

In Belgien konnte durch Veränderungen im Schlachtablauf die Inzidenz der menschlichen Yersiniose innerhalb eines Zeitraumes von zehn Jahren halbiert werden. Der Verzicht auf die Verwendung von Kaumuskulatur (Masseter) bei der Hackfleischherstellung trug dazu wesentlich bei. An diesem Material waren häufig Tonsillenreste anhaftend, die dann das Hackfleisch mit pathogenen Yersinien kontaminierte (TAUXE et al. 1987).

Um Lebensmittelinfektionen erfolgreich vorzubeugen ist auch eine ausreichende Aufklärung des Verbrauchers notwendig. Sie kann durch Verbraucherverbände, durch die amtliche Lebensmittelüberwachung, durch wissenschaftliche Organisationen aber auch durch die Lebensmittelwirtschaft selbst erfolgen. Wichtig ist, dass sachdienliche Informationen ohne Panikmache den Kenntnisstand von Verbrauchern hinsichtlich des Vorkommens von Lebensmittelinfektionen nachhaltig verbessern. Das Einhalten der Kühlkette, eine Schärfung des Bewusstseins über mögliche mikrobiologische Kreuzkontaminationen von Speisen im Haushalt, der Verzicht auf Verzehr von rohem oder nicht durchgegartem Fleisch, sowie das Einhalten von Lagerzeiten sind dabei zu bedenken. Die Vermittlung eines Problembewusstseins für die Gesundheitsrisiken durch psychrotrophe pathogene Keime, die sich auch bei Kühlschranktemperaturen noch vermehren können, muss ebenfalls vorangetrieben werden.

Auch der Tierarzt kann zur Aufklärung beitragen. Tierbesitzer sollten nachdrücklich darauf hingewiesen werden, auf das Verfüttern von Schweinefleisch in roher oder nicht durchgegartem Form zu verzichten. Auch der Gesichtspunkt des eigenen Gesundheitsrisikos das von an Yersiniose erkrankten Tieren ausgeht, sollte dabei nicht außer Acht gelassen werden.

F Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Studie wurden während eines Zeitraumes von November 2001 bis Dezember 2002 *Yersinia* Spezies aus Stuhlproben an Enteritis erkrankter Patienten isoliert und aufbewahrt. Dies geschah im Rahmen der Routinediagnostik eines humanmedizinischen Labors, die Proben stammten aus ganz Bayern, schwerpunktmäßig jedoch aus dem Großraum München. Die Stuhlproben wurden dafür im Direktausstrich auf dem *Yersinia* selektiven Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Nährboden (CIN) für 24 h bei 37°C kultiviert. Eine einzelne verdächtige Kolonie wurden nach Subkultivierung mittels im Handel befindlicher biochemischer Miniatursysteme (Enterotube™) und Testseren biochemisch und serologisch bestätigt. Zur näheren Charakterisierung der Stämme schloss sich die Biotypisierung an.

Insgesamt konnten 61 Stämme von *Yersinia* Spezies aus 61 Patienten von November 2001 bis Dezember 2002 isoliert werden. 58 (95%) der Stämme waren *Y. enterocolitica*, 54 Stämme davon (93%) gehörten dem pathogenen Bioserovar 4/O:3 an, 2 Stämme (3%) dem ebenfalls pathogenen Bioserovar 2/O:9. Zwei weitere Stämme waren dem nicht-pathogenen Biovar 1A zuzuordnen.

Im Jahr 2002 konnte *Yersinia* aus 50 (0,21%) von insgesamt 22.835 untersuchter Stuhlproben isoliert werden. *Y. enterocolitica* war dabei in 48 (96%) der Fälle nachweisbar, das Bioserovar 4/O:3 machte 44 (92%) der Stämme aus. Das Bioserovar 2/O:9 konnte zweimal (4%) isoliert werden. *Yersinien* konnten in allen Altersgruppen nachgewiesen werden, eine jahreszeitliche Abhängigkeit der Erregerisolierung konnte nicht festgestellt werden. Im Vergleich mit anderen Erregern lebensmittelbedingter Enteritiden war *Yersinia* Spezies an dritter Stelle nach *Campylobacter* und *Salmonellen*, die in 805 (3,52%) und 681 (2,98%) der Stuhlproben nachweisbar waren.

Im zweiten Teil dieser Studie wurden 36 Humanstämme und 69 Nichthumanstämme von *Yersinia* mit Hilfe der PFGE charakterisiert. Die Humanstämme waren dabei während eines Zeitraumes von November 2001 bis Juni 2002 isoliert worden. Die nichthumanen Stämme waren zwischen 1999 und 2002 gesammelt worden, die Mehrzahl dieser Stämme (62/69) waren porcinen Ursprungs. Insgesamt konnten aus den 105 Stämmen bei paralleler Anwendung der Restriktionsenzyme *NotI*, *ApaI* und *XhoI* 41 verschiedene Genotypen erzeugt werden, die Unterscheidung verschiedener *Yersinia* Spezies war anhand von eindeutig von-

einander abweichender Bandenmuster möglich. Die 84 Stämme des Bioserovars 4/O:3 ergaben nach Restriktion mit allen drei Enzymen 24 unterscheidbare Genotypen. Zwei Genotypen (I und II) waren dabei dominierend und konnten sowohl aus Humanstämmen, als auch aus Nichthumanstämmen am häufigsten isoliert werden. Die Genotypen fast aller Humanstämme (90%) waren identisch mit denjenigen der nichthumanen Stämme, die 26 identischen Humanstämme gehörten dabei 8 verschiedenen Genotypen an. Die nichthumanen Stämme waren porcinen Ursprungs und vom Schlachttierkörper, den Innereien und von Schweinefleisch isoliert worden.

Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass *Y. enterocolitica* häufig als Enteritiserreger des Menschen in Bayern eine Rolle spielt. Das am weitesten verbreite Bioserovar ist dabei 4/O:3, das einzige Bioserovar das auch aus Schweinen in Südbayern isoliert werden konnte. Schweinefleisch sowie essbare Innereien erwiesen sich dabei als eine wichtige Infektionsquelle für die Yersiniose des Menschen. Die PFGE mit dem Enzym *NotI* erwies sich als ein geeignetes Werkzeug um *Yersinia* Spezies näher zu charakterisieren, durch den parallelen Einsatz der Enzyme *NotI*, *ApaI* und *XhoI* war eine weitere Diskriminierung innerhalb des Bioserovars 4/O:3 möglich.

G Summary

Human Yersiniosis in Munich area and pork and by-products as possible infection source

Yersinia enterocolitica of bioserovar 4/O:3 is the most common pathogenic type found in pigs and pork including edible offal in Southern Germany. Limited epidemiological data is available of human *Y. enterocolitica* infections in Bayern. The sources and transmission routes of yersiniosis are not clear. This work was conducted to get more information on the epidemiology in Munich area.

In the first part of this work, the human strains were isolated from faecal samples of patients with diarrhoea during the period from November 2001 to December 2002. *Yersinia* was isolated from the faeces using direct culturing on selective CIN agar plates. One typical colony per sample was identified using Enterotube™. All *Yersinia* strains were bio- and serotyped. In all, 61 *Yersinia* strains were isolated from 61 patients. Fifty-eight (95%) strains were identified as *Y. enterocolitica* of which 54 (93%) were belonging to pathogenic bioserovar 4/O:3, two (3%) strains to pathogenic bioserovar 2/O:9 and two to non-pathogenic biovar 1A. In 2002, *Yersinia* was found from 50 (0,21%) patients when 22.835 faeces samples were studied. *Y. enterocolitica* was identified in 48 (96%) cases. The bioserovar 4/O:3 was found in 44 (92%) patients and bioserovar 2/O:9 in two (4%) patient. *Y. enterocolitica* was found in all age groups and 60% of the patients were females. No seasonal variation was seen. *Yersinia* was the third most common bacterial pathogen after *Campylobacter* found in 805 (3,52%) faecal samples and *Salmonella* found in 681 (2,98%) samples.

In the second part of this work, 36 human and 69 non-human *Yersinia* strains were characterised with PFGE. The human strains were isolated during the period from November 2001 to June 2002. The non-human strains were isolated between 1999 and 2002. Most (62/69) of these strains were from porcine origin. In total, 41 genotypes were obtained when the 105 strains were characterised with PFGE using *NotI*, *ApaI* and *XhoI* enzymes. The *Yersinia* spp. could easily be distinguished from each other with *NotI* enzyme. Twenty-four genotypes were obtained when the 84 strains belonging to bioserovar 4/O:3 was characterised with all three enzymes. Most (90%) of the human strains were indistinguishable from the non-human strains. These 26 indistinguishable human strains were belonging to 8 genotypes. The non-human strains were from porcine sources and isolated from carcasses, offal and pork.

These results demonstrate that *Y. enterocolitica* is frequently isolated from patients with diarrhoea in Munich area. The most common type in humans is the bioserovar 4/O:3, which is so far the only pathogenic type found in pigs in Southern Germany. PFGE with *NotI* enzyme was useful tool to identify *Yersinia* spp. Using *NotI*, *ApaI* and *XhoI* enzymes, the strains of bioserovar 4/O:3 could efficiently be subtyped. A major infection source of human yersiniosis was revealed to be pork and edible offal.

H Anhang

1 PFGE-Protokoll

1.Tag: Anzüchten der Kolonien auf TSA Agar

- TSA Platten im 50°C Brutschrank vortrocknen
- Kügelchen mit Stichöse aus der Mikrobank entnehmen
- Auf TSA Platte verbringen und mit steriler Öse einen 3Ösenausstrich anfertigen
- Bebrüten der Platten bei 30°C ON

2.Tag: Einbringen der Kolonien in TSB Bouillon

- 3-5 kleine Kolonien mit steriler Öse in 5ml TSB Bouillon inokulieren
- Inkubation der TSB Bouillon bei 30°C ON für 18 h
- Bebrütungszeit unbedingt einhalten!! Bakterien befinden sich dann in der späten log Phase
- Längere Bebrütungszeiten führen zu einer Zunahme der Polysaccharide die dann später die Lysis erschweren

-Für den nächsten Tag wird benötigt:

Sterile Tuberkulinspritzen

Sterile 12 ml Zentrifugenröhrchen aus Glas mit Stopfen

Sterile Plastikröhrchen 15 ml und 5 ml

Sterile Pipettenspitzen

Sterile Meßzylinder und Bechergläser

Lösungen: PIV Puffer

Lysispuffer

RNase

Lysozym

3.Tag: Einbetten in Agarose und Zelllysis:

- Eis holen
- Zentrifuge bei 500 x g für 15 min vorkühlen
- Wasserbad auf 60°C erwärmen
- 12 ml Zentrifugenröhrchen beschriften und mit jeweils 5 ml kaltem PIV füllen
- ON Bakterienkulturen in TSB auf Eis geben
- Bakterienkultur vortexen und jeweils 2 ml davon in Röhrchen mit 5 ml PIV verbringen, anschließend gut vortexen
- Bakterienkultur in PIV bei 1000 x g, und 4°C für 15 min zentrifugieren. (Sedimentbildung am Boden muss sichtbar sein- evt. zweimal zentrifugieren)
- Während des Zentrifugierens Agarose in PIV herstellen und im Wasserbad über der Flamme eines Bunsenbrenners vollständig lösen
- 5 ml Plastikröhrchen zum erwärmen ins Wasserbad stellen
- Tuberkulinspritzen und 15 ml Röhrchen beschriften, in den Kühlschrank legen
- Jeweils 0,5 ml der gelösten Agarose in PIV in 5 ml Röhrchen abfüllen und anschließend im 60°C Wasserbad warm halten
- Parafilmstückchen zum Verschließen bereitstellen
- Nach dem Zentrifugieren PIV Überstand dekantieren
- Bakterienzellen in 750 µl PIV resuspendieren und vortexen
- Röhrchen auf Eis stellen
- Vortex, Tuberkulinspritzen, Parafilm, Abfallbehälter, Pipettenspitzen bereitstellen
- Jeweils 0,5 ml der Bakterienzellsuspension in Röhrchen mit 0,5 ml gelöster Agarose verbringen und gut vortexen
- Agarose-Zellmischung in Tuberkulinspritze aufziehen und mit Parafilm verschließen
- Tuberkulinspritzen mit Agarose-Zellmischung für 0,5 h auf Eis legen (nicht kürzer!)
- in der Zwischenzeit Lysis Lösung nach Rezept herstellen
- Skalpell mit Alkohol sterilisieren
- Erstarre Agarose-Zellmischung aus Tuberkulinspritzen in drei gleich große Stücke schneiden und in 15 ml Röhrchen geben
- 4 ml Lysis Lösung dazupipettieren
- Röhrchen ON im 37°C Wasserbad schräg liegend und mit Schütteln inkubieren

Für den nächsten Tag werden benötigt:

Sterile Plastikröhrchen 15 ml

Sterile Bechergläser und Messzylinder

Lösungen: ES Puffer

Proteinase K Stammlsg.

4.Tag: Deproteinisierung

- Eis holen
- Wasserbad auf 50°C heizen
- ESP-Lösung herstellen
- Über Nacht in Lysislösung inkubierte Röhrchen kurz auf Eis legen damit die Agaroseblöckchen beim Pipettieren nicht beschädigt werden
- Lysislösung absaugen und verwerfen
- 2 ml ESP-Lösung auf die Agaroseblöckchen pipettieren
- 2 h bei 50°C im Schüttelwasserbad inkubieren
- ESP Lösung absaugen, 2 ml frisches ESP zugeben und erneut 2 h bei 50°C inkubieren
- ESP absaugen, 2 ml frisches ESP zugeben
- Bei 50°C ON mit Schütteln inkubieren

5.Tag:

- Schließt sich keine Weiterbearbeitung an: ESP-Lösung zur Aufbewahrung nochmals wechseln!!
- Die Agaroseblöckchen können dann bis zu 2 Jahre bei 4°C aufbewahrt werden.
- Werden die Agaroseblöckchen in der darauffolgenden Woche weiter bearbeitet, so werden sie übers Wochenende im Kühlschrank aufbewahrt.

Für die darauffolgende Woche werden benötigt:

Sterile Safe Lock-Reaktionsgefäße

Sterile Bechergläser und messzylinder

Sterile Erlenmayerkolben

Lösungen: TE 10:1

TBE

Restriktionsenzyme und Lambda Ladder

Ethidiumbromid Stammlösung

1.Tag: Restriktionsenzymverdau und Gelherstellung

- Eis holen
- Safe Lock Reaktionsgefäße beschriften
- Frische 15 ml Röhrrchen beschriften, Parafilm zurechtschneiden
- Wasserbad auf Restriktionsenzymtemperatur (z.B. 37°C) einstellen
- ESP-Lösung von übers Wochenende im Kühlschrank gelagerten Röhrrchen abkippen, 2 der 3 Blöcke mit Glasspatel in frisches Röhrrchen verbringen, 3.Block von hinten in dazugehörige Tuberkulinspritze schieben und mit sterilem Skalpell 1 mm Scheibchen abschneiden.
- Agarosescheibchen in Safe Lock Reaktionsgefäß geben.
- in die Tuberkulinspritze TE 10:1 aufziehen und mit Parafilm verschließen
- auf die verbliebenen Agaroseblöckchen im Röhrrchen 2 ml frische ESP-Lösung pipettieren, und beides (Tuberkulinspritzen und Röhrrchen im Kühlschrank aufbewahren.
- Auf die Agarosescheibchen im Safe Lock Reaktionsgefäß 200 µl TE 10:1 Lösung pipettieren und bei 37°C im Schüttelwasserbad für 15 min waschen
- Diesen Waschschrift 3x wiederholen mit jeweils frischer TE Lösung.

- Während der TE Waschungen Gel herstellen:
- Gelträger in Elektrophoresekammer einsetzen, und mit Hilfe einer Libelle ausbalancieren
- PFGE Gel 1%ig herstellen, in Mikrowelle lösen und Verdunstungsverlust mit sterilem Aqua bidest auffüllen
- Gelgießrahmen auf Gelträger auflegen, Kamm bereitlegen, und Gel bei geschlossener Tür gießen
- Evtl. vorhandene Blasen mittels Pipette absaugen, Kamm einsetzen, und Gel erkalten lassen (ca. 30 min)
- Elektrophorese Gebrauchspuffer (0,25 TBE-Lösung) ansetzen und in Elektrophoresekammer einfüllen
- Pufferumwälzpumpe einschalten und eine Temperatur von 8°C einstellen
- in der Kammer soll ein Temperaturbereich von 13-16°C erreicht werden, der während der Elektrophorese nicht überschritten werden sollte
- Hexagonale Elektrode in Aqua bidest wässern
- Gel nach 30 min in Elektrophoresekammer einsetzen

- Vorelektrophorese entweder 1,5 h oder über Nacht Dazu Power supply und Controller anschalten. Am Power Supply entsprechendes Programm auswählen: 200 V, 100 mA Controller-Programm auswählen 20 h, 1 sec-18 sec
- Nach abgeschlossenen TE Waschungen Lösung absaugen
- 100 µl frisches TE auf die Agarosescheibchen pipettieren und für 20 min auf Eis geben
- in der Zwischenzeit Restriktionspuffer ohne Enzym herstellen und in vier Safe Lock Reaktionsgefäße abfüllen
- TE Lösung abpipettieren, 100 µl Restriktionspuffer aus zwei der vier Reaktionsgefäße auf die Proben geben und nochmals für 20 min auf Eis
- Während dieser Äquilibration Restriktionsenzym in die beiden verbliebenen Reaktionsgefäße mit Restriktionspuffer zugeben
- Restriktionspuffer zur Äquilibration absaugen, je 100 µl Restriktionspuffer mit Enzym zu den Scheibchen geben und nach Herstellerangaben im Schüttelwasserbad inkubieren
- Nach abgeschlossenem Enzymverdau Agarose Scheibchen auf Eis geben und Enzymlösung abpipettieren
- mit Glasspatel und Deckgläschen Scheibchen in die Geltaschen schieben
- Drei Scheibchen von Lambda Ladder als Größenstandard in freie Geltaschen zwischen den Proben schieben
- Geltaschen mit flüssiger Agarose verschließen
- Nach Beendigung der Vorelektrophorese Pulsfeld-Elektrophorese-Programm auswählen, für *Y. enterocolitica* 20 h, 1 sec-18 sec, 200 V, 100 mA

2.Tag: Färben des Gels und Gelauswertung

- Nach abgeschlossener Elektrophorese Gel mit sterilem Skalpell vom Geltisch lösen
- 60 min in Ethidiumbromid-Färbelösung färben
- Gel anschließend einige Minuten bis Stunden wässern
- Gel in UV Transilluminator Workstation legen und ausrichten
- Programm Multianalyst[®] am PC aufrufen
- Aufnahme anfertigen und am Computer nachbearbeiten

2 Nährmedien und Reagenzien

2.1 Isolierung und Identifizierung von humanpathogenen *Yersinia* Spezies

Feste Nährböden (Fertigplatten)

CIN-Agar (Cefsulodin-Irgasan- Novobiocin- Agar)	Becton-Dickinson BD	4354088
TSA-Agar (Trypticase-Soja-Agar)	Becton-Dickinson BD	4354051

Hilfsmittel zur Biotypisierung

BBL [®] Enterotube [™] II	Becton-Dickinson BD	4373176
Api 20E Testsystem zur Identifizierung von Enterobacteriaceae	bioMérieux Sa,	20 100/20 160

Hilfsmittel zur Serotypisierung

Monospezifische Agglutinations- Seren O:3 und O:9	SIFIN	TS 1701 u TS 1703
---	-------	-------------------

Aufbewahrungsmedium für typisierte Stämme

Mikrobank [®]	PRO-LAB DIAGNOSTICS	PL160
------------------------	------------------------	-------

2.2 Anreicherung und Konzentrierung von Stämmen für die PFGE

TSA-Agar/CASO-Agar

(Trypticase-Soja-Agar/Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar)

Merck,105458	40g
Aqua dest.	ad 1000ml

TSB-Bouillo/CASO-Bouillon

(Trypticase-Soja-B./Caseinpepton-Sojamehlpepton-B.)

Merck,105459	30g
Aqua dest.	ad 1000ml

<u>PIV-Puffer(pH 7,6)</u>	Menge/16Stämme
(Rezept sh. Punkt2.)	107ml

2.3 Einbetten in Agarose

<u>Agarose in PIV, 2%ig</u>	Menge/16 Stämme
Agarose Low Melt Preparative Grade	0,22g
Bio Rad,162-0017	
PIV-Puffer (pH 7,6)	ad 11ml
(Rezept sh. Punkt 2.)	

2.4 Zelllysis

<u>Lysis-Lösung</u>	Menge/16 Stämme
(vor Gebrauch frisch anzusetzen)	
(Rezepte sh. Punkt 2.)	
RNAse Stammlösung	140ul (2 Eppis)
Lysozym Stammlösung	1400ul (2 Eppis)
Lysis-Puffer	70ml

2.5 Deproteinisierung

<u>ESP-Lösung</u>	Menge/16 Stämme
(vor Gebrauch frisch anzusetzen)	
(Rezepte sh. Punkt 2.)	
Proteinase K Stammlösung	7ml
ES Puffer (pH 8,0)	ad 140ml

2.6 Restriktionsverdau

<u>TE-Puffer 10:1 (pH 7,6)</u>	Menge/16 Stämme
(Rezept sh. Punkt 2.)	32ml

<u>Restriktionspufferlösung ohne Enzym</u>	Menge/2x8Stämme
NE Puffer 10:1	2x 80ul
für <i>NotI</i> Restriktion: NE Puffer 3*	
für <i>Apal</i> Restriktion NE Puffer 4*	
für <i>XhoI</i> Restriktion NE Puffer 2*	
BSA* (Bovines Serum Albumin) 100:1	2x 8ul
Aqua bidest. steril	2x 712ul

<u>Restriktionspufferlösung mit Enzym</u>	Menge/2x8 Stämme
1. <i>NotI</i> Restriktion:	2x 80ul
NE Puffer 3*	2x 8ul
BSA* (Bovines Serum Albumin) 100:1	
<i>NotI</i> Enzym (10.000U/ml)	2x 8ul
New England BioLabs® R0189S	
Aqua bidest. Steril	2x 704ul

*wird mit Restriktionsenzym mitgeliefert

<u>2. <i>ApaI</i> Restriktion:</u>	Menge/2x8 Stämme	
NE Puffer 4*	2x	80ul
BSA* (Bovines Serum Albumin) 100:1	2x	8ul
Apa I Enzym (10.000U/ml)	2x	16ul
New England BioLabs® R0114S		
Aqua bidest. Steril	2x	696ul

<u>3. <i>XhoI</i> Restriktion:</u>		
NE Puffer 2*	2x	80ul
BSA* (Bovines Serum Albumin) 100:1	2	8ul
<i>XhoI</i> Enzym (20.000U/ml)	2x	16ul
New England BioLabs® R0146S		
Aqua bidest. Steril	2x	704ul

2.7 Gelherstellung und Gelladung

PFGE Gel 1%ig

Pulsed field certified Agarose	1,1g
Bio Rad 162-0137	ad 110ml
0,25 TBE	
(Rezept sh. Punkt 2.)	

PFGE Marker-Lambda Ladder

N 0340, New England BioLabs Inc

Elektrophorese Gebrauchspuffer

0,25TBE	
TBE 5x	125ml
(Rezept sh. Punkt 2.)	
Aqua bidest	ad 2500ml

*wird mit Restriktionsenzym mitgeliefert

2.8 Gelauswertung

Ethidiumbromid Färbelösung

Ethidiumbromid-Stammlösung 25ul

10mg/ml

SIGMA[®] E 15-10

TBE 0,25x ad 500ml

(Rezept sh. Punkt 2.)

3 PFGE-Rezepte für Puffer und Stammlösungen

3.1 Puffer

Tris(hydroxymethyl)aminomethane Trizma[®]Base T-6066, SIGMA

Natriumchlorid, A 1149.1000, AppliChem

EDTA-Ethylendiaminetetraessigsäure, E-5134, SIGMA

Brij 58-Polyoxyethylenglycolhexadecylether, P-5884, SIGMA

Deoxycholsäure-Natrium-Salz, D-6750, SIGMA

N-Lauroyl-Sarcosin-Natrium-Salz, L-5125, SIGMA

Borsäure, B-6768, SIGMA

PIV-Puffer (pH 7,6)

Tris 10mM (MG 121,1)	0,606g
----------------------	--------

NaCl 1 M (MG 58)	29,220g
------------------	---------

Aqua bidest	ad 500ml
-------------	----------

Autoklavieren

Lagern 4°C

Lysis Puffer (pH 7,6)

Tris 6mM (MG 121,1)	0,365g
---------------------	--------

NaCl 1M (MG 58)	29,22g
-----------------	--------

EDTA 100mM (MG372,2)	18,61g
----------------------	--------

Brij-58 0,5%ig	2,5g
----------------	------

Natrium Deoxychololat 0,2%ig	1,0g
------------------------------	------

Natrium Lauroyl Sarkosin 0,5%ig	2,5g
---------------------------------	------

Aqua bidest	ad 500 ml
-------------	-----------

autoklavieren

Lagerung bei 4°C

ES Puffer pH 8,0

EDTA 0,5M (MG 372,2) 93,05g

Natrium Lauroyl Sarkosin 10%ig 50,00g

Aqua bidest ad 500,00ml

Autoklavieren

Lagerung bei Zimmertemperatur

TE-Puffer 10:1 pH 7,6

Tris 10mM (MG 121,1) 0,606g

EDTA 1mM (MG 372,2) 0,186g

Aqua bidest ad 500ml

Autoklavieren

Lagern bei Zimmertemperatur

TBE 5x pH 8,0

Tris 446mM (MG 121,1) 54,00g

Borsäure 446mM (MG 61,83) 27,50g

EDTA 10mM (MG 372,2) 3,72g

Aqua bidest ad 1000ml

Autoklavieren

Lagern bei Zimmertemperatur

3.2 Stammlösungen

RNA se Stammlösung

RNA se	10mg
Ribonuclease, R6513, SIGMA	
steriles Aqua dest	1ml
je 70ul in Eppendorf Reaktionsgefäße abfüllen	
Lagerung bei -20°C	

Lysozym-Stammlösung

Lysozym	1g
Lysozym, L6876, SIGMA	
steriles Aqua dest	20ml
je 700ul in Eppi abfüllen	
Lagerung bei -20°C	

Proteinase K Stammlösung

(20Xkonzentriert)

Proteinase K	50mg
Proteinase K, P2308, SIGMA	
ES Puffer	25ml
Rezept sh. Punkt 2.1.	
1h bei 50°C inkubieren (nicht autoklavieren!)	
Lagerung bei 4°C	

4 Geräte und Laborbedarf

4.1 Laborgeräte-Grundaustattung

Brutschrank

-Typ B6200 Heraeus Instruments

Kühlschrank

-Kühl-Gefrierkombination Typ "Premium" Liebherr

-Kühlschrank Typ "profi line" Liebherr

Eismaschine

-Eismaschine UBE 50/35 Zigra Eismaschinen

Schüttelwasserbäder

-Typ 3047 Köttermann

Labortechnik

-Typ 1083 GFL Gesellschaft für
Labortechnik

Autoklav

-Hochdruckdampf-Sterilisator Typ 112 KSG Sterilisatoren
GmbH

Aqua bidest Bereiter

-Fistream™ Cyclon™ Fisons plc.

Waagen

-Analysenwaage MC1 Typ AC 210S Sartorius

-Laborwaage Typ L610 Sartorius

Mikrowelle

-Typ NN-K448W Panasonic

Zentrifuge

-Biofuge 15R Heraeus Sepatech

-Rotor HSA 4100 für
Zentrifugenröhrchen Heraeus Sepatech

Magnetrührer mit Heizplatte

-Magnetrührwerk MR 2002 Heidolph

-Typ RET Janke und Kunkel IKA Labortechnik

PH-Meter

-Microprocessor pH Meter pH 95, Set 2 WTW

-pH Einstabmesskette Modell E50		WTW
<u>Reagenzglasschüttler</u>		
-Vibro-Fix VF2 Janke und Kunkel		IKA Labortechnik
<u>Pipetten</u>		
-Kolbenhubpipette Reference [®] variabel	2-10 ul	Eppendorf
	10-100ul	
	200-1000ul	
	fix 1000 ul	
Kolbenhubpipette pipetman P500		Gilson
Standardtips 100ul und 1000ul		Eppendorf
<u>Sonstiges:</u>		
Ösen: Platin/Iridiumösen 90/10		Bender u. Hobein
Löffelspatel		Merck
Mikromagnetrührstäbchen		WWR international

4.2 Spezialanschaffungen für die PFGE

Elektrophoresegerät

-Gene Navigator™ Elektrophorese Kammer Pharmacia Biotech

Art.181019-19

Basiseinheit mit Pufferumwälzpumpe

-Hexagonaler Elektrodenkit Pharmacia Biotech

Art. 18019-20

Bestehend aus:

Hexagonal-Elektrodenrahmen mit Anschlüssen

Gelträger 15x15cm

Selbstdichtender Gelgießrahmen, Kamm 1mm

Controller

-Gene Navigator™ Controller Pharmacia Biotech

Art. 18-1026-17

Stromversorgung

Electrophoresis Power Supply EPS 600 Pharmacia Biotech

Gelauswertung

-Gel Doc 1000 Video Geldocumentation System Bio Rad

UV Transilluminator Workstation

CCD Camera

PC Software Multianalyst®/PC Version 1.1

4 3 Glaswaren und Verbrauchsmaterial

Glaswaren

-Sterile Bechergläser, Fassungsvermögen 100ml 150ml aus Duran [®]	Schott
-Meßzylinder steril, 25ml 100ml, 250ml, 1000ml Silberbrand [®]	Brand
Sterile Erlenmayerkolben, weithals, 250ml, Duran [®]	neoLab
Sterile Erlenmayerkolben, weithals, 3000ml	Schott
-Laborflaschen mit Gewinde, aus Duran [®] 500ml und 1000ml mit Schraubverschlusskappen PP	Merck
-Glaspipetten Silberbrand Eterna, Klasse B, 5ml	Bender u. Hobein
-Reagenzgläser 160mmx16mm mit STERI Wattestopfen Nr. 14	Schott Schubert
-Zentrifugengläser, ungraduiert, 12ml, mit Rundboden	Bender und Hobein

Verbrauchsmaterial

-15ml Zentrifugenröhrchen aus PS, glasklar, 100mmx16mm, mit Rundboden, Steri Wattestopfen Nr. 14	Spicker Schubert
-5ml Röhrchen aus PS, 75mmx12mm	Spicker
-Tuberkulin-Einmalspritzen, 1ml, steril	neoLab
Parafilm [®] M 4"x250' american	Can company
Sterile Einmalskalpelle	martin
Safe Lock Reaktionsgefäße 1,5ml, farblos	Eppendorf
Wägeschalen aus Plastik	neoLab
Sterile Petrischalen Nr.100	Waldeck

4 Übersichtstabellen zu den Untersuchungsergebnissen

Tabelle 14: Übersicht der *Yersinia* Spezies Stämme aus humanen Stuhlproben im Untersuchungszeitraum 2001/2002

Nr.	Stamm- bezeichnung		Datum der Isolierung	Geschlecht		Alter	Wohnort	Symptome	Sp.	BT	ST
				M	W						
1	HYE	Ref	11.01						YE	4	O3
2	HYE	5661	14.11.01	x		8	Pfaffing	Enteritis	YE	4	O3
3	HYE	6388	16.11.01	x		21	München	Akute Gastroenteritis	YE	4	O3
4	HYE	6940	16.11.01	x		11	Ebefing	Enteritis	YE	4	O3
6	HYE	9297	22.11.01		x	1	Landsberied	Anhaltende Enteritis	YE	4	O3
5	HYE	12031	27.11.01	x		21	München	Enteritis	YE	4	O3
7	HYE	10724	29.11.01	x		18	Markt Indersdorf	Appendicitis	YE	4	O3
8	HYE	12425	29.11.01	x		30	Unterschleißheim	Gastroenteritis	YB/YM		
9	HYE	731	04.12.01		x	1	Geretsried	Enteritis	YE	4	O3
10	HYE	914	04.12.01		x	43	Echeuried	Enteritis	YE	4	O3
11	HYE	6989	19.12.01		x	4	Babersham	Enteritis	YE	4	O3
1	HYE	2093	08.01.02		x	3	Emmering	Enteritis	YE	4	O3
2	HYE	7264	19.01.02		x	9	München	Enteritis	YE	4	O3
3	HYE	7301	21.01.02	x		73	Karlsfeld	Anhaltende Enteritis	YE	4	O3
4	HYE	7428	21.01.02	x		48	Erding	Enteritis	YE	4	O3
5	HYE	11434	30.01.02	x		21	Unterschleißheim		YE	4	O3
6	HYE	12247	31.01.02	x		15			YE	4	O3
7	HYE	5283	14.02.02		x	58	Unterschleißheim		YE	1A	
8	HYE	11215	27.02.02	x		32	Unterschleißheim		YB/YM		
9	HYE	2502	07.03.02	x		41	München		YE	4	O3
10	HYE	8205	20.03.02	x		6	Hohenpassenberg	Gastroenteritis	YE	4	O3
11	HYE	11187	28.03.02	x		30	Berlin	Enteritis	YE	4	O3
12	HYE	3891	11.04.02		x	4	München	Enteritis	YE	2	O9
13	HYE	8588	23.04.02		x	4	München	Enteritis	YE	2	O9
14	HYE	8616	23.04.02		x	59	Ohlstadt	Enteritis	YE	4	O3
15	HYE	8798	23.04.02		x	33	Seehausen		YE	4	O3
16	HYE	9180	24.04.02		x	43	München	Psoriasis	YE	1A	
17	HYE	9426	24.04.02		x	2	Miesbach	Persistierende Enteritis	YE	4	O3
18	HYE	4230	14.05.02		x	25	Puchheim	Notfall	YE	4	O3
19	HYE	4273	14.05.02		x	10	München	Wiederkehrende Enteritis	YE	4	O3
20	HYE	4557	14.05.02	x		7	Gammelsdorf	Gastroenteritis	YE	4	O3
21	HYE	6298	21.05.02		x	82	Olching	Gastroenteritis	YF		
22	HYE	8602	28.05.02		x	1	München	Gastroenteritis	YE	4	O3
23	HYE	8611	28.05.02		x	74	München	Enteritis	YE	4	O3
24	HYE	3337	11.06.02	x		38	München	Enteritis	YE	4	O3
25	HYE	6078	18.06.02		x	1	München	Enteritis	YE	4	O3
26	HYE	8822	25.06.02	x		47	München	Akute Gastroenteritis	YE	4	O3
27	HYE	8926	25.06.02		x	5	Valley	Gastroenteritis	YE	4	O3
28	HYE	10088	27.06.02	x		9	München		YE	4	O3
29	HYE	1950	04.07.02	x		7 Mo	München		YE	4	O3
30	HYE	4249	10.07.02	x		17	München		YE	4	O3
31	HYE	4343	10.07.02		x	57	München	Enteritis	YE	4	O3
32	HYE	6316	16.07.02	x		17	München		YE	4	O3
33	HYE	8750	22.07.02		x	8	Kienberg	Gastroenteritis	YE	4	O3
34	HYE	6296	20.08.02	x		49	Kirchheim	Enteritis	YE	4	O3
35	HYE	6370	20.08.02		x	9	Peiting		YE	4	O3
36	HYE	6383	20.08.02		x	48	München	Enteritis (V.a. Salmonellose)	YE	4	O3

Nr.	Stamm- bezeichnung		Datum der Isolierung	Geschlecht		Alter	Wohnort	Symptome	Sp.	BT	ST
37	HYE	7635	23.08.02		x	9	München	Notfall!	YE	4	O3
38	HYE	9363	28.08.02	x		61	Ismaning	Gastroenteritis	YE	4	O3
39	HYE	6041	18.09.02		x	17	Planegg	Enteropathiesyndrom	YE	4	O3
40	HYE	7449	09.02		x	51	Friedberg	Enteritis	YE	4	O3
41	HYE	8051	21.10.02		x	30	Wasserburg	Enteritis	YE	4	O3
42	HYE	12658	10.02		x	17	Scneeberg		YE	4	O3
43	HYE	2792	08.11.02		x	9	München	Enteritis	YE	4	O3
44	HYE	3738	11.11.02	x		11	?		YE	4	O3
45	HYE	3963	12.11.02		x	52	München		YE	4	O3
46	HYE	4177	12.11.02	x		37	Hohenbrunn		YE	4	O3
47	HYE	6328	18.11.02		x	32	München	Gastroenteritis	YE	4	O3
48	HYE	7839	20.11.02		x	14	München	Gastroenteritis	YE	4	O3
49	HYE	3757	10.12.02			2	München	Enteritis	YE	4	O3
50	HYE	5821	16.12.02		x	12	München		YE	4	O3

Nr. Probennummer
 M Männlich
 W Weiblich
 Sp Spezies
 BT Biotyp
 ST Serotyp
 HYE Humane *Y. enterocolitica*
 YE *Y. enterocolitica*
 YB/YM *Y. bercovier/Y. mollaretii*
 YF *Y. frederiksenii*

Tabelle 15: Übersicht der Ergebnisse der Charakterisierung von Humanstämmen und Nichthumanstämmen

Nr.	Stammbezeichnung		Datum	Probenart	Sp.	BT	ST	API 20E/ET	PFGE			GT
									Not	Apa	Xho	
1	SHY1.1	D (A)	29.11.99	Zunge	YE	4	O3	10155231	N1	A1	X1	I
2	SHY1.3	M (A)		Lunge	YE	4	O3	10155231	N1	A1	X1	I
3	SHY1.4	M (A)		Herz	YE	4	O3	10155231	N11	A1	X1	XVII
4	SHY2.4	M (B)		Herz	YE	4	O3	10155231	N13	A7	X8	XIX
5	SHY3.1	M (B)	06.12.99	Zunge	YE	4	O3	10155231	N11	A1	X1	XVII
6	SHY4.1	D (A)		Zunge	YE	4	O3	10155231	N4	A2	X1	VIII
7	SHY5.1	M (A)	13.12.99	Zunge	YE	4	O3	01155211	N4	A9	X1	IX
8	SHY5.3	M (A)		Lunge	YE	4	O3	00155211	N4	A9	X1	IX
9	SHY5.5	M (A)		Zwerchfell	YE	4	O3	01155211	N4	A9	X1	IX
10	SHY5.7	M (A)		Niere	YE	4	O3	11155230	N2	A1	X1	VI
11	SHY6.1	M (A)		Zunge	YE	4	O3	10155231	N4	A9	X1	IX
12	SHY6.4	M (A)		Herz	YE	4	O3	10155231	N15	A5	X8	XXI
13	SHY6.5	M (A)		Zwerchfell	YE	4	O3	10155231	N1	A2	X1	II
14	SHY7.1	M (A)	20.12.99	Zunge	YE	4	O3	10155231	N4	A9	X1	IX
15	SHY7.4	M (A)		Herz	YE	4	O3	10155231	N4	A9	X1	IX
16	SHY8.1	M (A)		Zunge	YE	4	O3	10155231	N8	A2	X1	XIV
17	SHY8.3	M (A)		Lunge	YE	4	O3	10155231	N1	A2	X1	II
18	SHY8.4	M (A)		Herz	YE	4	O3	10155231	N1	A2	X1	II
19	SHY8.5	M (A)		Zwerchfell	YE	4	O3	10155231	N1	A2	X1	II
20	SHY8.6	M (A)		Leber	YE	4	O3	10155231	N1	A2	X1	II
21	SHY9.1	M (A)	27.12.99	Zunge	YE	4	O3	10155231	N1	A3	X3	III
22	SHY9.3	M (A)		Lunge	YE	4	O3	10155230	N1	A3	X3	III
23	SHY9.6	M (B)		Leber	YE	1A		11545231	1A3			
24	SHY10.3	M (A)		Lunge	YE	4	O3	10155230	N14	A8	X8	XX
25	SHY10.6	I (A)		Leber	YE	4	O3	10155231	N17	A15	X1	XXIV
26	SHY11.3	M (A)		Lunge	YE	4	O3	00115200	N14	A8	X8	XX
27	SHY13.3	M (A)		Lunge	YE	4	O3	10155231	N1	A2	X1	II
28	SHY18.4	I (A)		Herz	YE	4	O3	10155221	N1	A4	X4	IV
1	T1	1D	21.02.00	Tonsille	YE	4	O3	10155231	N12	A1	X1	XVIII
2	S1	1D		Faeces	YE	4	O3	10155231	N12	A1	X1	XVIII
3	S3	1ON		Faeces	YE	4	O3	10155231	N12	A1	X1	XVIII
1	YEF4	1I1	08.05.00	Hackfleisch	YE	4	O3	10155231	N6	A11	X1	XII
2	YEF5	1I1		Hackfleisch	YE	4	O3	10155231	N6	A11	X1	XII
3	YEF12	1I1		Hackfleisch	YE	4	O3	10155230	N1	A1	X1	I
4	YEF25	1M		Hackfleisch	YE	4	O3	10155231	N6	A11	X1	XII
5	YEF44	1D	15.05.00	Hackfleisch	YF			13555331	YF2			
6	YEF53	1I1	22.05.00	Hackfleisch	YE	4	O3	10155231	N1	A1	X1	I
7	YEF97	1M		Hackfleisch	YE	4	O3	10155231	N1	A2	X1	II
8	YEF183	1I1	26.06.00	Hackfleisch	YE	4	O3	10155231	N1	A2	X1	II
9	YEF188	1M		Fett	YE	4	O3	11155220	N1	A1	X1	I
10	YEF289	1I1	30.07.00	Hackfleisch	YE	4	O3	12145221	N1	A1	X1	I
11	YEF297	1I1		Hackfleisch	YE	4	O3	10155220	N13	A7	X8	XIX
1	1M1	1D	26.06.01	Ferkel 1	YE	4	O3	10155231	N1	A10	X5	V
2	1M5	1D		1/2 Schwein	YE	4	O3	10155211	N5	A1	X1	XI
3	1M32	1KOH		Gehirn	YE	1A		11557230	1A1			
4	2M2	1KOH	27.06.01	Haken	YK			11545031	YK			
5	2M16	2MRB		Schwarte	YK				YK			
6	2M25	1D		Fillet	YK			13145031	YK			
7	3M12	1MRB	28.06.01	Bauchspeck	YE	4	O3	10155230	N4	A9	X1	IX

Nr.	Stammbezeichnung		Datum	Probenart	Sp.	BT	ST	API 20E/ET	PFGE			GT
									Not	Apa	Xho	
8	3M14	2ITC		Schinkenstück	YI			10151730	YI2			
9	3M25	1D		Kettenhandschuhe	YE	4	O3	10155231	N7	A13	X9	XIII
10	3M39	1D		Messer	YR			13155631	YR			
11	4M12	1MRB	29.06.01	Schlegel	YE	4	O3	00155231	N9	A14	X6	XV
12	4M14	1ITC		Leber	YE	4	O3	10155211	N16	A17	X10	XXIII
13	4M22	1ITC		Leber	YE	4	O3	10155210	N16	A17	X10	XXIII
14	5M18	1D	04.07.01	Füße mit Schlegel	YE	4	O3	10155231	N1	A1	X1	I
15	5M19	1D		Füße mit Schlegel	YE	4	O3	10155231	N1	A1	X1	I
16	5M25	1D		Ferkel	YI			13557731	YI1			
17		1MRB			YE	4	O3	10155230	N1	A1	X1	I
18	5M30	1D		Bauch/Brust	YF			13545331	YF1			
19	6M3	1D	11.07.01	1/2 Schwein	YE	4	O3	10155231	N3	A1	X1	VII
20	6M11	2D		Fleischstücke	YE	4	O3	10155231	N2	A1	X1	VI
21	7MV1	1D	08.08.01	Leber	YE	4	O3	10155230	N4	A2	X1	VIII
22	7MV2	1D		Niere	YE	4	O3	03175221	N4	A12	X7	X
23	7MV4	1D		Zunge	YE	4	O3	11155220	N1	A4	X4	IV
24	8M6	1D		Schüssel	YI			13557731	YI3			
1	Cindy	2.1D	17.07.02	Chincilla: Kot	YE	3	O3	11155211	YE3			
2	Filou	5.1D		Chincilla: Kot	YE	3	O3	11155211	YE3			
3	WS899L	1D	12.06.02	Wasserschwein: Kot	YP			10141000	YP			
1	HYE	Ref	11.01	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	11155220	N1	A4	X4	IV
2	HYE	5661	14.11.01	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	10155220	N1	A4	X4	IV
3	HYE	6388	16.11.01	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	10155220	N10	A6	X2	XVI
4	HYE	6940	16.11.01	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	11155231	N8	A2	X1	XIV
5	HYE	9297	22.11.01	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	00155221	N1	A1	X1	I
6	HYE	12031	27.11.01	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	10155231	N1	A1	X1	I
7	HYE	10724	29.11.01	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	10155220	N4	A9	X1	IX
8	HYE	12425	29.11.01	Humane Stuhlprobe	YB/M			10145220	YB/M1			
9	HYE	731	04.12.01	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	10155221	N1	A2	X1	II
10	HYE	914	04.12.01	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	10155231	N4	A9	X1	IX
11	HYE	6989	19.12.01	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	10145220	N1	A1	X1	I
12	HYE	2093	08.01.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	22042	N16	A16	X11	XXII
13	HYE	7264	19.01.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	10155231	N1	A1	X1	I
14	HYE	7301	21.01.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	22062	N8	A2	X1	XIV
15	HYE	7428	21.01.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	22062	N2	A1	X1	VI
16	HYE	11434	30.01.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	10155230	N1	A2	X1	II
17	HYE	12247	31.01.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	22042	N1	A2	X1	II
18	HYE	5283	14.02.02	Humane Stuhlprobe	YE	1A		11557230	1A2			
19	HYE	11215	27.02.02	Humane Stuhlprobe	YB/M			10145230	YB/M2			
20	HYE	2502	07.03.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	10155220	N1	A2	X1	II
21	HYE	8205	20.03.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	10145230	N13	A7	X8	XIX
22	HYE	11187	28.03.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	00155200	N10	A6	X2	XVI
23	HYE	3891	11.04.02	Humane Stuhlprobe	YE	2	O9	10547220	O9			
24	HYE	8588	23.04.02	Humane Stuhlprobe	YE	2	O9	11557231	O9			
25	HYE	8616	23.04.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	20002	N8	A2	X1	XIV
26	HYE	8798	23.04.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	20002	N1	A2	X1	II
27	HYE	9180	24.04.02	Humane Stuhlprobe	YE	1A		11557231	1A4			
28	HYE	9426	24.04.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	22020	N1	A1	X1	I
29	HYE	4230	14.05.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	20002	N4	A9	X1	IX
30	HYE	4273	14.05.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	20000	N4	A2	X1	VIII
31	HYE	4557	14.05.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	20000	N4	A2	X1	VIII
32	HYE	6298	21.05.02	Humane Stuhlprobe	YF			11457321	YF3			
33	HYE	8602	28.05.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	22060	N1	A1	X1	I
34	HYE	8611	28.05.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	22060	N1	A2	X1	II
35	HYE	3337	11.06.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	11155210	N8	A2	X1	XIV
36	HYE	6078	18.06.02	Humane Stuhlprobe	YE	4	O3	11155231	N1	A2	X1	II

Nr.	Probennummer
Sp	Spezies
BT	Biotyp
ST	Serotyp
Api20E/ET	Zahlenprofil der Testkits Api 20 ^E oder Enterotube
PFGE	Pulstyp
GT	Genotyp
YE	<i>Y. enterocolitica</i>
YF	<i>Y. frederiksenii</i>
YK	<i>Y. kristensenii</i>
YI	<i>Y. intermedia</i>
YR	<i>Y. rohdei</i>
YP	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
YB/YM	<i>Y. bercovier/Y. mollaretii</i>

I Literaturverzeichnis

AHVONEN, P. (1972)

Human yersiniosis in Finland I. Bacteriology and serology.
Ann. Clin. Res. **4**: 30-38

ALEKSIC, S., BOCKEMÜHL, J. (1990)

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

ALEKSIC, S., BOCKEMÜHL, J. (1996)

Untersuchungen von *Yersinia*-Stämmen aus Deutschland, (1993-1994).
Bundesgesbl. **3**: 94-97

ALEKSIC, S., BOCKEMÜHL, J. WUTHE, H.H., ALEKSIC, V. (1988)

Occurrence and clinical importance of the pathogenic serogroup O:5,27 of
Yersinia enterocolitica in the Federal Republic of Germany and methods for its
serological and bacteriological identification.
Zbl. Bakt. Hyg A **269**: 197-204

ANDERSEN, J.K. (1988)

Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with human pathogenic
Yersinia enterocolitica.
Int. J. Food Microbiol. **7**:193-202

ASPLUND, K., JOHANSSON, T., SIITONEN, A. (1998)

Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments
in the discrimination of *Yersinia enterocolitica* O:3.
Epidemiol. Infect. **121**: 579-586

ASPLUND, K., TUOVINEN, V., VEIJALAINEN, P., HIRN, J. (1990)

The prevalence of *Yersinia enterocolitica* O:3 in Finnish pigs and pork.
Acta Vet. Scand. **31**: 39-43

AULISIO, C.C.G., LANIER, J.M., CHAPPEL, M.A. (1982)

Yersinia enterocolitica O:13 associated with outbreaks in three southern states.

J. Food Prot. **45**: 1263

AUTENRIETH, I.B., FIRSCHING, R. (1996)

Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study.

J. Med. Microbiol. **44**: 285-294

BARETT, N.J. (1986)

Communicable disease associated with milk and dairy products in England and Wales 1983-1984.

J. Infect. **12**: 265-272

BAUMGART, J. (1999)

Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln.

Behr's Verlag, Hamburg

BAUMGARTEN, R., MIERSCH, H., FENGLER, J.D. (1977)

Krankheitsbilder von Yersiniainfektionen.

Dtsch. Gesundh.-Wes. **32**: 1218

BEE, A. (2000)

Typisierung von *Yersinia enterocolitica* mittels Pulsed Field Gel

Electrophoresis.

Dissertation Med. vet., Basel

BERCOVIER; H., BRAULT, J., BAARÉ, N., TREIGNIER, M., ALONSO, J.M.,

MOLLARET, H.H. (1978)

Biochemical, serological and phage typing characteristics of 159 *Yersinia* strains isolated from a terrestrial ecosystem.

Curr. Microbiol. **1**: 353-357

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

Genus XIV. *Yersinia*.

In: Krieg, N.R. (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology Vol 1.

Williams & Wilkins, Baltimore, S. 498-506

BEYER, S. (1979)

Yersinia enterocolitica- ein wenig bekannter Krankheitserreger

Med. Klin. **74**: 830-833

BHADURI, S., CONWAY, L.K., LACHIA, R.V. (1987)

Assay of crystal violet binding for rapid identification of virulent plasmid bearing clones of *Yersinia enterocolitica*.

J. Clin. Microbiol. **25**: 1039-1042

BISPING, W., AMTSBERG, G. (1988)

Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere.

Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg, S. 200-208

BLACK, R.E., JACKSON, R.J., TSAI, T., MEDVESKY, M., FEELEY, J.C., MACLEOD, K.I.E., und WAKELEE, A.M. (1978)

Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk.

N. Eng. J. Med. **298**: 76-79

BLEI, F., PUDER, D.R. (1993)

Yersinia enterocolitica in a chronically transfused patient with sickle cell anemia. Case report and review of the literature.

Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol. **15**: 430-434

BOCKEMÜHL, J., ROTH, J. (1978)

Brucella-Titer bei subklinischen Infektionen mit *Yersinia enterocolitica* Serotyp O:9 in einem Schweinezuchtbetrieb.

Zbl. Bakt. Hyg. 1. Abt. Orig. A, **240**: 86-93

BOCKEMÜHL, J., SCHMITT, H., ROTH, J., SAUPE, E. (1979)

Die jahreszeitliche Häufigkeit der Ausscheidung von *Yersinia enterocolitica* im Kot gesunder Schlachtschweine.

Zbl. Bakt. Hyg., Abt. Orig. A **244**: 494-505

BORCH, E., NESBAKKEN, T., CHRISTENSEN, H. (1996)

Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria.

Int. J. Food Microbiol. **30**: 9-25

BOTTONE, E.J. (1997)

Yersinia enterocolitica: the charisma continues

Clin. Microbiol. Rev. **10**: 257-267

BOTTONE, E.J. (1999)

Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates.

Microb. Infect. **1**: 323-333

BRANDIS, H., OTTE, H.J. (1984)

Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie. 5. Auflage 1984

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 313-317

BRENNER, D.J. (1981)

Classification of *Yersinia enterocolitica*.

In: Bottone, E.J. (ed.), *Yersinia enterocolitica*

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

BRÜGMANN, M., PETERS, M., MUMME, J. (2001)

Fallbericht: *Yersinia enterocolitica*-Septikämie bei einem American Minipig.

Dtsch. Tierärztl. Wschr., **108**: 233-280

BUCHER, M. (2001)

Ein Beitrag zur Epidemiologie von *Yersinia enterocolitica* in Schlachtnebenprodukten vom Schwein unter besonderer Berücksichtigung methodischer Aspekte.

Diss. Med. vet., München

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

Vorkommen von Yersinien-Arten in Kälbern und Jungrindern.

Fleischwirtsch. **82**: 125-127

BUCHRIESER, C., BROSCHE, R., BACH, S., GUIYOULE, A., CARNIEL, E. (1998)

The high pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal *asn t* RNA genes.

Mol. Microbiol. **30**: 965-978

BUCHRIESER, C., BUCHRIESER, O., KRISTL, A., KASPAR, C.W. (1994a)

Clamped homogenous electric fields (CHEF) gel-electrophoresis of DANN restriction fragments for comparing genomic variations among strains of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia* spp.

Zbl. Bakt. **281**: 457-470

BUCHRIESER, C., WEAGANT, S.D., KASPAR, C.W. (1994b)

Molecular characterization of *Yersinia enterocolitica* by pulsed-field gel electrophoresis and hybridization of DNA Fragments to *ail* and pYV Probes.

Appl. Env. Microbiol. **60**: 4371-4379

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

Kontamination des Fleisches durch menschenpathogene *Yersinia enterocolitica*-Stämme.

Fleischwirtsch. **71**: 1411-1416

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

Association between clinical presentation, biogroups and virulence attributes of *Yersinia enterocolitica* strains in human diarrhoea disease.
Epidemiol. Infect. **116**: 27-34

CARNIEL, E., GUIYOULE, A., GUILVOUT, I., MERCEREAU-PUIJALON, O. (1992)

Molecular cloning, iron-regulation and mutagenesis of the *irp2* gene encoding HMWP2, a protein specific for the highly pathogenic *Yersinia*.
Mol. Microbiol. **6**: 379-388

CHRISTENSEN, S.G. (1980)

Yersinia enterocolitica in Danish pigs
J. Appl. Bacteriol. **48**: 377-382

CHRISTENSEN, S.G. (1987)

The *Yersinia enterocolitica* situation in Denmark.
Contr. Microbiol. Immunol. **9**: 93-97

CORNELIS, G.R. (1998)

The *Yersinia* deadly kiss.
J. Bakteriolog. **180**: 5495-5504.

CORNELIS, G., LAROCHE, Y., BALLIGUND, G. (1987)

Yersinia enterocolitica as a primary model for bacterial invasiveness.
Rev. Inf. Dis. **9**: 64-87

COVER, T., ABER, R. (1989)

Yersinia enterocolitica
N. Engl. J. Med. **321**: 16-24

- DE ALMEIDA, A., GUIYOULE, A., GUILVOUT, I., ITEMAN, I., BARANTON, G.,
CARNIEL, E. (1993)
Chromosomal *irp2* gene in *Yersinia*: distribution, expression, deletion and
impact on virulence.
Microb. Pathog. **14**: 9-21
- DE BOER, E., SELDAM, W.M. (1987)
Comparison of methods for the isolation of *Yersinia enterocolitica* from
porcine tonsils and pork.
Int. J. Food Microbiol. **5**: 95-101
- DE BOER, E., SELDAM, W.M., OOSTEROM, J. (1986)
Characterisation of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from
foods and porcine tonsils in the Netherlands.
Int. J. Food Microbiol. **3**: 217-224
- DEDIÉ, K., BOCKEMÜHL, J., KÜHN, H., VOLKMER, K.J., WEINKE, T. (1993)
Yersiniosen mit enteritischen Verlauf beim Menschen
Lehrbuch über bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch, Epidemiologie,
Pathologie, Klinik, Diagnostik und Bekämpfung
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- DELMAS, C.L., VIDON, D.J.M. (1985)
Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from food in France.
Appl. Environ. Microbiol. **50**: 767-771
- DEQUEKER, J., JAMAR, R., WALRAVENS, M. (1980)
HLA-B27 arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection.
J. Rheumatol. **7**: 706-710
- DIESTERWEG, I. (1992)
Bakterielle Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen.
Seidel, G., Kiesewalter, J. (eds)
Akademie Verlag, Berlin, S. 173-190

- DUDLEY, M.V., SHOTTS, E.B. (1979)
Medium for isolation of *Yersinia enterocolitica*.
J. Clin. Microbiol. **10**: 180-183
- FANTASIA, M., MINGRONE, G.M., MARTINI, A., BOSCATO, C., CROTTI, D. (1993)
Characterisation of *Yersinia* species isolated from a kennel and from cattle and pig farms.
Vet. Rec. **132**: 532-534
- FARMER III, J.J., CARTER, G.P., MILLER, V.L., FALKOW; S., WACHSMUTH, I.K. (1992)
Pyrazinamidase, CRMOX agar, salicin fermentation-esculin hydrolysis, and D-Xylose fermentation for identifying pathogenic serotypes of *Yersinia enterocolitica*.
J. Clin. Microbiol. **30**: 2589-2594
- FENWICK, S.G., MADIE, P., WILKS, C.R. (1994)
Duration of carriage and transmission of *Yersinia enterocolitica* biotype 4, serotype O:3 in dogs.
Epidemiol. Infect. **113**: 471-477
- FILETICI, E., ANASTASIO, M.P., POURSHABAN, M., FANTASIA, M. (2000)
Genotypic and phenotypic characteristics of *Yersinia* spp. isolates from man.
Food Microbiol. **17**: 261-267
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., AUTIO, T., KORKEALA, H. (1999a)
Efficient subtyping of *Yersinia enterocolitica* bioserotyp 4/O:3 with pulsed field gel electrophoresis.
Lett. Appl. Microbiol. **29**: 308-312
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., BJÖRKROTH, J., HIELM, S., KORKEALA, H. (2000a)
Prevalence and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig tonsils from different slaughterhouses.
Food. Microbiol. **17**: 93-101

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

High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in pig offal in Southern Germany: a slaughtering technique problem.

System. Appl. Microbiol. **24**: 457-463

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., HALLANVUO, S., KORTE, T., SIITONEN, A., KORKEALA, H. (2001b)

Correspondence of genotypes of sporadic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4:O3 strains from human and porcine sources.

Epidemiol. Infect. **127**: 37-47

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

High prevalence of *yad* A-positive *Yersinia enterocolitica* in pig tongues and minced meat at retail level in Finland.

J. Food Prot. **62**: 123-127

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

Contamination of carcasses, offals and the environment with *yad*A positive *Yersinia enterocolitica* in a pig slaughterhouse.

J. Food. Prot. **63**: 31-35

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

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. (2001d)

Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food samples at retail level in Finland.

Arch. Lebensmittelhyg. **52**: 66-68

FUKUSHIMA, H. (1987)

New selective agar medium for isolation of virulent *Yersinia enterocolitica*.

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

- FUKUSHIMA, H., HOSHINA, K., ITOWA, H., GOMYODA, M. (1997)
Introduction into Japan of pathogenic *Yersinia* through imported pork, beef and fowl.
Int. J. Food Microbiol. **35**: 205-212
- FUKUSHIMA, H., NAKAMURA, R., IITSUKA, S., TSUBOKURA, M., OTSUKI, K., KAWAOKA, Y. (1984)
Prospective systematic study of *Yersinia* spp. in dogs.
J. Clin. Microbiol. **19**: 616-622
- GEMSKI, P., LAZERE, J.R., CASEY, T. (1980)
Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*.
Infect. Immunol. **27**: 682-685
- GOVERDE, R. (1999)
Yersinia enterocolitica-Genes involved in cold-adaptation
Diss. Med., Utrecht
- GRANFORS, K., TOIVANEN, A. (1986)
IgA anti-yersinia antibodies in yersinia-triggered reactive arthritis.
Ann. Rheum. Dis. **45**: 561-565
- GRANFORS, K., VILJANEN, M., TIILIKAINEN, A., TOIVANEN, A. (1980)
Persistence of IgM, IgG, and IgA antibodies to *Yersinia* in *Yersinia* Arthritis
J. Infect. Dis. **141**: 424-429
- GRANFORS, K., JALKANEN, S., VON ESSEN, R., LAHESMAA-RANTALA, R., ISOMÄKI, O., PEKKOLA-HEIKKOLA, K., MERILAHTI-PALO, R., SAARIO, R., ISOMÄKI, H., TOIVANEN, A. (1989)
Yersinia antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis.
N. Engl. J. Med. **320**: 216-221

GUTMAN, L.T., OTTESEN, E.A., QUAN, T.J., NOCE, P.S., KATZ, S.L. (1973)

An interfamilial outbreak of *Yersinia enterocolitica* enteritis.

N. Engl. J. Med. **288**: 1372-1376

HANK, C. (2003)

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

Diss. Med. vet., München

HANSKI, C., KUSCHKA, U., SCHMORANZA, H.P. (1989)

Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis.

Infect. Immun. **57**:673-678

HAYASHIDANI, H., KANEKO, K., SAKURAI, K., OGAWA, M. (1995)

Experimental infection with *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 in beagle dogs.

Vet. Microbiol. **47**: 71-77

HEESEMANN, J. (1987)

Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species.

FEMS Microbiol. Lett. **48**: 229-233

HEESEMANN, J., GRÜTER, L. (1987)

Genetic evidences that outer membrane protein YOP 1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagozytosis resistance to human epithelial cell.

FEMS Microbiol. Lett. **40**: 37-41

HEESEMANN, J., ALGERMISSEN, B., LAUFS, R. (1984)

Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*.

Infect. Immun. **46**: 105-110

HEESEMANN, J., EGGERS, C.H., SCHRÖDER, J., LAUFS, R. (1986a)

Serological diagnosis of Yersiniosis by the immunoblot technique using plasmid encoded antigens of *Yersinia enterocolitica*.

In: Simon, C., Wilkinson, P. (eds.) Diagnosis of infectious diseases-new aspects, 1st edition.

Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, S. 79-88

HEESEMANN, J., GROSS, U., SCHMIDT, N., LAUFS, R. (1986b)

Immunochemical analysis of plasmid encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* species grown in calcium-deficient media.

Infect. Immun. **54**: 561-567

HEESEMANN, J., KELLER, C., MOROWA, R., SCHMIDT, N., SIEMENS, H.J., LAUFS, R. (1983)

Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*. Molecular relatedness and possible importance for pathogenesis.

J. Infect. Dis. **147**: 107-115

HEIN, J., KNAUFF, H.G. (1978)

Die Yersiniosis in Deutschland.

Dtsch. Med. Wschr. **103**: 490-491

HEINEMANN, L., GREISER, E., EISENBLÄTTER, D. (1994a)

Fall-Kontroll-Studien

In: Heinemann, L., Sinnecker, H. (eds.) Epidemiologische Arbeitsmethoden

Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart, S. 54-62

HEINEMANN, L., SINNECKER, H. (1994b)

Epidemiologische Arbeitsmethoden-Datenquellen der Epidemiologie.

Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart, S. 47/48

HENTZE, M.W., KULOZIK, A.E., BARTRAM, C.R. (1990)

Einführung in die medizinische Molekularbiologie.

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New-York, S. 116

HEYMA, P., HARRISON, L.C., ROBINS-BROWNE, R. (1986)

Tyretropin (TSH) binding sites on *Yersinia enterocolitica* recognised by immunoglobulins from humans with Grave's disease.

Clin. Exp. Immunol. 64: **249-254**

HOF, H., DÖRRIES, R. (2002)

Medizinische Mikrobiologie.

Thieme Verlag, Stuttgart, 2.Auflage

HOOGKAMP- KORSTANJE, J.A.A., DE KONING, J. (1990)

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

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

HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A.A., STOLK-ENGELAAR, V.M.M. (1995)

Yersinia enterocolitica infection in children.

Pediatr. Infect. Dis. J. **14**: 771-775

HOOGKAMP- KORSTANJE, J.A.A., DE KONING, J., HEESEMANN, J. (1988)

Persistence of *Yersinia enterocolitica* in Man

Immun. Infekt. **16**: 81-85

HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A.A., DE KONING, J., SAMSOM, J.P. (1985)

Incidence of human infection by *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3, O:8 and O:9 and the use of indirect immunofluorescence in diagnosis.

J. Infect. Dis. **153**: 138-141

HOOGKAMP- KORSTANJE, J.A.A., DE KONING, J., SAMSOM, J.P. (1986)

Incidence of human infection with *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3, O:8 and O:9 and the use of indirect immunofluorescence in diagnosis.

J. Inf. Dis. **153**:138-141

HUGENBERG, J. (1999)

Zum Vorkommen und Nachweis von *Yersinia enterocolitica* bei
Schlachtschweinen in Niedersachsen.
Diss. Med. Vet., Hannover

ITEMAN, I., GUIYOULE, A., CARNIEL, E. (1996)

Comparison of three molecular methods for typing and subtyping pathogenic
Yersinia enterocolitica strains.
J. Med. Microbiol. **45**: 48-56

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

Biochemical and serological characterization of *Yersinia enterocolitica*.
In: Bergan, T., Norris, J.R. (eds.), Methods in microbiology
Academic Press, London, **15**: 295-344

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

Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia
enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible
importance for pathogenesis.
Infect. Immun. **55**: 2247-2254

KAYSER, F.H., BIENZ, K.A., ECKERT, J., LINDENMANN, J. (1993)

Medizinische Mikrobiologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S.209-213

KIEHL, W. (1994)

Methoden zur Erfassung der infektionsbedingten Morbidität und Mortalität
In: Heinemann, L., Sinnecker, H. (eds.) Epidemiologische Arbeitsmethoden
Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart, S. 207-221

KIESEWALTER, J. (1992)

Klinische und epidemiologische Bedeutung von *Yersinia enterocolitica* für
Mensch und Tier
Bundesges.bl. **10**: 495-499

KIST, M., LANGMAACK, H., JUST, M. (1980)

Ausbreitung einer *Yersinia enterocolitica*-Infektion im Krankenhaus.

Dtsch. Med. Wschr. **105**: 185.186

KIST, M., PELZ, K. (1979)

Yersinia enterocolitica- Isolierungen: klinische, mikrobiologische und epidemiologische Befunde.

Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt. Orig., A, **243**: 425

KOCH, C. U. (2003)

Ein Beitrag zur Epidemiologie und Verbreitung von pathogenen *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in Münchner Metzgereien.

Diss. Med. vet., München

LAIRD, W.J., CAVANAUGH, D.C. (1980)

Correlation of autoagglutination and virulence of *Yersiniae*.

J. Clin. Microbiol. **11**: 430-432

LARSEN, J.H., HARTZEN, S.H., PARM, M. (1985)

The determination of specific IgA-antibodies to *Yersinia enterocolitica* and their role in enteric infections and their complications.

Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B **93**: 331-339

LEE, L.A., TAYLOR, J., CARTER, G.P., QUINN, B., FARMER, J.J., TAUXE, R.V. (1991)

Yersinia enterocolitica O:3: an emerging cause of pediatric gastroenteritis in the United States. The *Yersinia enterocolitica* Collaborative Study Group.

J. Infect. Dis. **163**: 660-663

MÄKI-IKOLA, O., HEESEMANN, J., TOIVANEN, A., GRANFORS, K. (1997)

High frequency of *Yersinia* antibodies in healthy populations in Finland and Germany.

Rheumatol. **16**:227-229

MASLOW, J.N., MULLIGAN, M.E., ARBEIT, R.D. (1993a)

Molecular Epidemiology: Application of Contemporary Techniques to the Typing of Microorganisms.
Clinic. Inf. Dis. **17**: 153-164

MASLOW, J.N., MULLIGAN, M.E., ARBEIT, R.D. (1993b)

Applications of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology.
In: Pering, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., White, T.J. (eds.)
Diagnostic molecular microbiology-principles and applications.
American Society for Microbiology, Washington D.C., pp 563-572

MEHLMAN, I.J., AULISO, C.C.G., SANDERS, A.C. (1978)

Problems in the recovery and identification of *Yersinia* from food.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. **61**: 761-771

METZ, M., LINDE, H.-J., LEHN, N., EHRET, W. (1996)

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese zur epidemiologischen Analyse pathogener Keime.
Biospektrum **5**: 53-54

MILENIA-BIOTECH (1999)

Yersinia enterocolitica IgG+IgA Immunoblot.
Veröffentlichung aus dem Internet unter www.milenia-biotech.de/pdf/infektion

MILLER, V.L., FALKOW, S. (1988)

Evidence of two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells.
Infect. Immun. **56**: 1242-1248

MÜHLHARDT, C. (2002)

Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics.
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin

MURIANA, P.M. (2002)

Yersinia-Virulence and pathogenesis

Veröffentlichung aus dem Internet unter www.okstate.edu/ag/fapc/fsw/yersinia

NAJDENSKI, H., ITEMAN, I., CARNIEL, E. (1994)

Efficient subtyping of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by pulsed-field gel electrophoresis.

J. Clin. Microb. **32**: 2913-2920

NAJDENSKI, H., ITEMAN, I., CARNIEL, E. (1995)

The Genome of *Yersinia enterocolitica* is the most stable of the three pathogenic Species.

Contr. Immunol. **13**: 281-284

NAJDENSKI, H., NIKOLOVA, S., VESSELINOVA, A., NEIKOV, P. (1998)

Studies of *Yersinia enterocolitica* O:3 experimental infection in pigs.

Zentralbl. Veterinärmed. Series B **45**: 59-64

NATTERMANN, H., HORSCH, F., DEE, W., ORTMANN, G. (1986)

Die *Yersinia enterocolitica* Infektion bei landwirtschaftlichen Nutztieren.

Mh. Vet. Med. **41**: 23-26

NATTERMANN, H., HORSCH, F., SEEGER, M., DEE, W., SCHLINGMANN, G.,
SCHLINGMANN, H. (1985)

Epizootiologie der *Yersinia enterocolitica* Infektion in einem Schweinebestand.

Mh. Vet. Med. **40**: 366-370

NESBAKKEN, T. (1992)

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

Diss. Med. Vet., Oslo, Norwegen.

- NESBAKKEN, T., GONDROSEN, B., KAPPERUD, G. (1985)
Investigation of *Yersinia enterocolitica*-like bacteria, and thermotolerant campylobacters in Norwegian pork products.
Int. J. Food Microbiol. **1**: 311-320
- NEUBAUER, H., ALEKSIC, S., HENSEL, A., FINKE, E.-J., MEYER, H. (2000)
Yersinia enterocolitica 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups.
Int. J. Med. Microbiol. **290**: 61-64
- NEUBAUER, H., SPRAGUE, L.D., SCHOLZ, H., HENSEL, A. (2001a)
Die Diagnostik von *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 beim Menschen
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **114**: 81-87
- NICOLET, J. (1985)
Kompendium der veterinärmedizinischen Bakteriologie.
Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg.
- NIELSEN, B., BAGER, F., MOUSING, J., DAHL, J., HALGAARD, C., CHRISTENSEN, H. (1995)
Danish perspective on the implementation of HACCP in the swine industry.
75th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease, Chicago.

NIELSEN, B., HEISEL, C., WINGSTRAND, A. (1996)

Time course of the serological response to *Yersinia enterocolitica* O:3 in experimentally infected pigs.

Vet. Microbiol. **48**: 293-303

OLIVE D.M., BEAN, P. (1999)

Principles and applications of methods for DNS-based typing of microbial organisms.

J. Clin. Microbiol. **37**: 1661-1669

OSTROFF, S.M. (1995)

Yersinia as an emerging infection: Epidemiologic aspects of Yersiniosis.

Contr. Microbiol. Immunol. **13**: 5-10

OSTROFF, S.M., KAPPERUD, G., HUTWAGNER, L.C., NESBAKKEN, T., BEAN, N.H., LASSEN, J., TAUXE, R.V. (1993)

Sources of sporadic *Yersinia enterocolitica* infections in Norway: a prospective case-control study

Epidemiol. Infect. **112**: 133-141

PAI, C.H., GILLIS, F., TUOMANAN, E. (1984)

Placebo-controlled double-blind evaluation of trimethoprim-sulfamethoxazole treatment of *Yersinia enterocolitica* gastroenteritis.

J. Pediatr. **104**: 308-311

PAI, C.H., SORGER, S., LAFLEUR, L., LACKMAN, L., MARKS, M.I. (1979)

Efficacy of cold enrichment techniques for recovery of *Yersinia enterocolitica* from human stools.

J. Clin. Microbiol. **9**: 712-715

PEPE, J.C., MILLER, V.L. (1993)

Yersinia enterocolitica invasion: a primary role in the initiation of infection.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA **90**: 6473-7477

- PHAM, J.N., BELL, S.M., LANZARONE, J.Y.M. (1991)
Biotype and antibiotic sensitivity of 100 clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*.
J. Antimicrob. Chemother. **28**: 13-18
- PORTNOY, D.A., MARTINEZ, R.J. (1985)
Role of a plasmid in the pathogenicity of *Yersinia* species.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **118**: 29-51
- PSCHYREMBEL (1994)
Pschyrembel-Klinisches Wörterbuch
257.Auflage, Nikol Verlagsgesellschaft mbH, Hamburg
- RILEY, G., TOMA, S. (1986)
Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using Congo Red-magnesium Oxalate agar medium.
J. Clin. Microbiol. **27**: 213-214
- RUCKDESCHEL, K., ROGGENKAMP, A., SCHUBERT, S., HEESEMANN, J. (1996)
Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils.
Infect. Immun. **64**: 724-733
- SAMADI, A.R., WACHSMUTH, K., HUQ, M.I., MAHBUB, M., AGBONLAHOR, D.E. (1982)
An attempt to detect *Yersinia enterocolitica* infection in Dacca, Bangladesh.
Trop. Geograph. Med. **34**: 151-154
- SATTERTHWAITE, P., PRITCHARD, K., FLOYD, D, LAW, B. (1999)
A case-control study of *Yersinia enterocolitica* infections in Auckland.
Aust. N.Z. Public Health **23**: 482-485

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: Foodborne Bacterial Pathogens, Doyle M.P. (ed.)

Marcel Dekker, New York

SCHINDLER, P.R.G. (1984)

Nachweis von *Yersinia enterocolitica* aus Trinkwasserversorgungsanlagen in Südbayern.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B. **180**: 76-84

SCHMITZ, F.-J., GEISEL, R., RING, A., WAGNER, S., HEINZ, H.P. (1995)

Molekulare Epidemiologie bei nosokomialen Infektionen-Vergleich verschiedener Typisierungsverfahren.

Clin. Lab. **41**: 991-1001

SCHWARTZ, D. C., CANTOR, C. R. (1984)

Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis.

Cell **37**: 67-75

SEURI, M., GRANFORS, K. (1992)

Possible confounders of the relationship between occupational swine contact and *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:9 antibodies.

Eur. J. Epidemiol. **8**: 532-538

- SHIOZAWA, K., NISHINA, T., MIWA, Y., MORI, T., AKAHANE, S., ITO, K. (1991)
Colonization of the tonsils of swine by *Yersinia enterocolitica*.
Contr. Microbiol. Immunol. **12**: 63-67
- SOLTESZ, L., SCHALEN, C., MARDH, P.A. (1980)
An effective, selective medium for *Yersinia enterocolitica* containing sodium oxalate.
Acta. Path. Microbiol. Scand. Sect. B **88**: 11-16
- SPERNER, B., SCHALCH, B., EISGRUBER, H., STOLLE, A. (1998)
Short protocol for pulsed-field gel electrophoresis of a variety of *Clostridia* species.
Vortrag, 1st International conference on identification and immunobiology of *Clostridia*, diagnosis and prevention of Clostridiosis.
04.-07. Oktober 1998, Teistungen
- STOLL, L. (1988)
Bakteriologische und serologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* bei Mensch und Schwein in Südhessen.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **88**: 184-187
- STROBEL, E., HEESEMANN, J., MAYER, G., PETERS, J., MÜLLER-WEIHRICH, S., EMMERLING, P. (2000)
Bacterial and serological findings in a further case of transfusion-mediated *Yersinia enterocolitica* sepsis.
J. Clin. Microbiol. **38**: 2788-2790
- SWAMINATHAN, B., BARRETT, T., J., HUNTER, S.B., TAUXE, R.V. (2001)
PulseNet: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States
Emerg. Infect. Dis. **7**: 382-384

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

A review-*Yersinia enterocolitica*.

J. Appl. Bact. **52**: 151-183

TACKET, C.O., DAVIS, B.R., CARTER, G.P. (1983)

Yersinia enterocolitica pharyngitis.

Ann. Intern. Med. **99**: 40-42

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

Yersinia enterocolitica infections and pork: the missing link.

Lancet **1**: 1129-1132

TENOVER, F.C., ARBEIT, R.D., GOERING, R.V., MICKELSEN, P.A., MURRAY, B.E., PERSING, D.H., SWAMINATHAN, B. (1995)

Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.

Journal of Clinical Microbiol. **33**: 2233-2239

THIBODEAU, V., FROST, E.H., CHÉNIER, S., QUESSAY, S. (1999)

Presence of *Yersinia enterocolitica* in tissues of orally inoculated pigs and the tonsils and faeces of pigs at slaughter.

Can. J. Vet. Res. **63**: 96-100

TICHY, H.V., SIMON, R. (1994)

Effiziente Analyse von Mikroorganismen mit PCR-Fingerprint-Verfahren.

Bioforum, **17**: 499-505

TREBESIUS, K., HARMSSEN, D., RAKIN, A., SCMELZ, J., HEESEMANN, J. (1998)

Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species.

J. Clin. Microbiol. **36**: 2557-2564.

TZIPORI, S., ROBINS-BROWNE, R., KAYA PRPIC, J. (1987)

Studies on the role of virulence determinants of *Yersinia enterocolitica* in gnotobiotic piglets.

Contr. Microbiol. Immunol. **9**: 233-238

VAN DE PITTE, J., WAUTERS, G., ISEBAERT, A. (1973)

Epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections in Belgium.

Contr. Microbiol. Immunol. **2**: 111-119

VAN NOYEN, R., SELDERSLAGHS, R., WAUTERS, G., VANDEPITTE, J. (1987)

Comparative epidemiology of *Yersinia enterocolitica* and related species in patients and healthy controls.

Contr. Microbiol. Immunol. **9**: 61-67

VAN NOYEN, R., VANDEPITTE, J., WAUTERS, G. (1980)

Nonvalue of cold enrichment of stools for isolation of *Yersinia enterocolitica* serotypes 3 and 9 from patients.

J. Clin. Microbiol. **11**: 127-131

VARNHAM, A.H., EVANS, M.G. (1991)

Foodborne pathogenes- an illustrated text.

Wolfe publishing Ltd, London, S.131-157

VERHAEGEN, J., CHALIER, J., LEMMENS, P., DELMEE; M., VAN NOYEN, R.,

VERBIST, L., WAUTERS, G. (1998)

Surveillance of human *Yersinia enterocolitica* infections in Belgium: 1967-1998.

CID **27**: 59-64

WALKER, S.J., GILMOUR, A. (1986)

A comparison of media for the recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria from milk containing simulated raw milk microflora.

J. Appl. Bacteriol. **60**: 175-183

WAUTERS, G. (1973)

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

Contr. Microbiol. Immunol. **2**: 68-70

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

New enrichment methods for pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 from pork.

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

WAUTERS, G., JANSSENS, M., STEIGERWALT, A.G., BRENNER, D.J. (1988b)

Yersinia mollaretii sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov. formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A and 3B.

Int. J. Syst. Bact. **38**: 424-429

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

Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*

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

WEBER, A., LEMBKE, C. (1981a)

Untersuchungen zum Vorkommen von humanpathogenen *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* bei Schlachttieren.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **94**: 5-8

WEBER, A., LEMBKE, C. (1981b)

Untersuchungen zum Vorkommen von humanpathogenen *Yersinia enterocolitica* bei Katzen.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **94**: 325-327

WEIDENMÜLLER, H. (1968)

Vergleichende Untersuchungen über die Pseudotuberkulose bei Haus und Wildtieren.

Tierärztl. Umsch. **23**: 476-478

- WENZEL, B.E., HEESEMAN, J., WENZEL, K.W., SCRIBA, D.C. (1988)
Antibodies to plasmid-encoded proteins of enteropathogenic *Yersinia* in patients with autoimmune thyroid disease.
Lancet I: 56
- WEYNANTS, V., TIBOR, A., DENOEL, P.A., SAEGERMANN, C., GODFROID, J., THIANGE, P., LETESSON, J.J. (1996)
Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O:9 a cause of false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests.
Vet. Microbiol. **48**: 101-112
- WINBLAD, S. (1981)
Erythema nodosum associated with infection with *Yersinia enterocolitica*.
In: Bottone, E.J. (ed.) *Yersinia enterocolitica*
CRC Press, Boca Raton
- WINTER, P., DRIESEL, A.J. (1988)
Auftrennung von DNS-Molekülen in Chromosomengröße durch Gelelektrophorese in alternierenden elektrischen Feldern.
Biotech Forum **5**: 108-114
- WORMSER, G.P., KEUSCH, G.T. (1981)
Yersinia enterocolitica: Clinical observations.
In: Bottone, E.J. (ed.), *Yersinia enterocolitica*
CRC Press, Boca Raton
- WUORELA, M., JALKANEN, S., KIRVESKARI, J., LAITIO, P., GRANFORS, K. (1997)
Yersinia enterocolitica serotype O:3 alters the expression of serologic HLA-B 27 epitopes on human monocytes.
Infect. Immun. **65**: 2060-2066
- WUTHE, H.H., ALEKSIC, S. (1992)
Yersinia enterocolitica Serovar 1, 2a, 3, Biovar 3 in Chinchillas.
Zbl. Bakt. **277**: 403-405

- WUTHE, H.H., SCHULZ-LELL, G., BÖHLCK, I., ALEKSIC, S. (1982)
Ergebnisse von kulturellen Untersuchungen auf *Yersinia enterocolitica* in
Proben von Menschen und Schweinen in Schleswig-Holstein.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **95**: 288-292
- ZEN-YOJI, H., MARUYAMA, T., SAKAI, S., KIMURA, S., MITUNO, T., MOMOSE, T.
(1973)
An outbreak of enteritis due to *Yersinia enterocolitica* occurring at a junior
high school.
Japan J. Microbiol. **17**: 220-222
- ZHANG, Y., TOIVANEN, A., TOIVANEN, P. (1997)
Experimental *Yersinia* triggered reactive arthritis: effect of a three week course
of ciprofloxacin
Brit. J. Rheumatol. **36**: 541-546
- ZHENG, X.B., XIE, C. (1996)
Note: Isolation, characterization and epidemiology of *Yersinia enterocolitica*
from humans and animals.
J. Appl. Bacteriol. **81**: 681-684
- ISO (1994)
Microbiology-general guidance for the detection of presumptive pathogenic
Yersinia enterocolitica-ISO 10273
International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland
- NCFA (1996)
Yersinia enterocolitica Detection in foods.
Method no 117, 3rd ed.
Nordic Committee on food analysis, Espoo, Finland

REFERAT FÜR GESUNDHEIT UND UMWELT (2002)

Bestätigte Erkrankungsfälle an Enteritis infectiosa im Stadtgebiet München für das Jahr 2002.

Referat für Gesundheit und Umwelt München, persönliche Mitteilung.

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2002a)

Fallbericht: Enteritis durch *Yersinia enterocolitica* Serogruppe O:8, Biovar 1B.
Epidemiologisches Bulletin **27**: 221-222

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2002b)

Epidemiologie spezifischer Krankheiten-Yersiniose
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2001: 124-126

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2002c)

Das Robert-Koch-Institut: Aufgaben und Ziele des RKI
Veröffentlichung aus dem Internet unter www.rki.de/UEBER/RKI-HOME.HTM

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2003)

Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten.
Epidemiologisches Bulletin **2**: 14-15

ROBERT-KOCH-INSTITUT, STATISTISCHES BUNDESAMT (2002)

Lebensmittelbedingte Erkrankungen in Deutschland
Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 01/02

VETINSTITUT, (2001)

Yersinia enterocolitica-annual report on zoonoses in Denmark 2001.
Veröffentlichung aus dem Internet unter www.vetinst.dk

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inzidenz der Yersiniose in Deutschland	21
Tabelle 2: Lebensmittel-assoziierte Krankheitsausbrüche durch <i>Yersinia enterocolitica</i> (nach COVER und ABER 1989, BOTTONE 1999)	26
Tabelle 3: Verteilung und Pathogenität verschiedener Bioserovare von <i>Yersinia enterocolitica</i> (modifiziert nach VARNHAM und EVANS 1991)	31
Tabelle 4: Selektivnährmedien für <i>Yersinia enterocolitica</i>	33
Tabelle 5: Modifiziertes Biotypisierungsschema für <i>Yersinia enterocolitica</i> (nach WAUTERS et al. 1987)	35
Tabelle 6: Zusammenstellung verwendeten <i>Yersinia</i> Stämme	51
Tabelle 7: Anzahl und Verteilung der <i>Yersinia</i> Spezies im im Jahr 2002	60
Tabelle 8: <i>Yersinia enterocolitica</i> -Stämme- Ergebnisse der Bio-und Serotypisierung im Jahr 2002	61
Tabelle 9: Alters- und Geschlechtsverteilung an Yersiniose erkrankter Personen	61
Tabelle 10: Isolierungsrate lebensmittelassoziierter Krankheitserreger 2002	62
Tabelle 11: Darstellung der verschiedenen Genotypen des Bioserovars 4/O:3 nach Restriktion mit den Enzymen <i>NotI</i> , <i>ApaI</i> und <i>XhoI</i>	68
Tabelle 12: Verteilung der verschiedenen Genotypen des Bioserovars 4/O:3 unter humanen und nichthumanen Stämmen	71
Tabelle 13: Verteilung der verschiedenen Genotypen auf die nichthumanen Stämme	73
Tabelle 14: Übersicht der <i>Yersinia</i> Spezies Stämme aus humanen Stuhlproben im Untersuchungszeitraum 2002	108
Tabelle 15: Übersicht der Ergebnisse der Charakterisierung von Humanstämmen und Nichthumanstämmen	110

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Eintrittspforte von <i>Y. enterocolitica</i> und weitere Ausbreitung im menschlichen Organismus (nach GOVERDE 1999)	14
Abbildung 2: <i>Yersinia</i> Infektionen 1992-2000 aus einigen Bundesländern (RKI und STATISTISCHES BUNDESAMT 2002)	19
Abbildung 3A: Titer-Verlaufskurve von <i>Yersinia</i> -spezifischen Antikörpern im Falle einer akuten und komplikationslosen Yersiniose (nach MILENIA-BIOTECH 1999).	38
Abbildung 3B: Titer-Verlaufskurve von <i>Yersinia</i> -spezifischen Antikörpern im Falle von immunpathologischen Komplikationen und chronischer Yersiniose (nach MILENIA-BIOTECH 1999).	38
Abbildung 4: Jahreszeitlicher Verlauf Lebensmittel assoziierter Infektionen beim Menschen	63
Abbildung 5: Unterscheidbare Restriktionsprofile des Bioserovars 4/O:3 nach Verdau mit <i>NotI</i>	65
Abbildung 6: Unterscheidbare Restriktionsprofile des Bioserovars 4/O:3 nach Verdau mit <i>ApaI</i>	66
Abbildung 7: Unterscheidbare Restriktionsprofile des Bioserovars 4/O:3 nach Verdau mit <i>XhoI</i>	67
Abbildung 8: Verschiedene Restriktionsprofile nach Verdau mit <i>NotI</i>	69
Abbildung 9: Darstellung verschiedener <i>Yersinia</i> Spezies, sowie der Bioserovare 2/O:9, 3/O:3 und Biovar 1A von <i>Yersinia enterocolitica</i> , Restriktion mit <i>NotI</i>	70

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Stolle für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für die rasche Korrektur des Manuskriptes.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. M. Fredriksson-Ahomaa, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herzlichen Dank auch der Laborgemeinschaft Dr. Tiller und Partner, im besonderen Herrn Dr. R. Raßhofer für die Überlassung der humanen Bakterienstämme. Auch Frau Nonhoff möchte ich dafür danken, dass sie stets an mich gedacht hat.

Desweiteren danke ich Frau Priv.-Doz. Dr. B. Schalch für ihre stets freundlichen Ratschläge, sowie für die fachliche Durchsicht meiner Arbeit.

Frau Dr. C. Klemm, sowie Frau B. Salzer möchte ich für die Einarbeitung in die Methode, das freundliche Arbeitsklima, sowie die gewährte Unterstützung danken.

Allen weiteren Mitarbeitern des Institutes danke ich für die stets aufmunternden Worte und der tatkräftige Hilfe bei allen auftretenden Problemen.

Ganz lieben Dank auch Frau D. Koschny für die äußerst genaue Korrektur des Manuskriptes.

Von ganzen Herzen möchte ich auch meinem Freund, Herrn G. Bengs danken, für sein entgegengebrachtes Verständnis.

Auch meiner Familie möchte ich danken, insbesondere meinem Papa Herrn H. Zechner, der stets ein offenes Ohr für mich hat.

Lebenslauf

Name: Katja Zechner

Geburtsdatum und
Geburtsort: 30.11.1973, München

Eltern: Heinz Herbert Zechner und Karin Zechner,
geb. Hartmann

Ausbildung:

1980- 1984	Grundschule, Ichostr.2, München, bzw. Grundschule Weiz, Österreich
1984- 1993	Theodolinden-Gymnasium, München
9/1993-8/1995	Ausbildung zur veterinärmedizinisch- technischen Assistentin Am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern in Oberschleißheim Abschluß: staatliche Prüfung
11/1995-2/2001	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München Abschluß: tierärztliche Prüfung
4/2001	Approbation

Berufliche Tätigkeit:

5/2001- 5/2002	Beschäftigung als Tierärztin, Mikrobiologische Lebensmitteldiagnostik in der LVS GmbH in München
Seit 5/2002	Beschäftigung als Tierärztin, Mikrobiologische und veterinärmedizinische Diagnostik in der Laborgemeinschaft Dr. Tiller und Partner in München