

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

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

# **Entwicklung eines Selektivnährbodens für den Nachweis von *Yersinia enterocolitica***

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

von  
Carmen Lampert  
aus Memmingen

München 2006

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

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

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Hoffmann

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

***Meinen Eltern***

## ABKÜRZUNGVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
§	Paragraph
%	Prozent
A.	<i>Aeromonas</i>
ail	attachment-invasive-locus
a <sub>w</sub>	Wasseraktivität
BHI	Brain Heart Infusion
BSG	Bundesseuchengesetz
BOS	Bile oxalate sorbose
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CAL	Cellobiose-Arginin-Lysin
CASO	Casein-Sojamehl-Pepton
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
CRAMP	Congo-red-acid-morpholinepropanesulfonic-acid-pigmentation
cm	Zentimeter
CR-BHO	Congo-Red-BHI Agarose
CRMOX	Kongorot-Magnesium-Oxalat
d	Tag
DC	Desoxycholate Citrate
DIM	Dosis infectiosa minima
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EDTA	Ethylendiaminteraessigsäure
EIA	Enzyme Immunoassay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

et al.	et alli
evtl.	eventuell
g	Gramm
h	Stunde
H-Antigene	Geißelantigene
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff
IfSG	Infektionsschutzgesetz
inv	Invasin
ISO	Internationale Organisation zur Standardisierung
ITC	Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat
kb	Kilobasen
KbE	Kolonien bildende Einheiten
kDa	kilo-Dalton
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB-BSI	Luria-Bertai Bile Salts Irgasan
LSU	Laktose-Saccharose-Urea
<i>M.</i>	<i>Morganella</i>
min.	Minuten
ml	Mililiter
mm	Milimeter
MRB	modifizierte Rappaport Bouillon
NaCl	Natriumchlorid
NCFA	Nordic Committee on Food Analysis
NIT	Nitrat
NO <sub>3</sub>	Nitrat
O-Antigene	Oberflächenantigene
OPNG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -galactopyranosid
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PB	gepuffertes Peptonwasser
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelektrophorese
pYV	plasmid for <i>Yersinia</i> virulence
RAM	Rhamnose D-Arabitol MacConkey
REAP	Restriction enzyme analysis of the virulence plasmid
RKI	Robert Koch Institut
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. liquefaciens</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
sog.	sogenannt
spp.	Spezies
SS	Salmonella-Shigella
SSDC	Salmonella-Shigella-Natriumdesoxycholate Calciumchlorid
TSPN	Tryptose Soja Bouillon
VP	Voges-Proskauer
VYE	Virulent <i>Yersinia enterocolitica</i>
Y.	<i>Yersinia</i>
Yad A	<i>Yersinia</i> adhesin A
YER	Hefeextrakt-Bengalrosa
Yop	<i>Yersinia</i> outer membrane
Ysc	<i>Yersinia</i> secretion
Yst	<i>Yersinia</i> stable toxin
z.B.	zum Beispiel

<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>LITERATUR.....</b>	<b>3</b>
1    YERSINIE.....	3
1.1 <i>Taxonomie und Eigenschaften .....</i>	3
1.2 <i>Pathogenität.....</i>	11
1.2.1    Plasmidkodierte Pathogenitätsfaktoren.....	12
1.2.2    Chromosomal Pathogenitätsfaktoren.....	13
1.3 <i>Epidemiologie .....</i>	15
1.3.1    Inzidenz beim Menschen .....	16
1.3.2    Prävalenz in Tieren und Lebensmitteln.....	17
1.3.3    Verbreitung im Fleischgewinnungsprozeß.....	18
1.3.4    Übertragung .....	20
1.4 <i>Erkrankungen beim Menschen.....</i>	22
1.5 <i>Erkrankungen bei Tieren .....</i>	26
1.5.1    Schwein .....	26
1.5.2    Rinder und kleine Wiederkäuer.....	26
1.5.3    Hunde und Katzen .....	26
1.5.4    Andere Haustiere .....	27
1.6 <i>Antibiotikaresistenz von Yersinia-Stämmen .....</i>	27
2    NACHWEIS VON YERSINIE.....	30
2.1 <i>Anreicherungsverfahren .....</i>	33
2.1.1    Nichtselektive und wenigselektive Anreicherungen .....	33
2.1.2    Selektive Anreicherung.....	35
2.1.3    Zweistufige Anreicherungsverfahren .....	37
2.2 <i>Alkalibehandlung .....</i>	38
2.3 <i>Selektivnährböden .....</i>	38
2.4 <i>Kombination aus Anreicherung und Selektivnährboden .....</i>	46
2.5 <i>Identifizierung mit Testsystemen .....</i>	47
2.6 <i>Biochemische und serologische Charakterisierung .....</i>	48

2.7	<i>Pathogenitätsnachweis</i> .....	48
2.8	<i>Alternative Nachweisverfahren</i> .....	50
3	ANSPRÜCHE AN FESTE <i>Y. ENTEROCOLITICA</i> -SELEKTIVNÄHRBÖDEN .....	53
3.1	<i>Temperatur</i> .....	53
3.2	<i>pH</i> .....	53
3.3	<i>Sauerstoffabhängiges Wachstum</i> .....	54
3.4	<i>Indikatoren</i> .....	55
3.5	<i>Nährstoffe</i> .....	55
3.6	<i>Selektivfaktoren</i> .....	55
3.6.1	Chemische Selektivfaktoren .....	55
3.6.2	Antibiotische Selektivfaktoren.....	57
3.7	<i>Wirkung bei Kombination verschiedener Agentien</i> .....	59
	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN .....</b>	<b>60</b>
4	ZIEL DIESER ARBEIT .....	60
5	MATERIAL.....	61
5.1	<i>Keime</i> .....	61
5.2	<i>Probenmaterial</i> .....	63
5.3	<i>Arbeitsmaterialien</i> .....	63
6	METHODEN.....	64
6.1	<i>Herstellung eines selektiven Nährbodens</i> .....	64
6.1.1	Entwicklung eines Urea-Basisagars: .....	65
6.1.2	Entwicklung eines selektiven Urea-Agars.....	66
6.2	<i>Testen der entwickelten Agars an Keimen</i> .....	69
6.3	<i>Testen der entwickelten Agars mit unbeimpften Naturproben</i> .....	70
6.4	<i>Testen des entwickelten Urea-Selektivagars</i> .....	73
6.4.1	Testen des entwickelten Urea-Selektivagars an Keimen .....	73
6.4.2	Beimpfung von Hackfleischproben mit <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 .....	73
6.4.3	Test des entwickelten Urea-Selektivagars an unbeimpften Hackfleischproben.....	77
6.5	<i>Identifikation der Keime</i> .....	77

6.5.1	CIN-Agar.....	77
6.5.2	API 20E.....	78
6.6	<i>Lagerung der identifizierten Keime</i> .....	79
<b>ERGEBNISSE .....</b>		<b>81</b>
7	HERSTELLUNG EINES SELEKTIVNÄHRBODENS FÜR <i>Y. ENTEROCOLITICA</i> .....	81
7.1	<i>Ergebnisse bei der Entwicklung eines Urea-Selektivagars</i> .....	81
7.2	<i>Ergebnisse bei der Entwicklung eines selektiven Urea-Agars</i> .....	83
7.2.1	Ergebnisse bei der Zugabe von Selektivfaktoren zum Urea-Basisagar.....	83
7.2.2	Ergebnisse bei der Zugabe weiterer Selektivfaktoren .....	86
8	ERGEBNISSE DER NÄHRBÖDEN AN UNBEIMPFTEM NATURPROBEN.....	88
8.1	<i>Schweinetonsillen</i> .....	88
8.1.1	Tonsillenproben 1-10 .....	88
8.1.2	Tonsillenproben 11-34.....	89
8.2	<i>Schweinekot</i> .....	91
9	ERGEBNISSE MIT DEM UREA-SELEKTIVAGAR .....	93
9.1	<i>Wachstumsergebnisse der Keime auf dem Urea-Selektivagar</i> .....	93
9.2	<i>Ergebnisse aus der Beimpfung von Hackfleischproben</i> .....	99
9.3	<i>Hackfleisch</i> .....	102
<b>DISKUSSION.....</b>		<b>105</b>
10	ENTWICKLUNG EINES UREA-BASISAGARS.....	105
11	ZUGABE VERSCHIEDENER SELEKTIVFAKTOREN.....	107
12	TESTEN DER VERSCHIEDENEN NÄHRBÖDEN AN NATIVPROBEN .....	109
13	UNTERSUCHUNG DES ENTWICKELTEN UREA-SELEKTIVAGARS .....	111
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>		<b>115</b>
<b>SUMMARY .....</b>		<b>117</b>
<b>ANHANG .....</b>		<b>119</b>
14	MEDIEN ZUR ANREICHERUNG, ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON <i>Y. ENTEROCOLITICA</i> .....	119
14.1	<i>Flüssige Medien</i> .....	119

14.2 <i>Feste Medien</i> .....	120
14.3 <i>Aufbewahrungsmedium</i> .....	122
15 TESTSYSTEME UND REAGENZIEN .....	123
16 GERÄTE UND HILFSMITTEL .....	123
17 API 20E-PROFILE DER VERWENDETEN KEIME .....	127
18 API 20E-ERGEBNISSE AUS DEN TONSILLEN- UND KOTPROBEN .....	128
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>130</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>163</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>165</b>
<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>166</b>
<b>LEBENSLAUF</b> .....	<b>167</b>



## EINLEITUNG

Die gastrointestinale Infektion mit *Yersinia enterocolitica* beim Menschen steht derzeit nach der Salmonellose und der Campylobakteriose an dritter Stelle der bakteriell bedingten meldepflichtigen Durchfallerkrankungen. In Deutschland wird am häufigsten *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 von Proben erkrankter Patienten isoliert.

Die Yersiniose ist eine wichtige lebensmittelbedingte Erkrankung. Auch wenn die Isolierung humanpathogener *Y. enterocolitica* Stämmen aus Lebensmittelproben mit der klassischen Methode nur selten erfolgreich ist, gilt kontaminiertes Schweinefleisch als Hauptursache für eine Infektion.

Es gibt bis heute wenig zufrieden stellende selektive Nachweisverfahren für *Y. enterocolitica* in Lebensmittelproben. Die derzeit in den Labors verwendeten Isolierungsmethoden weisen teilweise Einschränkungen auf, wodurch nicht alle pathogenen Bioserotypen von *Y. enterocolitica* mit einer einzigen Methode nachgewiesen werden können. Zudem werden die verwendeten Selektivnährböden oftmals von den Begleitkeimen so überwuchert, dass eine eindeutige Identifizierung der Yersinien nicht möglich ist.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, einen einfach herzustellenden Selektivnährboden für die humanpathogenen Bioserotypen *Y. enterocolitica* 4/O:3 und 2/O:9 zu entwickeln, vor allem im Hinblick auf einen schnellen und eindeutigen Nachweis dieser Keime in Lebensmittelproben.

Das Selektivnährmedium sollte grundsätzlich über vier Eigenschaften verfügen:

1. Ein Wachstum muss für alle Stämme von *Y. enterocolitica* möglich sein.
2. Alle anderen Keime sollten auf diesem Nährmedium in ihrem Wachstum gehemmt werden.

3. Die Yersinien sollten ein spezifisches Aussehen aufweisen, damit sie eindeutig von Kolonien anderer Organismen unterschieden werden können.
4. Das Selektivnährmedium sollte einfach und preiswert herzustellen sein und einen schnellen Nachweis für die Routinediagnostik ermöglichen.

# LITERATUR

## 1 Yersinien

### 1.1 Taxonomie und Eigenschaften

McIver und Pike berichteten 1934 in den USA erstmals von einem gramnegativen Keim, den sie als *Flavobacterium pseudomallei* bezeichneten (BOTTONE 1999). SCHLEIFSTEIN und COLEMAN (1939) untersuchten dieses Isolat und weitere damals taxonomisch noch nicht einzuordnende Bakterien, die sie von an Enteritis erkrankten Patienten isolierten. Dieses Bakterium erinnerte sie an *Bacillus lignieri* und *Pasteurella pseudotuberculosis* und sie nannten dieses „*Bacterium enterocoliticum*“. HÄSSIG et al. (1949) beschrieben dieses Bakterium zehn Jahre später erstmals in Europa. Dieser Keim erhielt noch weitere verschiedene taxonomische Beschreibungen wie z.B. *Pasteurella „X“* bis schließlich FREDERIKSEN (1964) den heutigen Namen *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) vorschlug, benannt nach dem Schweizer Bakteriologen Alexandre Jean Emil Yersin (1863-1943), der 1894 in Hongkong erstmalig den Erreger der Pest, *Y. pestis*, isolierte (ROLLE und MAYR 2002). Seit den 80er Jahren wird *Y. enterocolitica* als Enteritis-Erreger mehr Beachtung geschenkt (NAKTIN und BEAVIS 1999), was sicherlich mit effizienteren Nachweisverfahren zusammenhängt.

*Y. enterocolitica* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*, einer Gruppe gramnegativer, oxidasennegativer und fakultativ anaerober Bakterien. Die Gattung *Yersinia* beinhaltet derzeit insgesamt elf verschiedene Spezies (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990, KAYSER 1998, NEUBAUER et al. 2001a), nämlich:

- *Y. pestis*,
- *Y. pseudotuberculosis*,
- *Y. enterocolitica*,

- *Y. ruckeri* und
- die sog. sieben *Y. enterocolitica*-like Bakterien, zu denen *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. alvdovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii* und *Y. bercovieri* zählen.

Von diesen elf Spezies sind nur drei für den Menschen pathogen: *Y. pestis* als Erreger der Pest sowie *Y. pseudotuberculosis* und bestimmte Serotypen von *Y. enterocolitica* als Erreger der Yersiniose (BERCOVIER und MOLLARET 1984, ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990, BOTTONE 1999, NEUBAUER et al. 2001a). Die drei humanpathogenen Spezies unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Invasivität: Während *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* die gastrointestinale Mukosa überschreiten und somit das darunterliegende Gewebe infizieren können, kann *Y. pestis* nur über einen Insektenstich in den Körper gelangen und nicht von sich aus die Körperoberfläche durchdringen (REVELL und MILLER 2001). *Y. ruckeri* als weitere pathogene Spezies kommt indessen ausschließlich bei Fischen als Erreger der sog. „Redmouth Disease“ vor (EWING et al. 1978), die in Deutschland 1983 zum ersten Mal bei Regenbogenforellen nachgewiesen wurde (ROLLE und MAYR 2002).

Die sieben apathogenen *Y. enterocolitica*-like Bakterien (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1984, DEDIE et al. 1993) können in der Routinediagnostik von diesen Pathogenen, ebenso wie diese untereinander, anhand einiger biochemischen Eigenschaften (Tabelle 1) voneinander unterschieden werden. Für die Differenzierung sind besonders die Reaktionen aus der Verstoffwechslung von Rhamnose, Melibiose und Saccharose entscheidend (NESBAKKEN 1992). Laut STOCK und WIEDEMANN (2003) sollte aber nicht außer Acht gelassen werden, dass einige dieser *Y. enterocolitica*-like Bakterien doch ein gewisses Potential haben können, um eine gastrointestinale Erkrankung beim Menschen auszulösen.

**Tabelle 1: Biochemische Differenzierung der *Yersinia*-Spezies (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990, VARNAM und EVANS 1991, DEDIÉ et al. 1993)**

	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. intermedia</i>	<i>Y. frederiksenii</i>	<i>Y. kristensenii</i>	<i>Y. aldovae</i>	<i>Y. rohdei</i>	<i>Y. mollaretii</i>	<i>Y. bercovieri</i>	<i>Y. ruckeri</i>
<b>Pyrazinamidase</b>	NT	-	d	+	+	+	+	+	+	+	NT
<b>Autoagglutinationstest<sup>1</sup></b>	NT	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Mucat</b>	-	-	-	d	d	-	d	-	+	+	-
<b>Sorbose</b>	-	-	d	+	+	+	+	+	+	-	-
<b>Rhamnose</b>	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
<b>Melibiose</b>	d	+	-	+	-	-	-	d	-	-	-
<b>Cellobiose</b>	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<b>Saccharose</b>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<b>Ornithin-decarboxylase</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Citrat</b>	-	-	-	+	d	-	d	+	-	-	-
<b>Voges-Proskauer</b>	-	-	d	+	d	-	+	-	-	-	-
<b>Indol</b>	-	-	d	+	+	d	-	-	-	-	-
<b>Beweglichkeit bei +28°C</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Inkubation bei +22-28°C, 48 h

Autoagglutinationstest<sup>1</sup> Autoagglutinationstest in VP-Bouillon  
 + > 90% positiv  
 d 10-90% positiv  
 - < 10% positiv  
 NT nicht getestet

*Y. enterocolitica* ist ein kulturell anspruchloses, gramnegatives, Oxidase-negatives, Katalase-positives, alkalistabiles, psychrotropes, kokkoides bis pleomorphes und fakultativ anaerobes Stäbchen mit einer Größe von 0,5-0,8 x 1,3 µm, das keine Kapsel und keine Sporen bilden kann. *Y. enterocolitica* besitzt eine Nitratreduktase (BERCOVIER und MOLLARET 1984, ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990), was im Hinblick auf die Resistenz gegenüber Kaliumchlorat eine wichtige Rolle spielt. Das Bakterium ist außerdem Urease-positiv, H<sub>2</sub>S-negativ, Laktose-negativ, kann Mannit verstoffwechseln (wichtig für den Nachweis auf Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) -Agar) und bildet aus Glukose Säure (Tabelle 2).

*Y. enterocolitica* bildet das Enzym Urease, mit dem Harnstoff in Karbonsäure und Ammoniak gespalten wird. Dies führt zu einem Nettoanstieg des pH-Wertes (DE KONING-WARD und ROBINS-BROWNE 1997). Die Urease der Yersinien ist bei saurem pH sehr aktiv und ermöglicht es dem Organismus somit, die Magensäure, aber auch andere saure Umgebungen zu überstehen (DE KONING-WARD und ROBINS-BROWNE 1997). Eine stärkere Aktivität von Urease wird bei Temperaturen um +28°C als bei +37°C erzielt (DE KONING-WARD und ROBINS-BROWNE 1997). Der Nachweis von Urease gibt auch einen Hinweis auf die mögliche Pathogenität, da Urease-negative *Y. enterocolitica* Isolate nicht als pathogen gelten (HILBERT et al. 2003).

Nach BERCOVIER et al. (1980) können anhand der Saccharoseverstoffwechslung die Saccharose-positiven *Y. enterocolitica* von den Saccharose-negativen *Y. kristensenii*, die ebenfalls häufig in Lebensmittel- und Kotproben vorhanden sind (LOGUE et al. 1996), unterschieden werden. Aber in einer Studie von FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2002) wiesen auch einige der Saccharose-negativen *Y. enterocolitica* Isolate ein negatives Ergebnis hinsichtlich der Pyrazinamidaseaktivität auf, was auf eine mögliche Pathogenität hinweist. Dies zeigt, dass eine Biotypisierung bei der Untersuchung auf *Y. enterocolitica* unerlässlich ist (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2002).

**Tabelle 2: Charakteristische Eigenschaften von *Y. enterocolitica* (nach BRENNER 1981; KAPPERUD und BERGAN 1984)**

Parameter	Reaktion
<b>Säure-Produktion aus:</b>	Adonitol - D-Cellobiose + Dulcitol - D-Glucose + Malonat - D-Mannit + D-Mannose + D-Melibiose - Mucat - Raffinose - L-Rhamnose - Sucrose + D-Sorbitol + D-Trehalose +
<b>Andere Tests:</b>	Arginin-Dehydrase + Beweglichkeit, +22-25°C v* Beweglichkeit, +35-37°C - Citrat - Phenylalanin-Desaminase - Gasproduktion aus Glucose - Gelatineabbau bei +22°C - H <sub>2</sub> S - Indol v KCN - Lysin-Decarboxylase - Methylrot v Nitratreduktion + Oxidase - Ornithin-Decarboxylase + Pigment - Urease + Voges-Proskauer, +22-25°C + Voges-Proskauer, +35-37°C -

+= mehr als 90% zeigen eine positive Reaktion

-= weniger als 10% zeigen eine positive Reaktion

v= zwischen 10% und 90% zeigen eine positive Reaktion

\*= einige Stämme der Serogruppe O:3 sind unbeweglich

Eine Besonderheit von *Y. enterocolitica* ist, dass es sich unter optimalen Bedingungen bei Temperaturen zwischen -1,3°C und +42°C (HEIM et al. 1983) bzw. +44°C (BOCKEMÜHL 1999) vermehren kann. HEIM et al. (1983) registrierten bei ihrer Untersuchung ein Koloniewachstum bei +0,5°C und +3,5°C (psychrotroph). Die optimale Wachstumstemperatur liegt jedoch zwischen +28°C und +29°C (BOCKEMÜHL 1999). Ein weiteres Merkmal ist hierbei, dass bestimmte Eigenschaften des Keims temperaturabhängig sind. *Y. enterocolitica* ist z.B. bei +22-28°C peritrich begeißelt, dagegen bei +35-37°C unbegeißelt und somit auch unbeweglich (SWAMINATHAN et al. 1982, ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990, BOTTONE 1999). Einige pathogene Stämme des Serotyps O:3 sind vollständig unbeweglich, unabhängig von der Temperatur (NESBAKKEN 1992). Zu diesen temperaturabhängigen Eigenschaften zählen außerdem die o-Nitrophenyl-β-galactopyranosid (ONPG)-Hydrolyse, die Ornithindecarboxylase und die Voges-Proskauer-Reaktion, die bei +28 bis +30°C, jedoch nicht bei +37°C exprimiert werden (BERCOVIER und MOLLARET 1984, VARNAM und EVANS 1991). Durch eine Inkubation bei +37°C resultiert ein Verlust des Virulenzplasmides und somit auch ein Verlust gewisser plasmidgebundener Eigenschaften (KAY et al. 1982, KANDOLO und WAUTERS 1985, JOHNSON 1998).

Laut STERN et al. (1980) kann *Y. enterocolitica* nicht bei einem pH-Wert unter 4,6 oder einem pH-Wert über 9,0 wachsen. BROCKLEHURST und LUND (1990) stellten dagegen noch bei pH 4,18 bei +20°C Wachstum fest. Der optimale pH liegt bei etwa 7,6 (DE KONING-WARD und ROBINS-BROWNE 1997). Die Säuretoleranz hängt sicher auch mit der Ureaseaktivität zusammen, da durch den Abbau von Harnstoff zu Ammoniak der pH-Wert des Cytoplasmas erhöht wird (DE KONING-WARD und ROBINS-BROWNE 1997). Außerdem wird die Säuretoleranz von der Umgebungstemperatur, der Zusammensetzung des Mediums und der entsprechenden Wachstumsphase des Bakteriums beeinflusst (BROCKLEHURST und LUND 1990).

*Y. enterocolitica* kann in mehrere Biotypen eingeteilt werden (MOLLARET et al. 1979, BERCOVIER et al. 1980, KAPPERUD und BERGAN 1984, WAUTERS et al. 1987). Diese Einteilung soll einen Hinweis über die mögliche Pathogenität eines Isolates geben. Ursprünglich schlug NILÉHN (1969) eine Einteilung von

*Y. enterocolitica* in 5 Biotypen vor anhand ihrer Indolbildung, Äskulin- und Salicinfermentation, Laktosefermentation, der Säurebildung aus Xylose, Trehalose, Saccharose, Sorbose und Sorbitol, OPNG-Test, Ornithindecarboxylase, Voges-Proskauer und Nitratreduktion. WAUTERS (1970) modifizierte dieses Schema, indem er anstelle Salicin und Äskulin eine weitere Reaktion, Lecithinase, hinzufügte, um Stämme aus der Biogruppe 1 zu identifizieren. Diese Lecithinase wurde später durch die Tween-Esterase ersetzt. Weitere biotypisierende Schemata wurden von anderen Autoren (KNAPP und THAL 1973, KAPPERUD und BERGAN 1984) entwickelt. Aber durch das überarbeitete Biotypisierungsschema (Tabelle 3) von WAUTERS et al. (1987) ist es nun möglich, den apathogenen Biotyp 1A von dem pathogenen Biotyp 1B anhand der Äskulin/Salicin-Reaktion und der Pyrazinamidasreaktion zu differenzieren, da diese bei dem apathogenen Biotyp 1A stets positiv ausfallen (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990). Die Unterscheidung von Biotyp 1A von Biotyp 1B ist deshalb so wichtig, damit nicht pathogene Stämme als apathogen eingestuft werden (WAUTERS et al. 1987). Die apathogenen Serotypen des Biotyps 1A kommen in der Umwelt als Saprophyten oder evtl. auch als Opportunisten vor (WAUTERS et al. 1987, ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990).

Tabelle 3: Biotypisierungsschema von *Y. enterocolitica* nach WAUTERS et al. (1987)

Testreaktion	Biogruppen						
	1A	1B	2	3	4	5	6*
Lipase (Tween-Esterase)	+	+	-	-	-	-	-
Äskulin / Salicin	±	-	-	-	-	-	-
Indol	+	+	(+)	-	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	-	v	+
Trehalose / NO <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	-	+
Pyrazinamidase	+	-	-	-	-	-	+
β-D-Glukosidase	+	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	(+)	-
Prolinpeptidase	v	-	-	-	-	-	+

Inkubation bei +28°C, 48 h

- +
  - 
  - v
  - ±
  - (+)
  - \*
- positive Reaktion  
 negative Reaktion  
 variable Reaktion  
 verzögerte positive Reaktion  
 leicht positiv  
 nachträglicher Vorschlag, dass Biovar 6 in zwei neue Spezies aufgespaltet wurde: *Y. bercovieri* und *Y. mollaretii* (WAUTERS et al. 1988)

*Y. enterocolitica* kann des Weiteren mit Hilfe der O-Antigene (Oberflächenantigene) und H-Antigene (Geißelantigene) in verschiedene Serotypen eingeteilt werden. Während WINBLAD (1967) ursprünglich nur 8 Faktoren berücksichtigt hat, hat WAUTERS (1981) die Antigene auf 57 erhöht. Mittlerweile belaufen sich die O-Antigene auf 60, von denen 28 auf die Spezies *Y. enterocolitica*, die restlichen auf *Y. frederiksenii* (12), *Y. intermedia* (11) und *Y. kristensenii* (9) entfallen (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990). Für *Y. enterocolitica* wurden bisher 18 H-Antigene bestimmt, für *Y. frederiksenii* 11, für *Y. intermedia* 6 und für

*Y. kristensenii* 9 (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990). Kombiniert mit den 44 H-Antigenen können 214 Serotypen für *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* und *Y. kristensenii* unterschieden werden (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990). H-Antigene sind speziesspezifisch und können deshalb zur direkten Isolierung der *Yersinia*-Arten verwendet werden, wohingegen die O-Antigene bei verschiedenen Spezies auftreten (SWAMINATHAN et al. 1982, ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990). Von den mindestens 60 Serotypen werden nur elf mit einer menschlichen Infektion in Verbindung gebracht (BOTTONE 1999).

Die mögliche Pathogenität von *Y. enterocolitica* Isolaten sollte sowohl anhand der Serotypeneinteilung als auch der Biotypeneinteilung geprüft werden (BOTTONE 1999). Eine alleinige Serotypeneinteilung ist nicht ausreichend für eine Pathogenitätsuntersuchung (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2002), da O-Antigene bei den verschiedenen Spezies gefunden werden können (SWAMINATHAN et al. 1982, ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990). *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 zählt weltweit zu dem häufigsten Bioserotyp einer menschlichen Yersiniose (BOTTONE 1999). Weitere wichtige Bioserotypen, die mit einer Erkrankung des Menschen in Verbindung gebracht werden, gehören den Bioserotypen 2/O:5,27; 1B/O:8 und 2/O:9 an (DE BOER 1992).

*Y. enterocolitica* Serotyp O:9 weist eine enge Antigengemeinschaft zu *Brucella* spp. auf und kann somit zu falsch positiven Ergebnissen bei der serologischen Untersuchung auf Brucellose führen (HAWARI et al. 1981, MITTAL et al. 1985, WEYNANTS et al. 1996, GARIN-BASTUJI et al. 1999, ROLLE und MAYR 2002).

## 1.2 Pathogenität

Nicht alle Stämme von *Y. enterocolitica* sind für den Menschen pathogen. Eine wesentliche Virulenzeigenschaft eines pathogenen Bakteriums ist es, in das Dünndarmepithel des Wirtes eindringen und sich dort vermehren zu können (BOTTONE 1997). Für das Eindringen in die Zelle sind sowohl plasmidkodierte als auch chromosomal kodierte Virulenzfaktoren nötig (HESSEMANN et al. 1984, HESSEMANN und LAUFS 1985). Die Zellpenetration ermöglicht es *Y. enterocolitica*, auch in andere Gewebe vorzudringen (PEPE und MILLER 1993), um dort pathogen zu wirken. Die Yersinien besiedeln überwiegend die Peyerschen

Platten des distalen Dünndarms und vorderen Kolonbereichs, um dann in die Leber und die Milz über mesenterische Lymphknoten vorzudringen (HANSKI et al. 1989, PEPE und MILLER 1993, BOTTONE 1997). Außerdem umgehen die Bakterien durch das Eindringen in die Zellen der anfänglichen Abwehr des Wirtes (PEPE und MILLER 1993). PEPE und MILLER (1993) fanden heraus, dass die Peyerschen Platten bei einer Infektion mit *inv* Mutanten erst 3-4 Tage später als bei der Infektion mit Wildtypen besiedelt werden. Die Leber und Milz aber werden bei beiden Infektionsformen etwa um den Tag 7 besiedelt. Daher ist es bisher noch nicht eindeutig geklärt, ob nicht noch andere Wege einer Infektion über das lymphatische System oder parallel über den Blutweg existieren (PEPE und MILLER 1993, REVELL und MILLER 2001).

### 1.2.1 Plasmidkodierte Pathogenitätsfaktoren

Durch Plasmidübertragungsversuche konnte bestätigt werden, dass bestimmte Pathogenitätsfaktoren plasmidkodiert sind (PORTNOY und MARTINEZ 1985). Dazu gehören die meist temperaturabhängigen Eigenschaften wie die Serumresistenz (PAI und DeSTEPHANO 1982), die Bildung von V und W Antigenen (PERRY und BRUBAKER 1983), die Expression bestimmter äußerer Membranproteine (PORTNOY et al. 1984, PORTNOY und MARTINEZ 1985), Autoagglutination (LAIRD und CAVANAUGH 1980), kalziumabhängiges Wachstum (GEMSKI et al. 1980) und die Zytotoxizität gegenüber Makrophagen (PRPIC et al. 1983).

Alle virulenten *Yersinia* Spezies besitzen für die vollständige Ausprägung ihrer Virulenz ein etwa 70 kb großes Plasmid („Episom“), das als **plasmid for *Yersinia* virulence** (pYV) bezeichnet wird (PORTNOY et al. 1981, HESSEMAN 1990). Die Virulenzplasmide der verschiedenen pathogenen *Y. enterocolitica* Bioserotypen weisen eine DNS-Sequenzhomologie von 70-100% auf (CORNELIS et al. 1987, DEDIE et al. 1993). HESSEMAN et al. (1984) zeigten, dass pYV zwar notwendig, aber allein nicht ausreichend für eine Erkrankung ist. Auch pathogene *Y. enterocolitica* Stämme ohne dieses Plasmid wurden nachgewiesen, wobei dieses Plasmid durch Kultivierungsmaßnahmen verloren gegangen sein kann (KANDOLO und WAUTERS 1985, RILEY und TOMA 1989, JOHNSON 1998).

*Y. enterocolitica* Stämme benötigen **pYV** für ihr Überleben und ihre Vermehrung im lymphatischen Gewebe des Wirtes (HANSKI et al. 1989, CORNELIS et al. 1998), denn *Y. enterocolitica* Stämme ohne pYV werden nach der Aufnahme durch Makrophagen zerstört (BRUBAKER 2003). Dieses pYV kodiert, wie derzeit bekannt, für 13 verschiedene Polypeptide, darunter ein äußeres Membranprotein **Yersinia adhesin A** (YadA), weitere äußere Membranproteine **Yersinia outer membrane proteins** (Yop), wie z.B. YpoE, YopH, YopM, YopT und deren Sekretionsapparates **Yop secretion** (Ysc) type III (CORNELIS 1998, GROSDENT et al. 2002). Diese oben genannten Polypeptide werden nur bei +37°C und nur in einem kalziumfreien Medium exprimiert (CORNELIS 1998).

**YadA**, ein 45 kDa großes, äußeres Membranprotein, das durch *yadA* kodiert wird, ist wichtig für die Zelladhärenz und die Autoagglutination sowie für die Phagozytose- und Serumresistenz (BOTTONE 1997). Es bildet dimere und tetramere Fibrillen und ermöglicht dadurch vor allem die Bindung an HEp-2 Zellen (HESSEMANN und GRÜTER 1987, HESSEMANN 1990) und Bürstensaummembranen. YadA wird optimal bei +37°C gebildet, kann aber zum Teil auch in geringem Maße bei +25°C anwesend sein (BOTTONE 1999). Ein Ausschalten des Gens führt zur Reduktion der Virulenz im Mausmodell sowie zum Verlust der Phagozytoseresistenz und des Überlebens im Serum (HESSEMANN 1990). Bei Vorhandensein von YadA in der äußeren Membran kann *Y. enterocolitica* auch an nichtbiologische Oberflächen wie Polystrene binden, die mit der Oberflächenhydrophobie zusammenhängen (MURIANA 2002).

Die genaue Bedeutung von **YopE** ist noch unklar, jedoch hemmt dieses Protein zusammen mit **YopH** die Phagozytose (CORNELIS 1998, RYSER 2002). **YopM** ermöglicht ein Überleben des Keims im Wirtsgewebe (RYSER 2002). **YopT** zerstört Makrophagen und HeLa Zellen, indem es die Aktinfilamente zerstört werden und somit das Zellgerüst (CORNELIS 1998).

### 1.2.2 Chromosomale Pathogenitätsfaktoren

**inv** kodiert Invasin, ein 92 kDa äußeres Membranprotein. Dieses Invasin spielt die größte Rolle beim Eindringen ins Epithel im Anfangsstadium einer Infektion, indem es an Integrin bindet (MILLER und FALKOW 1988, HESSEMANN 1990, ISBERG

1990, PEPE und MILLER 1993). Es wird hauptsächlich bei Temperaturen unter +28°C exprimiert, kann aber unter sauren Bedingungen auch gut bei +37°C gebildet werden (BOTTONE 1999). *Inv* kann auch bei nichtpathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen nachgewiesen werden, jedoch ohne Funktion (PIERSON und FALKOW 1990). Wenn den Yersinien Invasin fehlt, so ist wahrscheinlich eine höhere Infektionsdosis erforderlich, um eine Infektion zu verursachen (PEPE und MILLER 1993).

Das attachment-invasive-locus (*ail*) Gen wird nur bei pathogenen Serotypen von *Y. enterocolitica* gefunden (MILLER et al. 1989, HESSEMANN 1990). Das dadurch determinierte 17 kDa Ail Protein ist ebenfalls erforderlich für die Zellpenetration bei einer Infektion, jedoch kommt es erst etwas später als *inv* zum Einsatz, da es überwiegend bei Körpertemperatur gebildet wird (PEPE und MILLER 1993). Außerdem ist *ail* neben den bereits erwähnten plasmidkodierten Pathogenitätsfaktoren auch für die Serumresistenz verantwortlich (PIERSON und FALKOW 1993, FUNK et al. 1998). FUNK et al. (1998) testeten bei ihrer Untersuchung *Y. enterocolitica* Isolate auf das Vorhandensein des *ail* Genes (13,2%), um eine mögliche Pathogenität abzusehen. Der *inv* locus ist nicht gewebsspezifisch, hingegen der *ail* locus schon (WEAGANT et al. 1998).

**Yst** (*Yersinia* stable toxin) kodiert für das hitzestabile Enterotoxin Yst. Dieses Yst ist dem hitzestabilen Toxin von *Escherichia coli* in seiner Struktur und seiner Funktion sehr ähnlich. Es aktiviert die Guanylatcyclase, was wiederum den cGMP Spiegel im Darm erhöht und zu einer Flüssigkeitsansammlung im Darm führt. Man nimmt an, dass Yst durch diese Kaskade am Durchfall vor allem von Kindern bei einer *Y. enterocolitica* Infektionen beteiligt ist (REVELL und MILLER 2001). Yst wurde nur bei pathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen und einigen *Y. kristensenii* Stämmen nachgewiesen (HESSEMANN 1990). Laut WEAGANT et al. (1998) bilden auch Umweltkeime Yst, während hingegen einige der pathogenen *Y. enterocolitica* Stämme nicht immer dieses Protein bilden. SINGH und VIRDI (2004) fanden in ihrer Untersuchung bei *Y. enterocolitica* Biotyp 1A Stämmen vor allem das *ystB* Gen durch eine dot blot hybridization. Bei Stämmen von *Y. intermedia* und *Y. frederiksenii* konnten die Untersucher (SINGH und VIRDI 2004) keinerlei Enterotoxinbildung nachweisen. Die genaue Bedeutung des Enterotoxins ist aber

noch unklar, da man bei Temperaturen über +30°C keine Toxinbildung nachweisen kann (PAI und MORS 1978, HESSEMANN 1990). SINGH und VIRIDI (2004) konnten allerdings bei einigen Isolaten des *Y. enterocolitica* Biotyps 1A eine YST-b Bildung bei pH 7,5 und +37°C nach 2 Tagen feststellen, was auf die Möglichkeit hindeutet, dass dieses auch im Darm unter ähnlichen Bedingungen gebildet werden kann. Das Enterotoxin von Yst ist stabil bei einer pH-Spannbreite von 1-11. Es übersteht auch eine 30-minütige Behandlung bei +121°C oder eine siebenmonatige Lagerung bei +4°C (BOYCE et al. 1979). Daher ist es auch denkbar, dass eine Erkrankung entsteht, wenn ein Patient bereits fertig gebildetes Enterotoxin aufnimmt, da dieses durch die Magensäure ebenso wie durch die Lebensmittelverarbeitung nicht zerstört wird (SWAMINATHAN et al. 1982).

Es ist bekannt, dass der Verlust bzw. die Ausschaltung eines der Pathogenitätsfaktoren nicht unbedingt zu einem Verlust der Pathogenität führen muss, noch dass der Infektionsweg sich deshalb verändert (PEPE und MILLER 1993). Interessanterweise wird die Virulenz sogar verstärkt, wenn gleichzeitig Yop1 und *inv* inaktiviert werden (ROSQVIST et al. 1988).

### 1.3 Epidemiologie

*Y. enterocolitica* kommt weltweit vor, vor allem in den gemäßigten bis subtropischen Klimazonen, während der Keim hingegen in den tropischen Gebieten Afrikas, Süd- oder Südostasiens fast vollständig fehlt (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990, KAPPERUD 1991). Stämme von *Y. enterocolitica* wurden isoliert aus Trinkwasser (ALDOVÁ et al. 1981), Tieren (KWAGA et al. 1990, WUTHE und ALEKSIĆ 1997), Schweinefleisch (KWAGA et al. 1990, LOGUE et al. 1996, MAYRHOFER et al. 2004), Schweinezungen (DOYLE et al. 1981, DE BOER 1995, BUCHER 2001), Rindfleisch (SIRIKEN 2004, LOGUE et al. 1996, MAYRHOFER et al. 2004), Geflügelfleisch (KHALAFALLA 1990, LOGUE et al. 1996), pasteurisierter Milch (ÖZBAS und AYTAÇ 1993) und Meeresfrüchten (KHARE et al. 1996), wobei die meisten Isolate sich als apathogen erwiesen.

Entgegen den Meldungen des Robert-Koch-Institutes (RKI 2003) und einer Untersuchung von BUCHER et al. (2004) stellen andere Autoren (WEBER und KNAPP 1981a+b, HARTUNG und GERIGK 1991, ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL

1996, NAKTIN und BEAVIS 1999) gewisse saisonale Schwankungen im Hinblick auf ein vermehrtes Auftreten von durch Yersinien verursachte Erkrankungen in den kälteren Monaten fest, was sicherlich mit der psychotrophen Eigenschaft von *Y. enterocolitica* zusammenhängen kann. Auch die Isolierung pathogener Yersinien aus Lebensmitteln bzw. Tieren ist in den Wintermonaten (Oktober bis April) vermehrt möglich (BOCKEMÜHL et al. 1979, WEBER und KNAPP 1981a+b, KIESEWALTER 1992, ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1996), was NEUBAUER et al. (2001c) mit einer erhöhten Erregerausscheidungsrate durch resistenzgeminderte Schlachtschweine in Verbindung bringt.

### 1.3.1 Inzidenz beim Menschen

In verschiedenen Untersuchungen war eine gewisse geographische Verteilung der einzelnen Bioserovare festzustellen (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990). Weltweit, aber vor allem in Europa, sind die Serotypen O:3 und O:9, gelegentlich auch O:5,27 die Ursache für eine Erkrankung des Menschen (ALEKSIĆ et al. 1988, ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1996, NEUBAUER et al. 2001b). In den USA dagegen dominieren die Serotypen O:8 und O:5,27 (MOLLARET et al. 1979, HAHN 1989, BOTTONE 1999). Geographische Grenzen scheinen sich aber aufgrund der Globalisierung immer mehr zu verwischen (LEE et al. 1991). Die Inzidenz von *Y. enterocolitica* variiert nicht nur von Land zu Land, sondern auch innerhalb eines Landes (CHRISTENSEN 1980, FUKUSHIMA et al. 1983, RKI 2003).

Seit 2001 besteht in Deutschland bundesweit für Erkrankungen durch *Y. enterocolitica* Meldepflicht nach dem Infektionsschutzgesetz (§7 IfSG). Im Rahmen des ehemals geltenden Bundesseuchengesetz (BSG) wurden die *Y. enterocolitica* Erkrankungen lediglich unter dem Oberbegriff „Enteritis infectiosa - übrige Formen“ zusammen mit anderen Durchfallerregern registriert (RKI 2002). Laut NEUBAUER et al. (2001c) weisen etwa 40% der Bevölkerung in Deutschland einen positiven Antikörperspiegel gegen Yersinien auf. Im Jahr 2001 wurden in Deutschland insgesamt 7.186 Fälle statistisch erfasst, wobei vor allem Kleinkinder unter 5 Jahren aufgelistet wurden. Im Jahr 2002 war ein leichter Anstieg mit 7.515 Fällen feststellbar. Dagegen fiel im Jahr 2003 die Anzahl der gemeldeten Fälle um 13% im Vergleich zum Vorjahr auf 6.571. In allen drei Jahren war keine saisonale

Schwankung erkennbar (RKI 2001, 2002, 2003). Haupterreger war jeweils Serotyp O:3 (2003: 87%), daneben wurden nur in wenigen Fällen der Serotyp O:9 (2003: 5%) und O:5,27 (2003: 1%) als Verursacher der Yersiniose identifiziert. 2002 wurde in Deutschland erstmals bei einem an enteraler Yersiniose erkrankten Patienten der Bioserotyp 1B/O:8 nachgewiesen (RKI 2002). ZECHNER (2003) isolierte in ihrer Studie im Großraum München häupsächlich den Bioserotyp 4/O:3 (92%), dagegen den Bioserotyp 2/O:9 nur zu 4% und 2/O:5,27 kein einziges Mal. In Sachsen, Sachsen-Anhalt und Thüringen wurde 2003 eine besonders hohe Inzidenz an Yersiniose-Fällen gemeldet (19 bis 22 Erkrankungen/100.000 Einwohner) im Vergleich zum bundesweiten Durchschnitt von 8 Erkrankungen/100.000 Einwohner (RKI 2003).

Nicht alle gemeldeten Fälle von Yersiniose-Erkrankten werden in der jährlichen Statistik aufgelistet. So fallen alle Fälle heraus, von denen zwar der labordiagnostische Nachweis vorhanden ist, aber das entsprechende klinische Krankheitsbild nicht bekannt ist. Andererseits können klinisch unauffällige Dauerausscheider durch diese Einteilung die Statistik nicht verfälschen (ZECHNER 2003).

### 1.3.2 Prävalenz in Tieren und Lebensmitteln

BUCHER (2002) untersuchte in Deutschland die Tonsillen und den Kot von Kälbern und Junggrindern auf das Vorhandensein pathogener *Y. enterocolitica*, konnte darin aber nur apathogene Yersinien nachweisen. Es lässt sich eine gewisse Wirtsspezifität bei einigen Serotypen feststellen (MOLLARET et al. 1979). So kommen O:1, 2a, 2b, 3 fast ausschließlich beim Chinchilla vor und O:2a, 2b, 3 beim Hasen (MOLLARET et al. 1979).

LOGUE et al. (1996) wiesen eine hohe Prävalenz an *Yersinia* in gekochtem Fleisch nach, überwiegend von Bioserotyp 4/O:3, was aber höchst wahrscheinlich auf eine sekundäre Kontamination während der Verarbeitung der Fleischproben zurückzuführen war. Vogt (1996) konnte in Feinkostsalaten, cremehaltigen Backwaren und Speiseeis nur apathogene Yersinien nachweisen. In Indien konnten KHARE et al. (1996) aus Fisch und aus Schalentieren ebenfalls nur apathogene *Y. enterocolitica* isolieren. DE BOER et al. (1982) konnten in Geflügelfleisch-

produkten überwiegend *Y. enterocolitica* Serotypen O:5, O:7,8 und O:25 nachweisen. Auch in einer weiteren Studie konnte DE BOER (1995) aus Gemüse, Eiern, rohen Geflügelfleischprodukten und Rindfleisch nur apathogene *Y. enterocolitica* Stämme (v.a. Biotyp 1A) isolieren. Ebenso konnten aus Fisch und Hähnchen keine pathogenen *Y. enterocolitica* isoliert werden (FREDRIKSSON-AHOMAA 2001). Wurden in Milch pathogene Yersinien nachgewiesen, so gelangten diese immer nachträglich in die Milch (BLACK et al. 1978, CHIESA et al. 1987).

Nur aus Schweinen als lebensmittellieferndes Tier hingegen wird regelmäßig der Bioserotyp 4/O:3 isoliert und stellt somit das Hauptreservoir humanpathogener *Y. enterocolitica* dar (CHRISTENSEN 1980, KNAPP 1983, NESBAKKEN und KAPPERUD 1985, DE BOER und NOUWS 1991, MERILAHTI-PALO et al. 1991, DE BOER 1995, FUNK et al. 1998, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001b, MURIANA 2002, ZECHNER 2003). In einer Vergleichsuntersuchung von FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2003) über aus Schweinetonsillen isolierten *Y. enterocolitica* Stämme in Finnland und Deutschland zeigte sich, dass *Y. enterocolitica* 4/O:3 Genotypen unterschiedlich geographisch verbreitet sind.

### 1.3.3 Verbreitung im Fleischgewinnungsprozeß

Durch einzelne Verfahrensschritte beim Schlachtprozess wie z.B. Ausschneiden der Zunge und der Tonsillen kann eine Kontamination des übrigen Schlachtkörpers bzw. Organe erfolgen (BUCHER 2001). Ein weiteres wichtiges Problem ist, dass die Tonsillen nur ungenügend vom Schlachtkörper entfernt werden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2004). KOCH (2003) fand in ihrer Untersuchung pathogene Yersinien auf den Arbeitsflächen und Kettenhandschuhen in Metzgereibetrieben und konnte so eine mögliche Verbindung zwischen Ausgangsprodukt und den entstehenden Produkten aufzeigen.

Wichtige kriterische Kontrollpunkte bei der Schlachtung sind daher:

- a) circumanaler Einschnitt und das Entfernen der Eingeweide
- b) Ausschneiden der Zunge, des Pharynx und insbesondere der Tonsillen
- c) die Fleischuntersuchung postmortem, die einen Einschnitt in die

Mandibularlymphknoten vorsieht

d) das Entbeinen des Kopffleisches (KAPPERUD 1991).

Auch durch das Verwenden von Wasser im Schlachtverfahren können Yersinien von der kontaminierten Maulhöhle oder durch Faeces auf den restlichen Schlachttierkörper gelangen (MERILAHTI-PALO et al. 1991). In einer Untersuchung von NESBAKKEN (1988) wurde aufgezeigt, dass Arbeitsschritte wie das Entfernen der Zunge, der Tonsillen und das Entnehmen des Darms beim Schlachtprozeß den Schlachttierkörper sowie die Organe unter anderem durch Schlachtmesser und Hände der Fleischkontrolleure mit *Y. enterocolitica* kontaminieren können. Auch andere Schlachttierkörper können verunreinigt werden, da das Messer meist nicht zwischen den einzelnen Tieren gereinigt und sterilisiert wird (NESBAKKEN 1988). NESBAKKEN (1992) schlägt deshalb eine Methode mit zwei Messern bzw. eine Reinigung der Messer zwischen zwei Arbeitsgängen vor, die den Übertragungsweg von der Maulhöhle auf andere Teile des Schlachtkörpers verhindern soll. Außerdem kann laut NESBAKKEN et al. (1994) durch das Verschließen des Rektums mit einer Plastiktüte die Inzidenz von *Y. enterocolitica* 4/O:3 reduziert werden, wonach nur 0,8% der Schlachttierkörper im Gegensatz zu 10% ohne den Gebrauch einer Plastiktüte kontaminiert waren. Ebenso fand ANDERSEN (1988) eine verminderte Kontaminationsrate des Schlachttierkörpers mit *Y. enterocolitica*, wenn der Anus und das Rektum mit einer Plastiktüte verschlossen wurden.

*Y. enterocolitica* kann in gefrorenen Lebensmitteln längere Zeit gut überleben. Dagegen ist es gegenüber Hitze empfindlich und wird bei den standardisierten Pasteurisierungstemperaturen von (+71,8°C) und –zeiten (18 sec) zerstört (HEIM et al. 1983, SCHIEMANN 1989, TOORA et al. 1992). Auch wiederholtes Auftauen überstehen die Keime (TOORA et al. 1992). Eine Kontamination kann bei mangelnder Hygiene von rohem Schweinefleisch auf bereits hitzebehandelte Lebensmittel erfolgen (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a). Zu beachten ist, dass *Y. enterocolitica* aufgrund seiner Fähigkeit, auch anaerob wachsen zu können, in Vakuum verpacktem und gekühltem Fleisch ebenfalls wachsen kann (HANNA et al. 1976, GRAU 1981). BUCHER (2001) schlug in seiner Arbeit vor, dass v.a. eine Optimierung der Hygieneverhältnisse und eine bessere Ausbildung

des Personals zu einer Reduzierung der Kontamination von Fleisch und Innereien mit *Y. enterocolitica* führen können.

Laut FUKUSHIMA et al. (1989) stellen die Lymphknoten keine Gefahr für eine Kontamination des Schlachtkörpers mit pathogenen Yersinien dar, da diese Keime nicht in den Mesenterial- bzw. Cervicallymphknoten auftauchen. Gemäß ihrer Untersuchung sehen sie infizierten Faeces als Hauptursache einer Kontamination der Haut aber auch der Maulhöhle. Sie schlagen vor, den Schweinekörper vor der Schlachtung zu waschen, um eine Kontaminierung des Schlachtkörpers mit pathogenen Yersinien zu reduzieren.

Im Gegensatz dazu sprechen die Ergebnisse der Untersuchung von NESBAKKEN et al. (2003) dafür, dass ein Anschneiden der submaxillaren Lymphknoten bei der Fleischuntersuchung ein Kontaminationsrisiko für pathogene Yersinien darstellt. In einem Fall ließen sich *Y. enterocolitica* O:3 in der Nierenregion nachweisen, nachdem ein Fleischkontrolleur diese Stelle nur berührt hat. Ihrer Meinung nach können auch die Mesenteriallymphknoten ein Risiko darstellen, da 8,3% der untersuchten Proben positiv waren (NESBAKKEN et al. 2003).

#### **1.3.4 Übertragung**

Die Übertragungswege von *Y. enterocolitica* sind nicht sicher bekannt. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt wahrscheinlich über kontaminierte Lebensmittel oder kontaminiertes Wasser (STERN und PIERSON 1979, STENGEL 1986, ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990, KIESEWALTER 1992, BOTTONE 1999). Der erste Ausbruch von Yersiniose, der eindeutig mit kontaminierten Lebensmitteln (hier: Schokoladenmilch kontaminiert mit *Y. enterocolitica* O:8) in Verbindung gebracht werden konnte, ereignete sich 1976 in Oneida County, New York, wo vor allem Schulkinder mit Gastroenteritissymptomen betroffen waren (BLACK et al. 1978). Sonst kann nur selten eine direkte Verbindung zwischen kontaminierten Lebensmittelproben und einem Krankheitsausbruch beim Menschen nachgewiesen werden (TAUXE 1987, SCHIEMANN 1989), da aufgrund der recht langen Inkubationszeit von (1-) 7-10 Tagen ein Rückschluss auf die Quelle der Infektion und der sich daraus ergebende Übertragungsweg oft nicht mehr möglich ist (DEDIE et al. 1993).

Eine geringe Rate an *Y. enterocolitica* Erkrankungen in moslemischen Ländern lässt vermuten, dass die geringeren Infektionszahlen mit dem Verzicht auf Schweinefleisch zusammen hängen (SAMADI et al. 1982). Außerdem konnte ZECHNER (2003) keinen genotypischen oder phänotypischen Unterschied zwischen *Y. enterocolitica* Isolaten von Menschen und Schweinen finden. Daher wird das Schwein im Allgemeinen als das Hauptreservoir der für den Menschen pathogenen Yersinien, v.a. *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3, angesehen, wobei insbesondere die Tonsillen und die Zungen aber auch, zwar in geringerer Form, der Kot klinisch gesunder Schweine mit den *Y. enterocolitica*-Serotypen O:3 und O:9 behaftet sind (DOYLE et al. 1981, ALDOVÁ et al. 1990, DE BOER und NOUWS 1991, MERILAHTI-PALO et al. 1991, DE BOER 1995, HARIHARAN et al. 1995, BUCHER 2001, FREDRIKSSON- AHOMAA et al. 2003). Bei einer Untersuchung von FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001b) waren 60% der Schweinetonsillen und 10% der Kotproben mit *Y. enterocolitica* behaftet. FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001a) sehen kontaminierte Schweineinnereien als Hauptüberträger von *Y. enterocolitica* an, da 71% der Humanstämme keinen Unterschied zu den Stämmen zeigten, die in dieser Studie aus Schweinezungen, -lebern, -nieren und herzen isoliert wurden. Werden kontaminierte Lebensmittel unzureichend erhitzt bzw. kommt es zu einer Kreuzkontamination anderer Lebensmittel, besteht ein sehr hohes Risiko einer Erkrankung (MERILAHTI-PALO et al. 1991). ZHENG und XIE (1996) fanden allerdings in ihrer Untersuchung keinen Beweis dafür, dass Schweine der Grund für eine *Y. enterocolitica* Infektion beim Menschen sind. Die Bioserotypen, die in menschlichen Stuhlproben gefunden wurden, unterschieden sich von denen, die aus tierischem Material isoliert wurden (ZHENG und XIE 1996). STENGEL (1986) sieht die Möglichkeit einer Yersinienübertragung über Wasser als äußerst gering an, da im Wasser nur eine geringe Keimzahl vorkommt. Als Kontaminationsquelle von Lebensmitteln ist Wasser hingegen in Betracht zu ziehen. Die in der Studie von STENGEL (1986) in Oberflächenwasser nachgewiesenen Yersinien gehörten nur den *Y. enterocolitica*-like Bakterien *Y. frederiksenii* und *Y. intermedia* an.

Außer durch Lebensmittel kann sich der Mensch auch durch eine direkte Übertragung mit Yersinien infizieren. So stellt der enge Kontakt zwischen

Haustieren, wie Hund und Katze, und dem Menschen eine weitere mögliche Gefahr für eine Übertragung der Yersiniose dar (WEBER und LEMBKE 1981a, SCHIEMANN 1989), sichere Untersuchungsergebnisse fehlen hierzu aber bislang.

Auch muss bedacht werden, dass in Einzelfällen eine Übertragung durch kontaminierte Blutkonserven erfolgen kann. Diese Infektion verläuft zweifellos gefährlicher als eine Infektion über kontaminierte Lebensmittel (ABER 1990).

#### 1.4 Erkrankungen beim Menschen

*Y. enterocolitica*, dessen größte Bedeutung als pathogener Keim in Lebensmitteln angesehen wird, verursacht beim Menschen vor allem Gastroenteritissymptome mit Durchfall und Fieber, kann aber auch Sekundärsymptome, insbesondere bei älteren Patienten hervorrufen (VARNAM und EVANS 1991). Seltener infiziert sich der Mensch durch Kontakt mit erkrankten Personen oder Tieren (DEDIE et al. 1993), sondern hautsächlich oral-alimentär. Wie bei allen Enteropathogenen wird auch bei der Yersiniose die tatsächliche Infektionsrate um einiges höher sein als die gemeldeten Zahlen (RKI 2003). MERILAHTI-PALO et al. (1991) untersuchten in Finnland das Serum von 146 Angestellten eines Schlachthofes auf spezifische *Yersinia*-Antikörper und fanden einen erhöhten Antikörperspiegel gegen *Y. enterocolitica* O:3 vor allem bei Metzgern, die täglich direkten Kontakt mit dem Geschlinge und den Gedärmen der Schlachtschweine haben.

Die erforderliche Infektionsdosis bei einem gastrointestinalen Verlauf liegt schätzungsweise bei  $3,5 \times 10^9$  (SZITA et al. 1973, ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990), aber Literaturangaben zur Dosis infectiosa minima (DIM) differieren (BORCH et al. 1996, KLEEMANN und BERGANN 1996a). Die Inkubationszeit beträgt (1-) 7-10 Tage und die Erkrankung dauert wenige Tage bis 2 Wochen (HEIN und KNAUFF 1978, NEUBAUER et al. 2001c). Die Erregerausscheidung im Stuhl variiert zwischen 14 und 97 Tagen (KNAPP 1983, COVER und ABER 1989).

*Y. enterocolitica* Bioserotypen, die an einer Erkrankung des Menschen beteiligt sind, gehören meist den Bioserotypen 4/O:3, 2/O:9, 2/O:5,27, 1B/O:8 und 3/O:3 an (KAPPERUD 1991, ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1996). Die Symptome, die mit einer *Y. enterocolitica* Infektion einhergehen, sind von mehreren Faktoren

abhängig, zum einen von den Virulenzeigenschaften des Bioserotyps sowie der Infektionsdosis und zum anderen vom Alter und Gesundheitszustand des Patienten (COVER und ABER 1989, SCHIEMANN 1989, BOTTONE 1999). Ein überaus wichtiger Aspekt bei der möglichen klinischen Verlaufsform ist das Alter des Patienten (Tabelle 4). Vor allem bei Kindern und Kleinkindern treten gastroenteritische Symptome, wie Durchfall und Bauchschmerzen, sowie Mesenteriallymphadenitis auf, während insbesondere Teenager von der Pseudoappendizitis betroffen sind (SWAMINATHAN et al. 1982, KNAPP 1983, ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1996, BOTTONE 1997). Patienten zwischen 20 und 60 Jahren sind hingegen von Arthritis sowie zum Teil von akuten Bauchschmerzen und Durchfall betroffen. Bei Personen über 60 Jahren stehen überwiegend sekundäre immunpathologische Komplikationen wie reaktive Arthritis und Erythema nodosum als klinische Manifestation der Yersiniose im Vordergrund (WORMERS und KEUSCH 1981, SWAMINATHAN et al. 1982, KIESEWALTER 1992, BOTTONE 1997).

**Tabelle 4: Klinisches Bild der Yersiniose in Abhängigkeit vom Alter des Patienten (nach KNAPP 1980, HOOGKAMP-KORSTANJE und DE KONING 1990)**

Klinisches Bild	Bevorzugtes Alter
Enteritis	0-14 Jahre
Pseudoappendizitis	10-40 Jahre
Arthritis	> 15 Jahre
Erythema nodosum	Erwachsene (v.a. Frauen)

Insgesamt gesehen lassen sich die klinischen Erscheinungen der Yersiniose beim Menschen in zwei verschiedene Verlaufsformen einteilen:

- a) Enterale Verlaufsform
- b) Extraintestinale Verlaufsform

Bei der **enteralen Verlaufsform**, die die häufigste Verlaufsform (>70%) der Yersiniose beim Menschen darstellt (HOOGKAMP-KORSTANJE und DE KOENING 1990, ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1996, ZECHNER 2003), beginnt die Erkrankung meist mit Bauchschmerzen, Durchfall und leichtem Fieber, evtl. kommen auch Erbrechen und Übelkeit hinzu. Das Allgemeinbefinden ist in der Regel gestört. Dies ist meist eine selbstlimitierende Erkrankung, die nach wenigen Tagen bis 2 (- 4) Wochen wieder abklingt, so dass eine Chemotherapie selten erforderlich ist. Bei Teenagern sind die Symptome meist auf die rechte Fossa iliaca begrenzt, was häufig mit einer akuten Blinddarmentzündung (Pseudoappendizitis) verwechselt wird (COVER und ABER 1989) und oftmals einen unnötigen chirurgischen Eingriff nach sich zieht. Erwachsene erkranken mit zunehmendem Alter weniger häufig an dieser enteralen Form der Yersiniose. ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL (1996) berichten in ihrer Untersuchung, dass 50% der an Enteritis erkrankten Patienten jünger als 16 Jahre waren, während hingegen nur etwa 8,9% älter als 50 Jahre waren. Dabei war keine Geschlechtsdisposition feststellbar. In einer Studie von LEE et al. (1991) waren 97% der an Yersiniosis erkrankten Patienten Kinder. Eine Pseudoappendizitis trat in Übereinstimmung mit älteren Untersuchungen hauptsächlich bei Jugendlichen auf (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1996).

Bei der **extraintestinalen Verlaufsform** gibt es zum einen den **septikämischen** Verlauf, der zwar relativ selten, dafür aber lebensbedrohlich ist (Letalität bis 50%). Diese Form tritt vor allem bei Kindern und älteren Menschen auf, die aus verschiedenen Gründen wie z.B. einer Leberzirrhose, Alkoholismus, Neoplasien, Blutkrankheiten, Immundefekten oder Diabetes mellitus immunsupprimiert sind (HAHN 1989, SCHIEMANN 1989, ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1996). Die dominierenden Symptome bei der septikämischen Verlaufsform sind Fieber, stark beeinträchtigtes Allgemeinbefinden, Kopf- und Gliederschmerzen, Schüttelfrost und Übelkeit (HEIN und KNAUFF 1987). Auch kontaminierte Blutkonserven stellen eine Gefahr für eine Septikämie bzw. einen Endotoxinschock dar (JACOBS et al. 1989, NEUBAUER et al. 2001c).

Ebenfalls extraintestinal verläuft die **reaktive Arthritis**, die überwiegend Patienten mit dem Histokompatibilitätsantigen HLA-B27 betrifft (HOOGKAMP-KORSTANJE

und DE KONING 1990, MERILAHTI-PALO et al. 1991, BOTTONE 1997). Sie tritt 1-3 Wochen nach einer Infektion mit *Y. enterocolitica* und damit verbundenen gastrointestinalen Störungen auf und heilt erst nach einigen Wochen bis Monaten ab. Als Symptome treten Rötung, Schwellung, Schmerzen, Fieber, Bewegungseinschränkungen und gelegentlich auch seröse Ergüsse auf (DEDIE et al. 1993). Die genaue Pathogenese ist aber noch nicht eindeutig geklärt (NAKTIN und BEAVIS 1999). Im Zusammenhang mit einer durch eine *Y. enterocolitica* Infektion einhergehenden Arthritis wird auch von Morbus Reiter (Oligoarthritis mit Urethritis und Konjunktivitis) berichtet. Die Urease, die vom Bakterium in der akuten Phase produziert wird, spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Arthritis (GRIPENBERG-LERCHE et al. 2000).

**Erythema nodosum**, die sog. Knotenrose, als Folgeerkrankung einer *Y. enterocolitica* Infektion tritt überwiegend bei Frauen mittleren Alters einige Wochen nach der Infektion vor allem an den unteren Extremitäten auf (AHOVEN 1972, KNAPP 1981, DEDIE et al. 1993). Es werden rote, bis 5 cm große, gering erhabene druckschmerzhafte Knoten von teigig derber Konsistenz als Symptomatik beschrieben (PSCHYREMBEL 1994).

Ab und an werden in Einzelfällen auch Lymphadenopathien, Hepatitiden, Glomerulonephritiden, Schilddrüsenerkrankungen, Pharyngitis (ROSE et al. 1987), Myokarditis, Meningitis und Osteomyelitis (CASEY et al. 1987) im Zusammenhang mit einer *Y. enterocolitica* Erkrankung beobachtet (SCHIEMANN 1989, KIESEWALTER 1992, DEDIE et al. 1993).

Eine sichere Diagnose der enteralen Verlaufsform gelingt nur über eine gezielte bakteriologische Untersuchung mit anschließender serologischer und biotypischer Identifizierung sowie einem Nachweis der Pathogenitätsfaktoren, um pathogene von apathogenen Stämmen zu differenzieren.

Die Therapie der Yersiniose ist vom Krankheitsbild abhängig. Eine symptomatische Behandlung empfiehlt sich bei den selbstlimitierenden leichteren Verläufen. Eine Antibiose ist dagegen bei septikämischen Komplikationen indiziert. Das ROBERT-KOCH-INSTITUT schlägt dafür eine Behandlung mit Cotrimoxazol, Tetracyclinen und Quinolonen vor. CROWE et al. (1996) nennen Ciprofloxacin als Mittel der Wahl

bei invasiven Infektionen. Jedoch sollte bei dieser Therapie immer eine Blutkontrolle erfolgen aufgrund einer sich evtl. entwickelnden Leukopenie.

## 1.5 Erkrankungen bei Tieren

Tiere infizieren sich vor allem über eine kontaminierte Umwelt (DEDIE et al. 1993), wobei dies nur selten zu einer Erkrankung führt (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1996, NEUBAUER et al. 2001b). Meist sind tierpathogene Stämme nicht oder nur gering pathogen für den Menschen, wie z.B. Biotyp 5 (VARNAM und EVANS 1991).

### 1.5.1 Schwein

Schweine gelten als Hauptreservoir für die Yersiniose beim Menschen (Kapitel 1.3). Schweine selber sind meist nur asymptomatische Träger. Bei Sauen wird von Fertilitätsstörungen und Aborten berichtet. Eine klinische Yersiniose tritt hauptsächlich nur bei Ferkeln auf. Diese leiden an Enteritiden und Enterokolitiden in Zusammenhang mit Anorexie und Durchfall (NEUBAUER et al. 2001b).

In einer Untersuchung von FUKUSHIMA et al. (1990) sprechen die Ergebnisse für eine horizontale Übertragung von Schwein zu Schwein im Schlachthof durch das Fressen des Kotes infizierter Tiere.

### 1.5.2 Rinder und kleine Wiederkäuer

HAWARI et al. (1981) konnten aus Rinderkot *Y. enterocolitica* O:9 isolieren. Infektionen von kleinen Wiederkäuern durch *Y. enterocolitica* Bioserotyp 5/O:2a, 2b, 3b, c wurden in Europa nachgewiesen (WUTHE und ALEKSIĆ 1997, NEUBAUER et al. 2001b). Auch hier erkranken überwiegend Jungtiere an Durchfall und kümmern. Pathologisch-anatomisch sieht man eine mesenteriale Lymphadenitis und Enterokolitis mit Mikroabszessen (NEUBAUER et al. 2001b).

### 1.5.3 Hunde und Katzen

Pathogene *Y. enterocolitica* Serotypen wie O:3 und O:9 wurden gelegentlich aus Hunden und Katzen isoliert (WEBER und LEMBKE 1981a, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001c). Ähnlich wie beim Menschen tritt bei jungen Hunden bzw. Katzen Durchfall als Symptom auf, während ausgewachsene Tiere asymptomatisch sind (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001c). Die Infektion erfolgt bei diesen

Tieren wahrscheinlich auch durch die Aufnahme von kontaminiertem rohen oder nicht vollständig erhitzen Schweinefleisch (HURVELL 1981, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001c, NEUBAUER et al. 2001b). Die orale Infektionsdosis beträgt etwa  $10^6$  Bakterien bei 4 Monate alten Welpen, bei 1-2jährigen Hunden erhöht sich die Infektionsdosis auf  $10^9$  Bakterien (HAYASHIDANI et al. 1995).

#### 1.5.4 Andere Haustiere

Beim **Chinchilla** lässt sich in Europa vor allem der *Y. enterocolitica* Bioserotyp 3/O:1, 2a, 3 isolieren (MOLLARET et al. 1979, WUTHE und ALEKSIĆ 1992). Die Tiere erkranken an fibrinöser Enterokolitis. Pathologisch-anatomisch lassen sich in Leber, Milz, Lunge und intestinaler Mukosa Granulome feststellen (NEUBAUER et al. 2001b), was an eine *Y. pseudotuberculosis* Infektion erinnert (WUTHE und ALEKSIĆ 1992).

Bei **Kaninchen** und **Feldhasen** wird hauptsächlich der Bioserotyp 5/O:2a, 2b, 3b, c nachgewiesen (MOLLARET et al. 1979, WUTHE und ALEKSIĆ 1997). Auch hier lässt sich pathologisch-anatomisch eine Enterokolitis mit mesenterialer Lymphadenitis und evtl. eine fibrinöse Pleuritis sowie eine granulomatöse Splenomegalie feststellen (NEUBAUER et al. 2001b).

Spezielle Studien über *Y. enterocolitica* Erkrankungen beim **Pferd** bzw. **Nutzgeflügel** liegen nicht vor (NEUBAUER et al. 2001b).

#### 1.6 Antibiotikaresistenz von *Yersinia*-Stämmen

Es ist davon auszugehen, dass die einzelnen Biotypen unterschiedlich auf Antibiotika reagieren (TZELEPI et al. 1999, WHITE et al. 2002). Jedoch gibt es keinen großen Unterschied zwischen menschlichen und tierischen Stämmen hinsichtlich der Antibiotikaempfindlichkeit (PRESTON et al. 1995). Außerdem ist eine ansteigende Antibiotikaresistenz von besonderer Bedeutung (WHITE et al. 2002, CAPILLA et al. 2003), was andere Autoren nicht unbedingt bei *Y. enterocolitica* Isolaten sondern vielmehr bei anderen *Enterobacteriaceae* beobachteten (STOLK-ENGELAAR et al. 1995, PRATS et al. 2000, MAYRHOFER et al. 2004).

*Y. enterocolitica* Isolate bilden häufig eine  $\beta$ -Lactamase A (Breitspektrum-Lactamase) bzw. B (Cephalosporinase) und sind daher meist resistent gegenüber Penicillin, Ampicillin und der ersten Generation Cepahlosporinen (PHAM et al. 2000, STOCK et al. 2000). Gegenüber der dritten Generation Cephalosporinen waren die getesteten *Y. enterocolitica* Stämme alle empfindlich, während andere *Enterobacteriaceae* resistent waren (PHAM et al. 2000, RASTAWICKI et al. 2000). Das Gen für die  $\beta$ -Lactamase B scheint in allen Biotypen von *Y. enterocolitica* vorhanden zu sein (STOCK et al. 2000). Der fehlende Nachweis des Gens für die  $\beta$ -Lactamase A bei einigen Isolaten hängt nach Ansicht von STOCK et al. (2000) wahrscheinlich mit der Nachweismethode und den benutzten Primern zusammen, so dass die Autoren davon ausgehen, dass alle *Y. enterocolitica* Stämme die Gene für die A als auch die  $\beta$ -Lactamase B besitzen und sich vielmehr nur die Expression dieser Enzyme bei den jeweiligen Stämmen unterscheidet.

In einer Untersuchung von PHAM et al. (1991) waren alle getesteten 100 Isolate von *Y. enterocolitica* empfindlich gegenüber Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Gentamicin, Tetrazyklin und Trimethoprim. Isolate des Biotyps 3 wiesen alle eine Empfindlichkeit gegenüber Ticarcillin auf, während Biotypen der Gruppe 1A und 4 resistent waren (BOTTONE 1999). Auch FUNK et al. (2000) wiesen eine Empfindlichkeit der 181 getesteten *Y. enterocolitica* Isolate gegenüber Sulfamethoxazole/Trimethoprim, Enrofloxazin, Aminoglykosiden und Nitrofurantoin nach. Die Isolate waren gegenüber Tetrazyklinen unterschiedlich empfindlich. Die Isolate zeigten sich resistent gegenüber Penicillin, Ampicillin, Ticarcillin, Makroliden und Tiamulin (FUNK et al. 2000). Ähnliche Ergebnisse liefern auch STOLK-ENGELAAR et al. (1995), wo alle getesteten 350 *Y. enterocolitica* Isolaten resistent waren gegenüber Amoxicillin und die meisten gegenüber den Makroliden (Erythromycin 98%, Clarithromycin 97%, Azithromycin 50%). Alle untersuchten Isolate waren empfindlich gegenüber Quinolonen, Cotrimoxazol, Piperacillin, Aminoglykosid (STOLK-ENGELAAR et al. 1995). Vergleichbare Ergebnisse über die Antibiotikaresistenz von *Y. enterocolitica* brachten auch andere Autoren (RAEVUORI et al. 1978, PRESTON et al. 1995, PRATS et al. 2000).

STOCK und WIEDEMANN (1999) belegen mit ihrer Untersuchung, dass keine allgemeingültige Aussage über die Empfindlichkeit von *Y. enterocolitica* gegenüber

Penicillin, Cephalosporinen, Fosfomycin und Trimethoprim abgegeben werden kann, da einzelne Biotypen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika aufweisen können. RASTAWICKI et al. (2000) stellten keinen signifikanten Unterschied zwischen Plamid-positiven und Plasmid-negativen *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämmen im Hinblick auf die Antibiotikaempfindlichkeit fest, außer bei Chloramphenicol, wogegen Plasmid-positive Stämme empfindlicher waren.

MAYRHOFER et al. (2004) konnten bei *Y. enterocolitica* Isolaten im Gegensatz zu *Campylobacter*, *Salmonella* und pathogenen *Escherichia coli* nur eine geringe Antibiotikaresistenz gegenüber den getesteten Antibiotika feststellen. STOCK und WIEDEMANN (2003) untersuchten die natürliche Empfindlichkeit von den *Y. enterocolitica*-like Bakterien *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* und *Y. rohdei* gegenüber 70 Antibiotika.

## 2 Nachweis von Yersinien

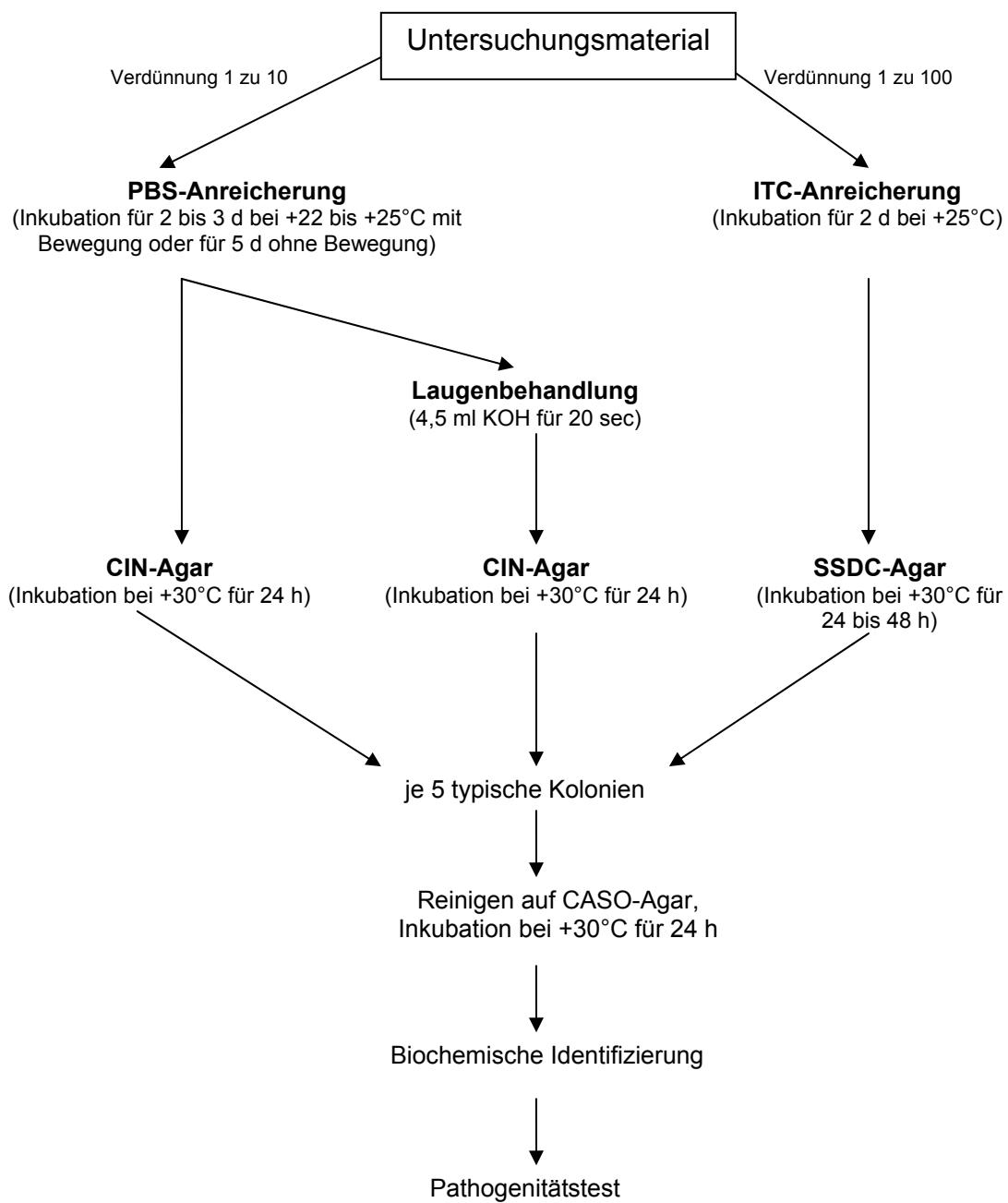
Der Nachweis von *Y. enterocolitica* Keimen aus Lebensmittel- und Umweltproben gestaltet sich aufgrund der meist kleinen Keimzahl in den Proben schwierig. Hinzu kommt noch die im Vergleich zur Begleitflora relativ langsame Wachstumsrate der Yersinien und der damit verbundenen schnellen Überwucherung durch die Begleitflora (HEAD et al. 1982, JIANG et al. 2000, HUSSEIN et al. 2001). Aber auch aufgrund der Heterogenität von *Y. enterocolitica* kann ein Nachweis negativ ausfallen, da einzelne Bioserotypen oft unterschiedlich auf die in den Medien enthaltenden Selektivfaktoren reagieren und unterschiedliche Anforderungen an die Nährmedien stellen (SCHIEMANN 1982, VARNAM und EVANS 1991, TOORA et al. 1994). BHADURI et al. (1997) bemängeln, dass die Anreicherungsverfahren das Vorhandensein plasmidhaltiger virulenter *Y. enterocolitica* Stämme nicht explizit aufzeigen.

Eine direkte Isolierung ist aufgrund der vorgenannten Probleme selten erfolgreich. Nur wenn von einem Zellgehalt über  $10^6$  KbE/g, wie etwa bei klinischen Proben, ausgegangen werden kann, kann ein Direktausstrich versucht werden (VAN PEE und STRAGIER 1979, NAKTIN und BEAVIS 1999). Bei Proben von rekonvaleszenten Patienten bzw. symptomlosen Dauerausscheidern aber auch und insbesondere bei Lebensmittelproben werden flüssige Voranreicherungen empfohlen (SCHIEMANN 1982, ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990, DE BOER 1992), um die Zahl vorhandener *Yersinia* Keime zu erhöhen.

Derzeit gibt es in Europa kein einheitliches Standardverfahren für die Isolierung und Identifizierung von *Y. enterocolitica*. Es wird von der Internationalen Organisation zur Standardisierung (ISO) für die Anreicherung und Identifizierung pathogener *Y. enterocolitica* Stämme zum einen die ISO/DIS 10273:2003 (Abbildung 1) als Referenzmethode empfohlen, die eine Anreicherung in der Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Bouillon vorsieht. Zum anderen wird auch eine Methode des Nordic Committee on Food Analysis (NCFA 1996) vorgeschlagen, die meist in den skandinavischen Ländern Anwendung findet. Dabei wird eine dreiwöchige Kälteanreicherung mit einer Selektivanreicherung in modifizierter Rappaportbouillon kombiniert.

Da es derzeit aber kein einziges Nachweisverfahren auf dem Markt gibt, das alle pathogenen Bioserotypen von *Y. enterocolitica* nachweisen kann, wird von mehreren Autoren (SCHIEMANN 1982, STENGEL 1986, DE BOER und SELDAM 1987, WAUTERS et al. 1988, COX et al. 1990, ALDOVÁ et al. 1990, KWAGA et al. 1990, VARNAM und EVANS 1991, DE BOER 1992, DE BOER 1995, JIANG et. al 2000) empfohlen, für die Isolierung zwei verschiedene Anreicherungen parallel anzusetzen, gefolgt vom Ausstreichen auf zweierlei festen Medien. Die Auswahl einer geeigneten Nachweismethode hängt von dem zu suchenden Bioserotyp sowie von der Probe ab (DE BOER 1995). Die Probenmenge spielt ebenfalls eine gewisse Rolle für den Erfolg eines Nachweisverfahrens. So erhöhten DE BOER und SELDAM (1987) die Probenmenge von 0,2 g auf 10 g/100 ml Bouillon und erzielten damit höhere Isolierungsraten.

**Abbildung 1: Internationales Standardverfahren (ISO 10273:2003) zum Nachweis mutmaßlicher pathogener *Y. enterocolitica***



## 2.1 Anreicherungsverfahren

Bei stark kontaminierten Ausgangsproben von Lebensmittel-, Umwelt- und klinischen Proben ist ein vorhergehendes Anreicherungsverfahren notwendig (VARNAM und EVANS 1991, DEDIE et al. 1993).

Es stehen zahlreiche Anreicherungsverfahren zur Verfügung. Grundsätzlich unterscheidet man dabei zwischen einer nichtselektiven, einer wenigselektiven und einer selektiven Anreicherung. Meist wird die Fähigkeit von *Y. enterocolitica* ausgenutzt, bei niedrigen Temperaturen (0 bis +5°C) zu wachsen. Gleichzeitig ist bei diesen Temperaturen die Wachstumsrate der Begleitflora herabgesetzt (SCHIEMANN 1989, DE BOER 1992). In diesem Zusammenhang berichtet KOUNEV (1989), dass eine Inkubation bei +25°C einer Kälteanreicherung vorzuziehen ist, da eine Anreicherung bei +4°C die beschädigten Zellen zusätzlich stresst.

### 2.1.1 Nichtselektive und wenigselektive Anreicherungen

Eine Inkubation bei niedrigen Temperaturen ermöglicht es den Yersinien, höhere Kolonienzahlen zu erreichen bevor die Dichte der Begleitflora bzw. „metabolic crowding“ (SCHIEMANN und OLSON 1984) einschränkend wirkt (SCHIEMANN 1989). Anfangs wurde eine **nichtselektive Kälteanreicherung** bei +4°C für 21-28 d in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) versucht, die aber eine lange Inkubationszeit voraussetzt und nur eine sehr geringe Selektivität aufweist (EISSL 1975, VARNAM und EVANS 1991, DE BOER 1992). Die Kälteanreicherung in PBS wurde von vielen Autoren für die Isolierung von *Y. enterocolitica* aus Lebensmittelproben ebenso wie aus klinischen und Umweltproben benutzt (WALKER und GILMOUR 1986, FUNK et al. 1998, FUNK et al. 2000, HUSSEIN et al. 2001).

Zu den **wenigselektiven Anreicherungen** zählt die Kälteanreicherung in phosphatgepufferter Salzlösung supplementiert mit zusätzlich 1% Sorbitol und 0,15% Gallensalzen (MEHLMAN et al. 1987), die überaus geeignet ist für die Isolierung der meisten Serotypen von *Y. enterocolitica* (VAN PEE und STRAGIER 1979, DE BOER 1992).

Der größte Nachteil der Kälteanreicherung liegt in der langen Inkubationszeit (bis zu 3 Wochen), was für die Routineuntersuchung von Lebensmitteln nicht geeignet ist. Einige Autoren berichteten, dass dieselben Ergebnisse erzielt werden können, wenn man bei einer höheren Inkubationstemperatur von +25° (DOYLE und HUGDAHL 1983) bzw. +15°C (SCHIEMANN und OLSON 1984) nur zwei Tage lang bebrütet. WEBER und LEMBKE (1981b) empfehlen, dass bei einer 3-wöchigen Kälteanreicherung bereits nach sieben und nach vierzehn Tagen die Proben auf einem festen Nährmedium ausgestrichen werden sollen, da in ihrer Untersuchung einige der vorher positiven Proben nach drei Wochen ein negatives Ergebnis aufwiesen. SHAYEGANI et al. (1983) konnten 53% der Serotypen O:8 mittels einer Kälteanreicherung nach nur ein bis drei Wochen isolieren. VAN NOYEN et al. (1980) und FUNK et al. (1998) bemerken in ihren Studien, dass bei einer Kälteanreicherung vermehrt apathogene *Y. enterocolitica* Stämme angereichert werden. Des Weiteren werden bei einer Kälteanreicherung von Lebensmittelproben, aber auch von Umweltproben die Yersinien häufig von den ebenfalls psychotrophen Pseudomonaden überwuchert (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990, DEDIE et al. 1993). Diese Überwucherung versucht man, z.B. durch eine nachfolgende anaerobe Bebrütung der Agarplatten zu verhindern (BOCKEMÜHL et al. 1979), wie etwa beim BABY 4 Agar (Kapitel 2.3).

## 2.1.2 Selektive Anreicherung

Um den Yersinien ein besseres Wachstum zu ermöglichen, wurden verschiedene selektive Anreicherungen entwickelt (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Selektivanreicherungsverfahren**

Selektivanreicherung	Temperatur	Zeit	nachweisbare Serotypen	Quelle
ITC	+24°C	48 h	O:3	WAUTERS et al. (1988)
MRB	+22 bis +29°C	48 h	O:3, O:9	WAUTERS (1973)
BOS	+22°C	5 d	O:8	SCHIEMANN (1982)
TSPN	+18°C	3 d	O:3, O:8, O:9	LANDGRAF et al. (1993)
Selenit-Malachitgrün-Carbencillin	+22°C	2-3 d	O:3, O:8	LEE et al. (1980)
LB-BSI	+12°C	3 d	O:3, O:8, O:5,27, O:13	BHADURI et al. (1997)

ITC	Irgasan Ticarcillin Kaliumchlorat
MRB	modifizierte Rappaport Bouillon
BOS	Bile Oxalate Sorbose
TSPN	Tryptose-Soja-Bouillon
LB-BSI	Luria-Bertai-Bile Salts Irgasan

Die **ITC**-Anreicherung, die als Selektivfaktoren Irgasan, Ticarcillin und Kaliumchlorat enthält, wurde von WAUTERS et al. (1988) vor allem für die Isolierung von *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 entwickelt. In Evaluierungsstudien zeigte sich, dass Stämme des Serotyps O:9 mit der ITC-Anreicherung nur vereinzelt isoliert werden konnten, da die Stämme nach 48 h Inkubation ein schwächeres Wachstum im Vergleich zu Stämmen von O:3 aufwiesen (DE ZUTTER et al. 1994). Dieses verminderte Wachstum ist auf die hohe Konzentration

von Kaliumchlorat (1 g/l) zurückzuführen, da diese weit oberhalb der minimalen Hemmkonzentration für Serotyp O:9 liegt (DE ZUTTER et al. 1994). KWAGA et al. (1990) konnten in ihrer Vergleichsstudie neben *Y. enterocolitica* O:3 auch die Serotypen O:1,2,3 und O:5,27 mittels einer Anreicherung in ITC nachweisen.

Als Selektivfaktoren sind in der **modifizierten Rappaport Bouillon** (MRB) Carbencillin, Malachitgrün und Magnesiumchlorat enthalten. Diese Anreicherung für 2 bis 3 Tage ist geeignet für den Nachweis insbesondere der Serotypen O:3 und O:9 aus Kotproben und Schweinezungen (WAUTERS et al. 1973, DE BOER und SELDAM 1987), wenn nur eine geringe Hintergrundflora gegeben ist (VAN PEE und STRAGIER 1979). Auch andere Autoren (OOSTEROM 1979, SCHIEMANN 1983b, WALKER und GILMOUR 1986) wiesen in ihren Studien darauf hin, dass einige Stämme von *Y. enterocolitica*, wie z.B. 2/O:5,27 und 1B/O:8 in der MRB in ihrem Wachstum gehemmt werden. SCHIEMANN (1982, 1983b) berichtet im Gegensatz zu WAUTERS et al. (1988), dass durch das enthaltene Carbencillin selbst einige Stämme von *Y. enterocolitica* O:3 gehemmt werden. WEBER und LEMBKE (1981b) betonen, dass die Carbencillinlösung möglichst frisch hergestellt werden muss, um ein einwandfreies Funktionieren der MRB zu garantieren.

Eine Anreicherung in **Bile Oxalate Sorbose** (BOS)-Bouillon scheint eine sehr effektive Methode für das Auffinden von *Y. enterocolitica* 1B/O:8 Stämmen zu sein (SCHIEMANN 1982, SCHIEMANN 1983b, WALKER und GILMOUR 1986, DE BOER 1992). Dagegen wachsen hier Stämme des Serotyps O:5,27 nur schwach (SCHIEMANN 1982). Durch die Zugabe von 2,5% NaCl kann das Wachstum des Serotyps O:5,27 erhöht werden. Einige andere Stämme, darunter auch O:3, sind wiederum sensitiv gegenüber dieser Salzzugabe (SCHIEMANN 1982). Daher sollte BOS sowohl unter Zugabe von 2,5% NaCl als auch ohne diese Zugabe verwendet werden (VARNAM und EVANS 1991). Stämme des Serotyps O:3 benötigen in BOS eine längere Anreicherungszeit bei niedrigerer Temperatur (SCHIEMANN 1983b).

LANDGRAF et al. (1993) modifizierten die **Tryptose-Soja-Bouillon** durch Zugabe von **Polymyxin** (5 IU/ml) und **Novobiocin** (10 µg/ml) (TSPN). Diese Selektivanreicherung ist geeignet für die Isolierung von *Y. enterocolitica* und verwandten Spezies aus Milch bei einer Inkubation bei +18°C für drei Tage. Bei

roher Milch treten jedoch einige Schwierigkeiten aufgrund der starken psychotrophen und mesophilen Begleitflora auf (LANDGRAF et al. 1993).

Die **Selenit-Malachitgrün-Carbencillin** wurde von LEE et al. (1980) für den Nachweis von Yersinien in Fleisch entwickelt. Es können mit diesem Medium sowohl *Y. enterocolitica* O:3, als auch O:8, nach einer 2-3-tägigen Anreicherung isoliert werden (LEE et al. 1980).

Mit einer Anreicherung in **Luria-Bertai-Bile Salts Irgasan** (LB-BSI) können plasmidenthaltende virulente Stämme von *Y. enterocolitica* O:3, O:8, O:5,27 und O:13 nachgewiesen werden (BHADURI et al. 1997). Hier wird Irgasan erst nach einer anfänglichen 24-stündigen Inkubation bei +12°C zugegeben, da dadurch bessere Ergebnisse erzielt wurden. Die Kulturen werden dann für weitere 48 h bei +12°C inkubiert (BHADURI et al. 1997, HUSSEIN et al. 2001).

### 2.1.3 Zweistufige Anreicherungsverfahren

Die zweistufige Anreicherung von SCHIEMANN (1982) sieht vor, dass durch eine erste gering selektive Voranreicherung in **Hefeextrakt-Bengalrosa** (YER)-Bouillon sich die beschädigten bzw. gestressten Zellen regenerieren und kleine Ausgangskeimmengen vermehren können. Durch die anschließende selektive **BOS**-Anreicherung wird die Begleitflora unterdrückt. Vor allem Serotyp O:8 kann mit dieser Methode nach 6 Tagen Anreicherung gut nachgewiesen werden (SCHIEMANN 1982). KWAGA et al. (1990) konnten in ihrer Vergleichsstudie mittels der Zweistufenanreicherung (YER/BOS) nur apathogene Serotypen aus Schweinefleischprodukten isolieren. In dieser Vergleichsuntersuchung wurde die Zweistufenanreicherung ersetzt mit einer Anreicherung in ITC, wodurch die Autoren zwar weniger Keime an der Zahl, dafür aber hauptsächlich pathogene Stämme isolierten.

Eine Anreicherung in MRB erzielt gute Ergebnisse beim Nachweis von *Y. enterocolitica* O:3, wenn vorher eine Kälteanreicherung in nicht selektiver PBS-Bouillon durchgeführt wird (SCHIEMANN 1980).

## 2.2 Alkalibehandlung

Eine **Alkalibehandlung** der Probe mit einer 0,5%igen Kaliumhydroxid (KOH) - Lösung nach der Anreicherung und vor dem Überimpfen auf Agarplatten erzielt häufig bessere Ergebnisse (DOYLE et al. 1981, DE BOER et al. 1982, WEISSFELD und SONNENWIRTH 1982, SCHIEMANN 1982, DE BOER und SELDAM 1987, DE BOER 1992, WALKER und BROOKS 1993, DE BOER 1995, KLEEMANN und BERGANN 1996a, LOGUE et al. 1996), da Yersinien eine bessere Alkalitoleranz aufweisen als viele andere *Enterobacteriaceae* und die Hintergrundflora durch die KOH-Lösung stark reduziert wird (AULISIO et al. 1980). DE BOER et al. (1982) konnten in ihrer Untersuchung feststellen, dass durch eine Alkalibehandlung ein Großteil der *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und anderer Nicht-Yersinien in ihrem Wachstum zurückgedrängt wurden. Auch LOGUE et al. (1996) und NEUBAUER et al. (2001a) bestätigen, dass schon eine Behandlung mit einer 0,25%igen Kalilauge die Begleitflora reduzieren kann. Diese Alkalitoleranz der Yersinien kann aber durch Faktoren wie Medium, verwendete Temperatur und die jeweilige Wachstumsphase der Keime beeinträchtigt werden (SCHIEMANN 1983a), so dass eine spezifische Behandlungszeit nicht genannt werden kann (WEAGANT und KAYSNER 1983). Daher sollte parallel zu einer Alkalibehandlung auch ein Ausstrich ohne vorherige Alkalibehandlung durchgeführt werden, da einige Stämme Alkali-sensitiv sind (WALKER und BROOKS 1993). KHARE et al. (1996) sahen in ihrer Studie bei der Untersuchung von Fisch, Fleisch und Fleischprodukten keinen Vorteil einer Alkalibehandlung. Auch FUKUSHIMA (1985) konnte nach einer KOH-Behandlung keine pathogene Yersinien in Schweinefleischproben nachweisen, wenn diese mit weniger als  $10^4$  KbE/g künstlich beimpft wurden. Dennoch sieht FUKUSHIMA (1985) in einer direkten KOH-Behandlung eine gute Möglichkeit, Yersinien nachzuweisen, wenn mehr als  $10^2$  KbE/g in der Probe enthalten sind.

## 2.3 Selektivnährböden

Anfangs wurden für die Isolierung von *Y. enterocolitica* aus klinischen Proben sowie aus Lebensmittelproben verschiedene Selektivnährböden verwendet, die ursprünglich für andere Enteropathogene entwickelt wurden (NILÉHN 1969,

SCHIEMANN 1979), wie z.B MacConkey-Agar, Desoxycholat-Citrat (DC) Agar (SZITA und SVIDRÓ 1976), Hektoen Agar (KING und METZGER 1968), Wismut-Sulfit Agar (HANNA et al. 1977a), Laktose-Saccharose-Urea (LSU) Agar (AHVONEN 1972, EISS 1975) und Salmonella-Shigella (SS) Agar (VARNAM und EVANS 1991). Auch wenn Yersinien auf diesen Routinemedien wie MacConkey und SS gut wachsen, ist deren Morphologie ziemlich unspezifisch. Bei einer starken Begleitflora werden Yersinien sehr leicht übersehen bzw. verwechselt (VAN PEE und STRAGIER 1979, DE BOER und SELDAM 1987). Später wurden diese vorhandenen Nährböden modifiziert, um einen besseren Nachweis von *Y. enterocolitica* Keimen zu erreichen, oder es wurden speziell für die Isolierung von *Y. enterocolitica* Keimen neue Nährböden (Tabelle 6) entwickelt.

**Tabelle 6: Selektivnährböden mit der jeweiligen Bebrütungstemperatur und –dauer zum Nachweis von *Y. enterocolitica***

Medium	Temp	Dauer	Autor
<b>CIN</b>	+32°C	24 h	SCHIEMANN (1979)
<b>SSDC</b>	+25-29°C	48 h	WAUTERS (1973)
<b>TYE</b>	+32°C	24 h	FUKUSHIMA (1987)
<b>BABY 4</b>	+29°C	48 h anaerob 24 h aerob	BERCOVIER et al. (1984)
<b>KV 202</b>	+32°C	24 h	VICHENROJ und FUNG (1996)
<b>CAL</b>	+25°C	40 h	DUDLEY und SHOTTS (1979)
<b>MacConkey Agar mit Tween 80</b>	+25°C	48 h	LEE (1977a)
<b>Desoxyribonuclease Agar mit Sorbit und Tween 80</b>	+25°C	48 h	LEE (1977a)
<b>RAM</b>	+22°C	48 h	SHEHEE und SOBSEY (2004)
<b>DYS Agar</b>	+23°C	24-36 h	AGBONLAHOR et al. (1982)
<b>„Y“-Medium</b>	+29°C	48 h	SOLTESZ et al. (1980)

Der **Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin** (CIN) Agar wurde speziell für die Isolierung von *Y. enterocolitica* entwickelt (SCHIEMANN 1979) und wird derzeit aufgrund seiner Selektivität als der Beste der momentan auf dem Markt erhältlichen Nährböden angesehen. Er kann für die Isolierung von *Y. enterocolitica* aus Lebensmittelproben (HARMON et al. 1983, WALKER und GILMOUR 1986, DE BOER und SELDAM 1987, ALDOVÁ et al. 1990, COX et al. 1990, KHARE et al. 1996, KLEEMANN und BERGANN 1996a, KLEEMANN und BERGANN 1996b), aus klinischen Proben (HEAD et al. 1982, DAVEY et al. 1983, HARMON et al.

1983, WEBER et al. 1983) und aus Wasserproben (SCHINDLER 1984, STENGEL 1986) verwendet werden.

Auf diesem Agar bilden *Yersinia* Stämme rote Kolonien, da Mannit verstoffwechselt wird und durch den Indikator Neutralrot die somit entstehende pH-Wertsenkung angezeigt wird. Diese sogenannten „bull's eye“-Kolonien weisen ein dunkelrotes Zentrum und einen scharfen Rand auf, umgeben von einer transparenten äußeren Zone (SCHIEMANN 1979). CIN-Agar ermöglicht einen Nachweis von Yersinien innerhalb 24 h bei einer Inkubation bei +32°C. Durch das Antibiotikum Cefsulodin, das im CIN-Agar mit einer Konzentration von 15 mg/l enthalten ist, werden *Pseudomonas aeruginosa* Keime in ihrem Wachstum gehemmt. Auch *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Proteus mirabilis* Stämme (Tabelle 7) werden auf CIN-Agar durch die zusätzlichen Hemmstoffe wie Novobiocin und Irgasan gehemmt (SCHIEMANN 1979).

*Serratia*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas* und *Proteus* Stämme zeigen auf CIN-Agar eine ähnliche Kolonienmorphologie wie *Y. enterocolitica* und können dadurch evtl. mit Yersinien verwechselt werden (SCHIEMANN 1979, DEVENISH und SCHIEMANN 1981, HEAD et al. 1982, DE BOER und SELDAM 1987, FUKUSHIMA 1987, JIANG et al. 2000). DEVENISH und SCHIEMANN (1981) beschreiben CIN-Agar als hochspezifisches Medium, dem nur noch eine Bestätigung der verdächtigen Kolonien mittels Kligler Eisen-Agar und Urea-Schrägagar folgen muss.

**Tabelle 7: Selektivität von CIN-Agar gegenüber gramnegativen Bakterien (nach SCHIEMANN 1979)**

Keim	Anzahl getesteter Stämme	Anzahl der nachgewiesenen Stämme (+32°C 24h)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	1
<i>Citrobacter freundii</i>	3	2
<i>Escherichia coli</i>	11	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	0
<i>Proteus mirabilis</i>	6	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	5	5
<i>Serratia marcescens</i>	1	1

In einer Untersuchung von FUKUSHIMA und GOMYODA (1986) wurde gezeigt, dass die meisten Stämme von *Y. enterocolitica* Bioserotyp 3B/O:3 auf CIN-Agar gehemmt werden. Auch HARMON et al. (1983) bestätigten, dass *Y. enterocolitica* O:12,25 auf CIN leicht gehemmt wurden. Der größte Nachteil von CIN-Agar besteht allerdings darin, dass virulente *Y. enterocolitica* Kolonien (z.B. Bioserotypen 1/O:8, 2/O:5,27 und 2/O:9) nicht eindeutig von apathogenen *Yersinia* spp. differenziert werden können (FUKUSHIMA 1987).

Hilbert et al. (2003) modifizierten CIN-Agar mit einem Überzug aus 0,25% Agarose in 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, das 1% w/v Urea und 0,25% w/v Bromkresolrot enthält. Nach einer kurzen Inkubation von 5-10 Minuten bei Raumtemperatur zeigen Urease-positive Kolonien ein violettblaues Aussehen, während sich Urease-negative Kolonien gelb bis rötlich anfärben (HILBERT et al.

2003). *Morganella morganii* und *Citrobacter freundii* Keime haben auf diesem modifizierten CIN-Agar ein ähnliches Erscheinungsbild wie *Y. enterocolitica*, können aber anhand ihres größeren Koloniedurchmessers unterschieden werden (HILBERT et al. 2003).

Auch der modifizierte **Salmonella-Shigella** Agar mit **Natriumdesoxycholat** und **Calciumchlorid** (SSDC) wird neben CIN-Agar sehr gerne für Untersuchungen auf *Y. enterocolitica* benutzt (DE BOER 1992). *Y. enterocolitica* wachsen darauf als farblose Kolonien. Durch die enthaltenen Selektivfaktoren wie Natriumdesoxycholat, Gallensalzen und Brillantgrün werden die Begleitkeime in ihrem Wachstum unterdrückt (MERCK 2002). Jedoch können *Morganella*, *Proteus*, *Serratia* und *Aeromonas* spp. ebenfalls auf SSDC wachsen und somit eine eindeutige Differenzierung der Yersinien erschweren (DE BOER 1992).

CIN-Agar und SSDC-Agar sind die einzigen Nährböden, die kommerziell erhältlich und leicht herzustellen sind.

Der **Virulent Y. enterocolitica** Agar (VYE) wurde von FUKUSHIMA (1987) entwickelt, um pathogene Stämme von *Y. enterocolitica* von apathogenen Bioserotypen unterscheiden zu können. Als Selektivfaktoren werden diesem neben Cefsulodin (4 mg/l) und Irgasan (4 mg/l) auch noch Josamycin (20 mg/l) und Oleandomycin (10 mg/l) zugesetzt (FUKUSHIMA 1987). Pathogene Stämme von *Y. enterocolitica* bilden darauf nach 24 h typischerweise rote Kolonien, wohingegen apathogene Stämme aufgrund der Äskulinhydrolyse dunkle Kolonien mit einer dunklen peripheren Zone bilden. *Citrobacter freundii* und *Enterobacter agglomerans*, die auf CIN-Agar ein großes Problem der Differenzierung darstellen, da sie Mannit positiv sind, können anhand ihrer Größe leicht von virulenten *Y. enterocolitica* Kolonien unterschieden werden. *Klebsiella pneumoniae* und Serratien wachsen aufgrund der Mannitfermentation als dunkelpinke oder violette Kolonien, während Pseudomonaden wegen der fehlenden Mannitfermentation transparent erscheinen. Weitere Äskulinpositive Keime zeigen eine periphere dunkle Zone (FUKUSHIMA 1987). VYE Agar ist besonders für den Nachweis von *Y. enterocolitica* Biotyp 3B Serotyp O:3 geeignet, da dieser Bioserotyp, wie in einer Untersuchung von FUKUSHIMA und GOMYODA (1986) herausgefunden wurde, auf CIN-Agar in seinem Wachstum gehemmt wird. Der VYE Agar ist aber

kommerziell nicht erhältlich und muss zeitaufwendig hergestellt werden (ZECHNER 2003).

BERCOVIER et al. (1984) entwickelten das sog. **BABY 4** Medium, das für die Untersuchung von Umweltproben auf *Y. enterocolitica* herangezogen werden kann. BABY 4 muss für die ersten 48 h anaerob bebrütet werden, um die obligat aeroben Begleitkeime zu unterdrücken. Danach werden für weitere 24 h aerob. *Enterobacteriaceae* spp. mit einer Typ-A-Nitratreduktase werden auf BABY 4 wegen dem Zusatz von Kaliumchlorat (0,8 g/l) gehemmt, nicht dagegen Keime mit einer Typ-B-Nitratreduktase wie z.B. Yersinien. Des Weiteren können nur wenige Keime mit einer Typ-B-Nitratreduktase die im Agar enthaltene Sorbose (10 g/l) verstoffwechseln. Sorbosepositive Keime bilden auf BABY 4 rote Kolonien. *Klebsiella oxytoca* kann durch sein schleimiges Wachstum und *Citrobacter diversus* anhand seiner Größe von *Yersinia* Kolonien unterschieden werden. Aufgrund der 3-tägigen Bebrütung der BABY 4 Agarplatten ist dieser Agar nicht für eine schnelle Routinediagnostik bei klinischen Proben geeignet (BERCOVIER et al. 1984).

VICHIENROJ und FUNG (1996) entwickelten einen farbenthaltenden Agar, **KV202**. *Y. enterocolitica* (v.a. O:3, O:8 und O:9) bilden hellgelbe Kolonien, während die gelblichen Kolonien von Serratien und Enterobacter eine schwarze Zone um die jeweiligen Kolonien aufweisen und die ebenfalls gelblichen Kolonien von Salmonellen eine rote Zone (JIANG 2000).

Auf **Cellobiose-Arginin-Lysin** Agar (CAL), der von DUDLEY und SHOTTS (1979) entwickelt wurde, wachsen *Y. enterocolitica* Kolonien burgunderrot mit einem Durchmesser von 0,5 bis 2,0 mm, gelegentlich auch klar mit rotem Zentrum mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1,0 mm. *Y. enterocolitica* fermentieren die enthaltene Cellobiose, wodurch sich der pH senkt und der Indikator Neutralrot den Kolonien die rote Farbe verleiht (DUDLEY und SHOTTS 1979). CAL-Medium weist aber keine Selektivität auf (HEAD et al. 1982). Somit ist dieser Agar nur nützlich, wenn keine zu große Zahl störender Begleitkeime vorhanden ist, da ansonsten die zur Differenzierung wichtige Farbentwicklung gehemmt wird (HEAD et al. 1982, HARMON et al. 1983).

Auf **MacConkey mit Tween80** (LEE 1977a) können Yersinien von anderen Laktose-negativen Kolonien als weiße rauhe Kolonien unterschieden werden, umgeben von einer hellen Zone. Die nachgewiesenen Kolonien sind jedoch für gewöhnlich apathogen (DE BOER und SELDAM 1987). Auch erschweren schwärzende *Proteus* Kolonien den Nachweis von *Y. enterocolitica* Kolonien sehr (DE BOER und SELDAM 1987). Auf MacConkey Agar können zwar *Y. enterocolitica* Kolonien sehr gut wachsen, aber dieser Agar weist nur eine geringe Selektivität auf (SCHIEMANN 1979).

Der von SHEHEE und SOBSEY (2004) entwickelte modifizierte **MacConkey Agar** wird mit 1% **L-Rhamnose** und 1% **D-Arabinol** supplementiert (RAM). Dieser Agar ermöglicht eine Differenzierung pathogener *Y. enterocolitica* Stämme von Umweltstämmen mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 97,4%. Gemäß Untersuchungen von CIEBIN et al. (2001) kann eine negative Verstoffwechslung von 1% D-Arabinol ein einfaches Kriterium für den Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* Stämme darstellen. Auch L-Rhamnose hilft, pathogene von apathogenen Stämmen zu unterscheiden. Dieser Agar wurde bisher allerdings nur an Bioserotyp 4/O:3 getestet (SHEHEE und SOBSEY 2004).

AGBONLAHOR et al. (1982) entwickelten das sogenannte **DYS-Medium** für die Isolierung von *Y. enterocolitica* aus Stuhlproben. *Y. enterocolitica* kann die im Medium enthaltene Arabinose verstoffwechseln, was durch den Indikator Neutralrot zu einer hellroten Verfärbung der Kolonien führt. *Proteus* Kolonien dagegen können keine Arabinose fermentieren und sind daher klar. *E.coli*, einige *Klebsiella* spp. und *Shigella boydii* können Arabinose ebenfalls fermentieren und erscheinen daher nach 24 h rot, aber durch den Zusatz von Lysin und Arginin im Medium werden diese Kolonien nach 24 bis 36 h weißorange. Dies basiert auf dem alkalischen Abbau dieser Bestandteile, was wiederum den sauren pH von der Arabinosefermentation neutralisiert. Grampositive Bakterien werden durch den hohen Gehalt an Gallensalzen (8,5 g/l) gehemmt (AGBONLAHOR et al. 1982).

Das „**Y**“-Medium wurde von SOLTESZ et al. (1980) beschrieben. Die Selektivität dieses Mediums geht zurück auf die Zugabe von Natrium-Oxalat, Natriumdesoxycholat und Gallensalzen. Ersteres hemmt das Wachstum vieler gramnegativer Keime, während Gallensalze grampositive Keime hemmen sollen.

Die Kolonien, die dennoch auf diesem Agar wachsen können, werden aufgrund der Fermentation der Laktose unterschieden (SOLTESZ 1980). In einer Vergleichsstudie von HEAD et al. (1982) zeigte sich aber, dass die Kombination der oben genannten Selektivfaktoren zu selektiv für die getesteten *Y. enterocolitica* Stämme waren. Auch in einer anderen Untersuchung erbrachte dieser Nährboden ohne eine vorhergehende zeitaufwendige Kälteanreicherung keine sicheren Ergebnisse (WEISSFIELD und SONNENWIRTH 1980).

## 2.4 Kombination aus Anreicherung und Selektivnährboden

Für eine optimale Isolierung pathogener *Y. enterocolitica*, vor allem wenn sie nur in geringer Zahl in einer Probe vorhanden sind, wird die Kombination geeigneter Anreicherungsverfahrens gefolgt vom Ausstreichen auf ein selektives festes Nährmedium empfohlen (HARMON et al. 1983).

Befürwortet wird vor allem eine vorhergehende Kälteanreicherung in PBS gefolgt von einem Ausstreichen auf CIN-Agar (HARIHARAN et al. 1995, FUNK et al. 1998). DE BOER und SELDAM (1987) befanden für die Untersuchung von Schweinefleischprodukten und Schweinetonsillen die Kälteanreicherung in PBSSB (Phosphat-Sorbitol-Gallensalz) als am besten. Eine Voranreicherung in BOS erzielte dabei im Vergleich zur Anreicherung in MRB höhere Ergebnisse bei der Untersuchung von Schweinefleischprodukten, v.a. für Serotyp O:8. Für die Isolierung von *Y. enterocolitica* aus Rohwurst erwies sich in einer Untersuchung von KLEEMANN und BERGANN (1996) das zweistufige Verfahren von Schiemann (1982) als wenig geeignet im Vergleich zu einer Kälteanreicherung in Phosphatpuffer mit Sorbitol und anschließendem Ausstreichen auf CIN. SCHIEMANN (1982) berichtet, dass, obwohl CIN-Agar ein überaus geeignetes Selektivmedium für den Nachweis von *Y. enterocolitica* Stämmen ist, nach einer vorhergehenden Kälteanreicherung die heranwachsende Begleitflora nicht vollständig unterdrückt werden kann. DE BOER und NOUWS (1991) empfehlen für eine Isolierung pathogener *Y. enterocolitica* aus Tonsillen die Kombination aus einer Anreicherung in ITC gefolgt von einem Ausstrich auf SSDC. Die Kombinationen von PBS-CIN und YER/BOS-CIN erbrachten hauptsächlich apathogene Stämme.

Als Fazit lässt sich sagen, dass sich die Wahl eines geeigneten Isolierungsverfahren nach dem Probenmaterial, dem Zeitfaktor und dem zu suchenden Bioserotyp richtet.

## 2.5 Identifizierung mit Testsystemen

In der Untersuchung von ARCHER et al. (1987) wurden *Y. enterocolitica* Biotyp 1 und 2 bei +28°C und +37°C eindeutig durch das Testsystem **API 20E** identifiziert, dagegen nicht die Biotypen 3 und 4. Diese falsche Identifizierung ergab sich aus einer Nichtfermentierung von Melibiose und Rhamnose bei +37°C. Außerdem traten einige Zahlenkombinationen auf, die im Profilindex nicht aufgelistet waren. API 20E hat bei einer Inkubation bei +28°C eine Identifizierungsrate von 93% für *Y. enterocolitica* (ARCHER et al. 1987). Dennoch gilt API 20E immer noch als das Testsystem der Wahl für die Identifizierung von pathogenen *Yersinia* Isolaten. NEUBAUER et al. (1998) bestimmten eine Sensitivität von 96% für das API 20E-Testsystem. Es ermöglicht die höchste Sensitivität sowohl auf der Ebene des Genus als auch der Speziesebene und hat das im Vergleich zu den beiden anderen getesteten Identifizierungssystemen (API RAPID 32 IDE, MICRONAUT E) beste Kosten-Effektivität Verhältnis (NEUBAUER et al. 1998). Auch in der Untersuchung von ARNOLD et al. (2004) wurde das API 20E Testsystem für RoutineLABs als überaus geeignet befunden. In einer Untersuchung von FUNK et al. (1998) konnten mittels dem API 20E-Testsystem alle *ail*-positiven Isolate auch als *Y. enterocolitica* bestätigt werden. Vor jedem API 20E Test muss ein Oxidasetest durchgeführt werden, da dies eine weitere Identifikationsreaktion darstellt, die bei der Auswertung berücksichtigt werden muss (BIOMÉRIEUX®, Lyon, Frankreich).

NEUBAUER et al. (2000) beschrieben ein alternatives Testverfahren zu den zeitaufwendigen Röhrchentests. Sie konfigurierten das Micronaut Identifizierungssystem (Merlin, Bornheim-Hersel) neu, wodurch eine Sensitivität von 98 bzw. 85% erreicht wurde.

## 2.6 Biochemische und serologische Charakterisierung

Aufgrund der Heterogenität innerhalb des Genus *Yersinia* ist es besonders wichtig, nach dem kulturellen Nachweis eine genaue biochemische und serologische Identifizierung durchzuführen, um pathogene Spezies von apathogenen zu differenzieren (KIESEWALTER 1992). Diese endgültige biochemische Identifizierung muss mittels Röhrchentests erfolgen, da kommerzielle Testbestecke bis heute nicht geeignet sind (NEUBAUER et al. 2001). Für die Biotypisierung werden Testreaktionen, wie in Tabelle 3 aufgelistet, durchgeführt.

Verdächtige Kolonien können auf Simmon's Citrat Agar, Kligler Eisen Agar und auf Christensen Urea Agar als Yersinien bestätigt werden. Alle diese drei Nährböden werden bei +28°C bebrütet. Simmon's Citrat Agar wird 24 h lang bebrütet. Da *Y. enterocolitica* Citrat-negativ sind, bleibt der Agar grün. Bei einem positiven Ausfall würde sich dieser blau verfärbten. Auf Kligler's Eisen Agar weisen verdächtige *Y. enterocolitica* Kolonien einen roten (alkalischen) slant und einen gelben (sauren) butt auf. Der Schrägagar des Christensen Urea Agar verfärbt sich bei vorhandenen *Y. enterocolitica* Keimen rosa (JOHNSON 1998). Dieser Urea Test benötigt aber bis zu 48 h, da auf CIN gewachsene verdächtige Kolonien erst auf dem Schrägagar wachsen müssen (HILBERT et al. 2003).

## 2.7 Pathogenitätsnachweis

Die Pathogenität eines Stammes wird durch plasmidkodierte und chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren bestimmt (Kapitel 1.2). Um zwischen virulenten und avirulenten *Y. enterocolitica* Stämmen unterscheiden zu können, wurden verschiedene Tests vorgeschlagen. Dazu gehören der Autoagglutinationstest bei +37°C, die Serumresistenz und die Pyrazinamidaseaktivität, die Salicinfermentation und die Äskulinspaltung, verschiedene Tier- und Zellkulturmodelle, die Bindung von Kongorot bei +37°C sowie ein kalziumabhängiges Wachstum bei +37°C (KAPPERUD 1991, BOTTONE 1997). Für die beiden letztgenannten **plasmidkodierten** Eigenschaften gibt es einen gemeinsamen Nachweis mittels des **Congorot-Magnesium-Oxalat** (CR-MOX)-Agars (RILEY und TOMA 1989). Potentiell pathogene Stämme benötigen Kalzium für ihr Wachstum bei +37°C und

zeigen daher ein verringertes Wachstum unter Mangelbedingungen (GEMSKI et al. 1980). Der CR-MOX Agar ermöglicht innerhalb 24 h eine Differenzierung plasmidenthaltender pathogener *Y. enterocolitica* Serotypen von nichtplasmid-enthaltender Stämmen anhand der Aufnahme der Kongorotfarbe sowie anhand des kalziumabhängigen Wachstums. Positive Stämme bilden kleine rote Kolonien, wohingegen negative Stämme große farblose Kolonien produzieren. Um ein falschnegatives Ergebnis zu vermeiden, wenn ein Stamm z.B. während dem Verfahren sein Plasmid verliert, wird der CR-MOX Agar mit einem Test auf Pyrazinamidase (negativ bei pathogenen Sämmen) und auf Salicin/Äskulin (negativ bei pathogenen Stämmen) kombiniert, da diese Eigenschaften chromosomalkodiert sind (RILEY und TOMA 1989). PRPIC et al. (1983) zeigten mit ihren Untersuchungsergebnissen, dass eine intensivrote (bei Agar-pH 7,0) bis dunkelviolette (bei Agar-pH 5,3) Pigmentierung auf **Congo red acid-morpholinepropanesulfonic acid pigmentation** (CRAMP) Agar eine einfache und schnelle Differenzierung der virulenten von den avirulenten *Y. enterocolitica* Stämmen ermöglicht. BHADURI und COTTRELL (1997) entwickelten ein low-calcium-**Congo-Red-BHI** Agarose Medium (**CR-BHO**), mit dem ein direkter Nachweis von plasmidenthaltenden pathogenen *Y. enterocolitica* Serotypen möglich ist.

Der **Autoagglutinationstest** fällt bei apathogenen Stämmen negativ aus. Dies äußert sich als eine gleichmäßige Trübung der Nährbouillon. Es wurde aber herausgefunden, dass die Autoagglutination abhängig von der Wachstumstemperatur ist. So sind bei +26°C diese Stämme negativ, die bei +36°C ein positives Ergebnis zeigen. Bakterien, die bei beiden Temperaturen agglutinieren, sind falsch-positiv (LAIRD und CAVANAUGH 1980).

Die **Serumresistenz** wird mit Hilfe von z.B. Pferdeserum nachgewiesen. Dazu wird das Wachstum der verdächtigen Kolonie parallel auf inaktiviertem und nicht inaktiviertem Serum geprüft. Es handelt sich um eine Serumresistenz, wenn die Keime auch auf dem nicht inaktivierten Serum wachsen können (KERBER 1997).

WAUTERS et al. (1987) geben mit ihrem überarbeiteten Biotypisierungsschema für *Y. enterocolitica* einen weiteren einfach durchzuführenden Test an, in dem die **Pyrazinamidaseaktivität** bestimmt wird. Bei pathogenen Stämmen kann keine

Aktivität nachgewiesen werden (KANDOLO und WAUTERS 1985). Eine positive Pyrazinamidaseaktivität zeigt sich in einer pinken bis braunen Verfärbung auf dem Schrägagar. Auch bei dieser Untersuchung ist man nicht auf das Vorhandensein des Virulenzplasmids angewiesen (KAPPERUD 1991). Dagegen ist der Autoagglutinationstest abhängig vom Virulenzplasmid (JOHNSON 1998). Das große Problem dabei ist, dass das Virulenzplasmid unter anderem bei der Anreicherung über +30°C leicht verloren gehen kann (KAY et al. 1982, KANDOLO und WAUTERS 1985, JOHNSON 1998).

FARMER III et al. (1992) stellten einen Vergleich zwischen den einzelnen Pathogenitätsnachweisen (Pyrazinamidase, CR-MOX Agar, Salicin Verstoffwechslung mit Äskulinhydrolyse und die D-Xylose Fermentation) an. Sie befanden den Pyrazinamidasetest als einfach und als zuverlässigen Test für den Nachweis pathogener Serotypen (94% der Isolate wurden richtig identifiziert). In ihrer Untersuchung waren nur drei Stämme aufgrund ihrer geringen Farbveränderung nicht eindeutig zu differenzieren. Der Salicin-Äskulintest identifizierte sogar 97% der Isolate korrekt bei einer Inkubationstemperatur von +25°C für zwei Tage. Das Problem beim CR-MOX Agar war, dass einige pathogene Serotypen durch wiederholte Kultivierung oder Lagerung ihr Virulenzplasmid verloren haben und somit ungeeignet sind für den Test. Gleichermaßen wurde für den Autoagglutinationstest herausgefunden, da die älteren Stämme meist negativ ausfielen. Der D-Xylose Fermentationstest ist geeignet für einen schnellen Nachweis von *Y. enterocolitica* Serotyp O:3 (FARMER III et al. 1992).

Neben diesen oben genannten Virulenzmarkern werden für den Pathogenitätsnachweis in Speziallabors auch immer häufiger PCR-Assays verwendet, die auf Sequenzdaten von plasmoidalen und genomischen Virulenz- und Pathogenitätsgenen basieren (NEUBAUER et al. 2001).

## 2.8 Alternative Nachweisverfahren

Zahlreiche alternative Nachweisverfahren sind derzeit auf dem Markt erhältlich und die Entwicklung wird weiter vorangetrieben.

Ein **enzyme immunoassay** (EIA) -Test wurde von KANEKO und MARUYAMA (1989) entwickelt, durch den pathogene Isolate von Yersinien von nichtpathogenen unterschieden werden können.

Durch neuere gentechnische Methoden, wie z.B. die **Polymerase-Ketten-Reaktion** (PCR) oder auch die DNA-Kolonieblothybridisierung, können pathogene *Y. enterocolitica* schneller und v.a. mit einer hohen Sensitivität und Selektivität nachgewiesen werden (LAMBERTZ et al. 1996, TREBESIUS et al. 1998, WANNET et al. 2001). Diese Methoden basieren auf spezifischen Segmenten des Plasmids, wie z.B. dem *yadA* und *virF* Gen (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003). Zu beachten ist hierbei, dass durch wiederholte Kulturpassagen das zur Identifizierung wichtige Virulenzplasmid verloren geht. Es ist aber auch eine Voranreicherung der Probe vor der Durchführung einer PCR zu empfehlen, um falschnegative Ergebnisse zu vermeiden, wenn von einer niedrigen Anzahl von Yersinien in der Probe ausgegangen werden kann (HUSSEIN et al. 2001).

Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) erwies sich in der Studie von ZECHNER (2003) als sehr gute Methode, den Bioserotyp 4/O:3 zu identifizieren. Die PFGE kann aber eine kulturelle Identifizierung nicht ersetzen, da der Keim in Reinkultur vorliegen muss. FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999) konnten den Bioserotyp 4/O:3 mittels PFGE anhand der *NotI*, *Apal* und *Xhol* Enzyme in mehrere Genotypen unterteilen. In einer Vergleichsuntersuchung von ITEMAN et al. (1996) stellte sich heraus, dass die **restriction enzyme analysis of the virulence plasmid** (REAP) keine geeignete Methode ist für die Typisierung apathogener Stämme sowie Stämme, die ihr pYV Plasmid verloren haben oder ein extra Plasmid besitzen. Außerdem ist es ungeeignet für eine Einteilung von *Y. enterocolitica* Isolaten in die unterschiedlichen Bioserotypen, da in der Studie nur 5 REAP Muster nachgewiesen werden konnten. Die Ribotypisierung war im Gegensatz zu REAP zwar zeitaufwendiger, konnte jedoch für alle *Y. enterocolitica* Stämme sowie andere *Yersinia* spp. mit den 10 gefundenen unterschiedlichen Ribotypen angewendet werden. Die PGFE schnitt in dieser Vergleichsuntersuchung am besten ab, da die 63 getesteten Stämme in 43 Pulsotypen eingeteilt werden konnten (ITEMAN et al. 1996).

Jedoch können aufgrund des großen Aufwands die meisten dieser Tests nicht in jedem Labor routinemäßig durchgeführt werden (NESBAKKEN 1992).

### 3 Ansprüche an feste *Y. enterocolitica*-Selektivnährböden

Die festen *Y. enterocolitica*-Selektivnährmedien enthalten Nährstoffe, einen Indikator, Agar und Selektivfaktoren. In der Literatur gibt es nur wenig zuverlässige Daten über die Wachstumskinetik von Yersinien in Nährmedien und über den Effekt von Selektivfaktoren auf diesen Keim (LOGUE et al. 2000). Zu den Wachstumsbedingungen zählen neben Nährstoffen und Energiequellen auch ein bestimmter pH-Wert und eine optimale Inkubationstemperatur.

#### 3.1 Temperatur

Bei Temperaturen über der Optimaltemperatur fällt die Wachstumsrate im Allgemeinen sehr schnell ab, während hingegen bei Temperaturen unterhalb der optimalen Wachstumstemperatur die Wachstumsrate nur langsam abfällt (PATCHING und ROSE 1970).

*Y. enterocolitica* ist ziemlich sensibel gegenüber Hitze und kann sich nicht ab Temperaturen über +44°C vermehren (BOCKEMÜHL 1999). Da es sich um ein psychrotropes Bakterium handelt, kann man eine Inkubation bei niedrigeren Temperaturen durchführen, wie dies z.B. bei der Kälteanreicherung genutzt wird (SCHIEMANN 1989). Die meisten Selektivnährböden werden jedoch bei der optimalen Wachstumstemperatur von *Y. enterocolitica* um die +28-29°C (BOCKEMÜHL 1999) inkubiert (Tabelle 8).

#### 3.2 pH

*Y. enterocolitica* kann nur zwischen einem pH von 4,6 und 9,0 wachsen (STERN et al. 1980). Der optimale pH für *Y. enterocolitica* liegt bei etwa 7,6 (ROBINS-BROWNE 1997) bzw. laut STERN et al. (1980) bei pH 7,2. Der pH, auf den die meisten Selektivnährböden eingestellt werden, liegt daher bei etwa 7,4 (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Aufstellung über Nährstoffe, Indikatoren, pH und Inkubationszeiten der festen *Y. enterocolitica* Selektivnährböden**

Agar	Inkubations-temperatur	pH	Indikator (g/Liter)	Protein (g/Liter)	Zucker (g/Liter)
<b>CIN</b>	+28°C	7,4 ± 0,2	Neutralrot (0,03)	Pepton aus Casein (10,0) Pepton aus Fleisch (10,0)	D(-)Mannit (20,0)
<b>SSDC</b>	+30°C	7,4 ± 0,2	Neutralrot (0,025)	Peptone (10,0)	Laktose (10,0)
<b>VYE</b>	+32°C	7,4 ± 0,2	Neutralrot (0,03)	Bacto-Pepton (17,0) Proteosepepton (3,0)	Mannit (10,0)
<b>BABY 4</b>	+29°C anaerob (48h) +29°C aerob (24h)	7,4 ± 0,2	Neutralrot (0,04)		Sorbose (10,0)
<b>KV 202</b>	+32°C	k.A.	Brillantgelb (0,5)	Bacto-Pepton (20,0)	Dulcitol (20,0)
<b>CAL</b>	+25°C	7,1	Neutralrot (0,03)		Cellobiose (3,5)
<b>DYS</b>	+23°C	7,0-7,1	Neutralrot (0,04)	Bacto-Pepton (15,0) Pepton aus Casein (5,0)	Arabinose (10,0)

### 3.3 Sauerstoffabhängiges Wachstum

*Y. enterocolitica* Keime haben gegenüber vielen anderen *Enterobacteriaceae* den Vorteil, auch anaerob wachsen zu können (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990). Diese Eigenschaft versucht z.B. BERCOVIER et al. (1984) bei seinem BABY 4 Agar auszunutzen, indem der Agar zwei Tage lang anaerob bebrütet wird, wodurch

ein Großteil der Begleitflora in ihrem Wachstum unterdrückt wird. In einer Vergleichsuntersuchung von HUDSON und MOTT (1993) wachsen aber *Y. enterocolitica* Keime unter anaeroben Bedingungen langsamer und kleiner.

### 3.4 Indikatoren

Säure-Base-Indikatoren sind Substanzen, mit denen sich der pH-Wert eines Mediums bestimmen lässt. Sie haben meist einen spezifischen Umschlagspunkt, bei dem sich ihre Farbe verändert. Am häufigsten wird bei den einzelnen Nährböden der Indikator Neutralrot mit einer Menge zwischen 0,025 bis 0,04 g/l verwendet. Der Umschlagsbereich von Neutralrot liegt bei pH 6,8-8,0. Neutralrot ist unter anderem in CIN, SSDC, VYE, BABY 4 und DYS enthalten (Tabelle 8).

### 3.5 Nährstoffe

In CIN-Agar wird beispielsweise als Zucker Mannit verwendet, dessen Verstoffwechslung der Indikator Neutralrot anzeigt und die Yersinien somit das typische „bull's eye“ Aussehen erhalten (SCHIEMANN 1979). BERCOVIER et al. (1984) nutzt dagegen die Eigenschaft von *Y. enterocolitica* aus, Sorbose fermentieren zu können. Was die Proteinzusammensetzung des Agars angeht, sind Yersinien ziemlich anspruchslos.

### 3.6 Selektivfaktoren

Um den Yersinien ein besseres Wachstum zu ermöglichen und somit auch einen besseren Nachweis zu erreichen, werden den Selektivnährböden verschiedene Selektivfaktoren zugesetzt (Tabelle 9). Man unterscheidet dabei primär zwischen chemischen Selektivfaktoren und Antibiotika.

#### 3.6.1 Chemische Selektivfaktoren

In einer Untersuchung von STERN et al. (1980) wurde bei +3°C und +25°C eine bakteriostatische und bakterizide Wirkung von 7% w/v **Natriumchlorid** ( $a_w < 0,945$ ) auf das Wachstum von *Y. enterocolitica* gezeigt, wobei klinische Stämme eine größere Toleranz gegenüber der NaCl-Konzentration zu haben scheinen. Dies hängt sicherlich mit toxischen Eigenschaften von NaCl sowie einer reduzierten

Wasseraktivität aufgrund der hohen Kochsalzkonzentration zusammen. Das beste Wachstum von *Y. enterocolitica* Keimen und der schnellste Anstieg in der Zellzahl trat bei 0,5% Natriumchlorid auf (STERN et al. 1980). Diese Menge enthalten auch die meisten Nährböden wie z.B. DYS, BABY 4, MacConkey, CIN und VYE enthalten nur 0,1% NaCl.

*Y. enterocolitica* ist sehr tolerant gegenüber **Gallensalzen**, vor allem die pathogenen Serotypen (SCHIEMANN 1989). In einer Untersuchung von MEHLMAN et al. (1978) zeigte sich, dass Yersinien eine Konzentration von 0,15% Gallensalzen bei +4°C tolerieren. Diese Menge an Gallensalzen ist z.B. im MacConkey Agar enthalten. Gallensalze unterdrücken hauptsächlich das Wachstum der grampositiven Begleitflora (HANNA et al. 1977).

Bei der Verwendung von **Natriumdesoxycholat** müssen zwei Bedingungen erfüllt sein. Zum einen muss der pH bei etwa 7 eingestellt sein, um eine Ausfällung zu vermeiden. Außerdem muss die Inkubationstemperatur unter +37°C liegen (WAUTERS 1973).

*Y. enterocolitica* ist im Gegensatz zu anderen *Enterobacteriaceae* gegenüber Irgasan (DP 300, 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxyphenol) toleranter (LOGUE et al. 2000). Irgasan hemmt mit einer Konzentration von 4µg/ml das Wachstum der meisten gramnegativen Bakterien außer *Aeromonas hydrophila*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Serratia liquefaciens* (TOORA et al. 1994). Aufgrund seiner hydrophoben und lipophilen Eigenschaft kann es von den hydrophoben Zellwandbestandteilen absorbiert werden (LOGUE et al. 2000). Diese Irgasan/Membran-Komplexe zerstören Membranstrukturen und ermöglichen somit ein besseres Durchdringen der Antibiotika. Irgasan wirkt somit als „Surfactant“ (LOGUE et al. 2000).

In mehreren Studien wird bestätigt, dass **Calciumchlorid** das Wachstum von *Y. enterocolitica* Keimen positiv beeinflusst (WAUTERS et al. 1988, TOORA et al. 1994).

Die selektive Wirkung von **Kaliumchlorat** basiert bei den meisten *Enterobacteriaceae* auf dem Vorhandensein einer A-Nitratase. Durch diese wird

das Chlorat in toxisches Chlorit aufgespalten, wodurch die Keime zerstört werden. Yersinen besitzen dagegen eine B-Nitratase, die keine Aktivität gegenüber Chlorat aufweist (BERCOVIER et al. 1984, WAUTERS et al. 1988).

### 3.6.2 Antibiotische Selektivfaktoren

**Cefsulodin** gehört zu den Cephalosporin-Derivaten und hemmt z.B. in CIN das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa*, ohne das Wachstum der Yersinien zu beeinträchtigen (TOORA et al. 1994, LÖSCHER et al. 2003). Daneben werden auch Staphylokokken, hämolysierende Streptokokken, Pneumokokken, Corynebakterien und *Clostridium perfringens* erfasst. Enterobakterien zeigen in vitro nur eine geringe Empfindlichkeit (ZCT 1981). Cefsulodin penetriert die äußere Zellmembran von *Pseudomonas aeruginosa* und ist äußerst stabil gegenüber hydrolyzierenden  $\beta$ -Laktamasen (NEU und SCULLY 1984).

**Novobiocin** gehört zur Gruppe der DNA-Gyrase-Inhibitoren und wird durch *Streptomyces sphaeroides* produziert. Grampositive Bakterien und Kokken, hauptsächlich Staphylokokken und Pneumokokken werden durch Novobiocin gehemmt. Die Empfindlichkeit von *Proteus* spp. gegenüber Novobiocin ist unterschiedlich. *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. und *Shigella* spp. sind resistent (OTTEN et al. 1975). Novobiocin zeigt einen Hemmeffekt gegenüber Klebsiellen und *Proteus* spp. (VAN PEE et al. 1979).

**Oleandomycin** gehört zu den Makrolidantibiotika. Gramnegative Keime liegen nicht im Wirkungsspektrum von Oleandomycin (OTTEN et al. 1975).

**Josamycin** wirkte hemmend auf *Y. enterocolitica* Serotyp O:3 und O:5,27 (TOORA et al. 1994). Josamycin gehört zu den Makroliden.

**Tabelle 9: Selektivfaktoren in den verschiedenen Selektivnährböden**

Agar	Gallensalz (g/l)	Kaliumchlorat (g/l)	Natriumdesoxycholat (g/l)	Irgasan (mg/l)	Cefsulodin (mg/l)	Novobiocin (mg/l)	Oleandomycin (mg/l)	Josamycin (mg/l)	Amphotericin B (mg/l)	Metronidazol (mg/l)
<b>CIN</b>	1,0			4,0	15,0	2,5				
<b>SSDC</b>	8,5		10,0							
<b>VYE</b>			1,0	4,0	4,0		10,0	20,0		
<b>BABY 4</b>		0,8	1,5			1,0			5,0	10,0
<b>KV 202</b>				4,0	15,0	2,5				
<b>CAL</b>			1,5							
<b>MacConkey mit Tween 80</b>										
<b>RAM</b>										
<b>DYS</b>	8,5	0,8	20,0							

**Amphotericin B**, das in BABY 4 Agar enthalten ist, wirkt fungistatisch bzw. fungizid. V.a Sproßpilze, biphasische Pilze, Schimmelpilze und Dermatophyten zählen zu dem Wirkungsspektrum des Amphotericin B (OTTEN et al. 1975).

**Metronidazol** gehört zur Wirkstoffgruppe der Nitroimidazol-Derivate, die selbst nicht antimikrobiell wirksam sind. Erst durch Stoffwechselvorgänge der Mikroorganismen entstehen als wirksame Produkte die Nitro-Derivate. Es kommt zu einer Schädigung der DNA-Stränge und somit zum Absterben der Mikroorganismen.

Grampositive Keime werden von **Carbencillin** nicht erfasst. Dagegen wirkt es gegen *Pseudomonas aeruginosa* und Indol-positive *Proteus* spp. (OTTEN et al. 1975).

**Ticarcillin** als Ester von Carbencillin wirkt ebenfalls gegen Pseudomonaden und *Proteus* spp. (WAUTERS et al. 1988).

### 3.7 Wirkung bei Kombination verschiedener Agentien

In einer Untersuchung von HEAD et al. (1982) zeigte sich, dass Gallensalze und Natrium-Oxalat kombiniert eine gewisse Hemmwirkung auf die Testkeime aufweisen, während sie allein nicht hemmend wirken. Wurde diesen zwei Bestandteilen noch Natriumdesoxycholat in einer Konzentration von 1,6 % zugesetzt (siehe „Y“-Medium), war eine zu hohe Selektivität erreicht. TOORA et al. (1994) untersuchten die Wirkung verschiedener chemischer Agentien im Zusammenhang mit der Verwendung von Irgasan. Sie konnten aber bei Natrium-Oxalat keinen Unterschied feststellen, während die meisten der anderen getesteten Chemikalien in Verbindung mit Irgasan eine stärkere Hemmwirkung erreichten.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

### 4 Ziel dieser Arbeit

Wie bereits in der Literatur dargestellt, gibt es in der Routinediagnostik derzeit nur wenig zufrieden stellende Nachweisverfahren für *Y. enterocolitica*. Die Selektivität der meisten Nachweismethoden ist in Bezug auf die Isolierung von *Y. enterocolitica* unzureichend. Yersinien werden erfahrungsgemäß aufgrund ihrer zumeist geringen Anzahl in der zu untersuchenden Probe und ihres langsamen Wachstums sehr schnell von der Begleitflora überwachsen, wodurch ein eindeutiger Nachweis erschwert wird.

*Y. enterocolitica* unterscheidet sich von vielen anderen gramnegativen Bakterien hinsichtlich einer positiven Urea-Reaktion. In dieser Arbeit soll daher ein einfach herstellbarer selektiver Nährboden, der diese Eigenschaft zusätzlich berücksichtigt, entwickelt werden, um ein schnelles Ergebnis für das Vorhandensein v.a. von den *Y. enterocolitica* Serotypen O:3 und O:9 in Lebensmitteln in der Routinediagnostik erzielen zu können.

## 5 Material

### 5.1 Keime

Für die Überprüfung der Wirksamkeit während der ersten Phase der Entwicklung des Ureabasisagars wurden sieben verschiedene Keime verwendet. Dies waren *Y. enterocolitica* 4/O:3, *Y. enterocolitica* 2/O:9, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas fluorescens*. In der zweiten Phase wurde der endgültig entwickelte Urea-Selektivagar noch an weiteren acht Keimen getestet, nämlich den *Y. enterocolitica*-like Bakterien *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* und *Y. kristensenii*, sowie *Morganella morganii*, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia liquefaciens*, *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Herkunft der verwendeten Keime**

Keime	Code	Herkunft
<i>Yersinia enterocolitica</i> 4/O:3	HYE 8798	Humankot
<i>Yersinia enterocolitica</i> 2/O:9	HYE 3891	Humankot
<i>Yersinia intermedia</i>	5M2510	Ferkel
<i>Yersinia frederiksenii</i>	5M3010	Schweinebrust
<i>Yersinia kristensenii</i>	2M2510	Schweinefilet
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 799	unbekannt
<i>Salmonella typhimurium</i>	DSM 554	unbekannt
<i>Escherichia coli</i>	DSM 787 + 1103	unbekannt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 934	unbekannt
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 4358	unbekannt
<i>Morganella morganii</i>	DT28	Schweinetonsille
<i>Aeromonas hydrophila</i>	TON 15	Schweinetonsille
<i>Serratia liquefaciens</i>	cTON 11gr	Schweinetonsille
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 8043	unbekannt
<i>Enterococcus faecium</i>	Forschungsstamm	unbekannt

Eine Isolierung der zwei humanpathogenen Stämme von *Y. enterocolitica*, *Y. enterocolitica* 4/O:3 und *Y. enterocolitica* 2/O:9, die weltweit als die meist verbreiteten humanpathogenen Bioserotypen angesehen werden, erfolgte bereits in früheren Studien im Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der LMU München aus humanem Faeces. *Y. enterocolitica* 4/O:3 kommt in unseren Breitengraden am häufigsten vor.

Als Vertreter der *Y. enterocolitica*-like Bakterien wurden *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* und *Y. kristensenii* ausgewählt. Diese Keime wurden ebenfalls in einer früheren Studie im Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs bei einem Ferkel, in einer Schweinebrust bzw. im Schweinefilet nachgewiesen und daraus isoliert.

*S. aureus*, *E. faecalis* und *E. faecium* stellten die Vertreter grampositiver Keime dar. Die anderen verwendeten Keime waren gramnegative Bakterien, die meisten aus der Familie der *Enterobacteriaceae*, einer Gruppe oxidasenegativer, fakultativ anaerober Stäbchen, wie *Yersinia* spp., *S. typhimurium*, *S. liquefaciens*, *M. morganii* und *E. coli*. Zwei *Pseudomonas* spp., nämlich *P. aeruginosa* und *P. fluorescens*, die oxidasepositiv und aerob wachsen, wurden ebenfalls getestet. Als weiterer oxidasepositiver Keim wurde *A. hydrophila* verwendet. Bei der Auswahl der verschiedenen Keime wurde auch auf ureasepositive, wie Yersinien, und ureasenegative Keime, wie *S. typhimurium*, *E. coli*, *S. liquefaciens* geachtet.

Die oben genannten Keime wurden aus der Mikrobank des mikrobiologischen Labors des Instituts für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs entnommen. Die Keime wurden zunächst in einer BHI-Bouillon für 24 h bei +30°C bebrütet und danach auf dem nichtselektiven CASO-Agar für weitere 24 h bei +30°C bzw. +37°C (*S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. coli*) angezüchtet, bevor sie in den einzelnen Tests verwendet wurden. Vor dem ersten Gebrauch der Keime erfolgte mittels des KOH-Testes die Identifizierung aller Keime als gramnegative bzw. grampositive Keime. *S. aureus* wurde auf Baird-Parker Agar als solcher bestätigt, die gramnegativen Keime wurden nach einem Oxidasetest im API 20E Testverfahren getestet.

## **5.2 Probenmaterial**

Um die entwickelten Nährböden an Nativproben zu testen, wurden Tonsillen- und Kotproben von 34 Schlachtschweinen aus dem Münchener Schlachthof in der Zeit von Januar bis Mai 2004 gesammelt. Des Weiteren wurden 10 Hackfleischproben (6 Rinderhackfleischproben, 2 Schweinehackfleischproben und 2 gemischte Hackfleischproben) verwendet, mit denen die Beimpfungstests durchgeführt wurden. Ferner erfolgte die Untersuchung des entwickelten Urea-Selektivagars an 15 weiteren Hackfleischproben (5 Rinder-, 5 Schweine- und 5 gemischte-Hackfleischproben), die dem Labor des Instituts im Mai und Juni 2004 zur routinemäßigen mikrobiologischen Untersuchung angeliefert wurden.

## **5.3 Arbeitsmaterialien**

Alle die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Arbeitsmaterialien, Nährmedien, Reagenzien, Rezepte, Geräte sowie Laborbedarfsgegenstände sind im Anhang aufgeführt.

## 6 Methoden

### 6.1 Herstellung eines selektiven Nährbodens

Die Herstellung eines selektiven Nährbodens gliedert sich in mehrere Phasen. In der ersten Phase entstand zunächst einmal ein Grundgerüst aus den wichtigsten Bestandteilen eines Nährbodens mit Nährstoffen, Harnstoff, Agar, Indikator und Puffer. In Phase 2 und 3 wurden diesem Ureabasis-Agar verschiedene chemische und antibiotische Selektivfaktoren zugemischt, die das Wachstum von *Y. enterocolitica* fördern, das der Begleitflora dagegen hemmen sollten. In der nächsten Phase erfolgte die Prüfung dieser Nährboden an sieben verschiedenen Testkeimen (*Y. enterocolitica* 4/O:3, *Y. enterocolitica* 2/O:9, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas fluorescens*). In der fünften Phase wurde der Agar an Nativproben (Tonsillen- und Kotproben) getestet. In der folgenden Phase wurde der entwickelte Urea-Selektivagar an verschiedenen Keimen getestet (*Y. enterocolitica* 4/O:3, *Y. enterocolitica* 2/O:9, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* und *Y. kristensenii*, *Morganella morganii*, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia liquefaciens*, *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*). Danach erfolgten Beimpfungstests an dem Urea-Selektivagar, um die Nachweisgrenze des Agars zu ermitteln. Der Urea-Selektivagar wurde in der letzten Phase nochmals mit unbeimpften Hackfleischproben getestet

- Phase 1: Herstellung eines Urea-Basisagars (6.1.1)
- Phase 2+3: Zugabe verschiedener Selektivfaktoren (6.1.2)
- Phase 4: Testen an Keimen (6.2)
- Phase 5: Testen an Nativproben (6.3)
- Phase 6: Testen des Urea-Selektivagars an Keimen (6.4.1)
- Phase 7: Beimpfungstest (6.4.2)
- Phase 8: Testen des Urea-Selektivagars an unbeimpften Hackfleischproben (6.4.3)

### 6.1.1 Entwicklung eines Urea-Basisagars:

Zunächst einmal wurde versucht, einen Urea-Basisagar herzustellen. Für ein derartiges Grundgerüst des Selektivagars wurden als Nährmittel verschiedene Peptonarten, Zuckerarten und eine unterschiedliche Menge an Urealösung kombiniert (Tabelle 11). Hierfür wurde als Peptonart Pepton aus Fleisch in einer Menge von 1,0 g/l bzw. 1,5 g/l bzw. Tryptose in einer Menge von 1,0 g/l bzw. Pepton aus Soja ebenfalls in einer Menge von 1,0 g/l zusammen mit den Zuckern Glucose, Laktose bzw. Inositol versucht.

**Tabelle 11: Kombinationen für den Urea-Basisagar**

Pepton (g/l)	Zucker (g/l)	Urea (g/l)
Pepton aus Fleisch (1,0)	Glukose (1,0)	Urea (20,0 bzw. 10,0 bzw. 5,0)
Pepton aus Fleisch (1,5)	Laktose (1,5)	Urea (20,0 bzw. 10,0 bzw. 5,0)
Tryptose (1,0)	Glukose (1,0)	Urea (20,0 bzw. 10,0 bzw. 5,0)
Tryptose (1,0)	Laktose (1,0) Inositol (1,0)	Urea (20,0 bzw. 10,0 bzw. 5,0)
Pepton aus Soja (1,0)	Glukose (1,0)	Urea (20,0 bzw. 10,0 bzw. 5,0)

Die zur Unterscheidung dienende positive Urea-Reaktion der Yersinien gegenüber vielen anderen gramnegativen Keimen war ein entscheidendes Kriterium bei der Herstellung des Agars. Als Urea-Ausgangsmenge wurden zunächst 20,0 g/l verwendet, danach auf 10,0 g/l und schließlich auf 5,0 g/l reduziert. Des Weiteren wurde Natriumchlorid (NaCl) jeweils in einer Menge von 5,0 g/l und Agar-Agar in einer Menge von 18,0 g/l hinzugegeben sowie als Puffer Dinatriumhydrogenphosphat (1,2 g/l) und Kaliumdihydrogenphosphat (0,8 g/l). Als Indikator wurde Phenolrot (0,012 g/l) ausgewählt, der seinen Umschlagspunkt bei pH 6,8 hat. Steigt der pH durch Stoffwechselvorgänge an, so tritt hier eine rosa Verfärbung ein.

Die oben genannten Zutaten wurden bis auf die Urealösung mit destilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt und bis zum vollständigen Lösen erhitzt. Der pH-Wert wurde auf 6,8 eingestellt, nachdem das Medium auf +50 bis +45°C abgekühlt war. Bei Verwendung der Zutaten aus Tabelle 11 wurde gewöhnlich ein pH-Wert zwischen 6,77 und 6,83 erreicht. In diesem Fall war keine weitere Einstellung erforderlich. Danach wurde der Agar für 20 min bei +121°C autoklaviert. Nach dem Autoklavieren und Abkühlung des Mediums auf +50 bis +45°C wurde die entsprechende Menge der sterilen Urealösung (40% Urea Solution SR20, OXOID, Basingstoke, England) unter aseptischen Bedingungen als Supplement dem Medium hinzugefügt.

Jeweils 20 ml des Mediums wurden in sterile Petrischalen gegegossen, bis zum Erstarren stehen gelassen und im Kühlschrank bei +4°C bis zum Gebrauch höchstens 5 Tage aufbewahrt.

### **6.1.2 Entwicklung eines selektiven Urea-Agars**

#### **6.1.2.1 Selektivfaktoren für den Urea-Basisagar**

Nach der erfolgreichen Entwicklung des Urea-Basisagars, auf dem die getesteten Yersinien ein gutes Wachstum zeigten, wurden diesem als Selektiv- bzw. wachstumsfördernde Faktoren Gallensalze, Natrium-Oxalat und Hefe zugegeben (Tabelle 12). Gallensalze und Natrium-Oxalat fungierten als Hemmstoffe gegen grampositive Keime. Natrium-Oxalat sollte außerdem das Wachstum der Yersinien unterstützen, dagegen das der Begleitflora etwas reduzieren. Schließlich wurde noch Hefe in einer Konzentration von 3,0 g/l zugegeben, das ebenfalls als Wachstumsförderungsmittel für Yersinien wirkte.

**Tabelle 12: Selektivfaktoren für den Urea-Basisagar**

Agar	Gallensalze (g/l)	Natrium-Oxalat (g/l)	Hefe (g/l)
I	5,0	-	-
II	5,0	4,0	-
III	5,0	-	3,0
IV	5,0	4,0	3,0

Diese Zutaten wurden zusammen mit den Bestandteilen des Urea-Basisagars (Tabelle 17) auf einen Liter destilliertes Wasser aufgefüllt, durch Erhitzen gelöst und die gesamte Suspension für 20 min bei +121°C autoklaviert. Die Urealösung wurde erst nach dem Autoklavieren und nach Abkühlung auf +50 bis +45°C als Supplement dem Medium zugegeben. Danach wurden die Nährböden wieder in sterile Petrischalen gegossen und zum Verfestigen stehengelassen.

#### 6.1.2.2 Weitere Selektivfaktoren für den Urea-Basisagar

Um eine höhere Selektivität zu erreichen, wurden diesen Agarkombinationen (Tabelle 12) nun letztlich Irgasan, Kaliumchlorat und drei verschiedene Antibiotika, nämlich Cefsulodin, Novobiocin und Ticarcillin zugegeben. **Agar A** enthielt Irgasan allein in einer Menge von 4,0 mg/l. In **Agar B** wurde diese Menge Irgasan (4,0 mg/l) kombiniert mit 15,0 mg/l Cefsulodin und 2,5 mg Novobiocin/l. In **Agar C** wurden 1,0 g/l Irgasan sowie 1,0 mg/l Ticarcillin und 1,0 g/l Kaliumchlorat bzw. in **Agar D** die doppelte Menge dieser Bestandteile zugemischt. **Agar E** wies insgesamt 5,0 mg/l Irgasan, 15,0 mg/l Cefsulodin, 2,5 mg/l Novobiocin, 1,0 mg/l Ticarcillin sowie 1,0 g/l Kaliumchlorat auf (Tabelle 13).

Tabelle 13: Weitere Selektivfaktoren für den Urea-Basisagar

Agar	Irgasan (mg/l)	Kaliumchlorat (g/l)	Cefsulodin (mg/l)	Novobiocin (mg/l)	Ticarcillin (mg/l)	Herkunft
<b>A</b>	4,0					
<b>B</b>	4,0		15,0	2,5		CIN- Supplement <sup>1</sup>
<b>C</b>	1,0	1,0			1,0	ITC- Supplement <sup>2</sup>
<b>D</b>	2,0	2,0			2,0	2 x ITC- Supplement
<b>E</b>	5,0	1,0	15,0	2,5	1,0	ITC- + CIN- Supplement

**CIN<sup>1</sup>**

Cefsulodin Irgasan Ticarcillin

**ITC<sup>2</sup>**

Irgasan Ticarcillin Kaliumchlorat

Damit der zu entwickelnde Nährboden für die Routinediagnostik einfach herzustellen ist, wurden die Supplamente, die für die Herstellung von **CIN** (Cefsulodin Irgasan Novobiocin)-Agar nach Schiemann (MERCK, Darmstadt, Deutschland) bzw. **ITC** (Irgasan Ticarcillin Kaliumchlorat)-Bouillon (MERCK) allgemein erhältlich sind, verwendet. Das Lyophilisat des CIN-Supplements wurde durch Zugabe von 1 ml sterilem destillierten Wasser und 1 ml Ethanol gelöst, das Lyophilisat des ITC-Supplements durch Zugabe von 18 ml sterilem destilliertem Wasser und 2 ml Ethanol. Der Inhalt eines Originalfläschchens reichte für die Zugabe zu 500 ml abgekühlten autoklavierten Urea-Basisagar. Danach wurden jeweils 20 ml des Mediums in sterile Petrischalen gegossen und nach dem Erstarren dieser im Kühlschrank bei +4°C bis zum Gebrauch höchstens 5 Tage gelagert.

## 6.2 Testen der entwickelten Agars an Keimen

Um diese oben genannten Agarkombinationen (Tabelle 12 + Tabelle 13) zu testen, wurden die Keime (*Y. enterocolitica* 4/O:3, *Y. enterocolitica* 2/O:9, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa* und *P. fluorescens*) aus der Mikrobank entnommen. Dazu erfolgte unter Beachtung einer sterilen Umgebung (Sicherheitsbank) die Entnahme je eines Keramikkügelchens aus dem Röhrchen mit einer Staböse und Übertragung in ein Reagenzglas mit 5 ml BHI-Bouillon. Dieses Reagenzglas wurde für 24 h bei +30°C aerob bebrütet und wurde, falls nach diesen 24 h keine Trübung der Bouillon erkennbar war, weitere 24 h bebrütet.

Aus den beimpften Röhrchen wurde dann je eine Öse Material auf die zu testenden Agarplatten übertragen und mittels Dreiösenausstrich auf der Platte verteilt. Die beimpften Platten wurden dann die ersten 24 h entweder aerob und im Parallelansatz anaerob bei +30°C bebrütet, die nächsten 24 h wurden alle Platten aerob bei +30°C bebrütet. Nach 24 h fand eine Untersuchung der gewachsenen Kolonien auf deren Wachstum, Morphologie und auf deren Größe hin statt. Als Gegenkontrolle wurden die Keime jeweils auch auf CIN-Agar (MERCK, Darmstadt, Deutschland) ausgestrichen und ebenfalls nach 24 h und 48 h geprüft.

### 6.3 Testen der entwickelten Agars mit unbeimpften Naturproben

Um die einzelnen neu entwickelten Agars zu testen, wurden in der Zeit von Januar bis April 2004 im Münchener Schlachthof Tonsillen- und Kotproben von 34 Schweineschlachtkörpern mit Hilfe dieser Nährböden auf das Vorhandensein von *Y. enterocolitica* untersucht (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Untersuchung von Tonsillen- und Kotproben mit verschiedenen Agarkombinationen**

Test	Tonsillen- bzw. Kotproben	Agar
1	10	I A
		I B
		I C
		I D
		I E
2	24	I B
		I C

- I: 5,0 g/l Gallensalz  
 A: 4,0 mg/l Irgasan  
 B: 15,0 mg/l Cefsulodin; 4,0 mg/l Irgasan; 2,5 mg/l Novobiocin (CIN-Supplement)  
 C: 1,0 mg/l Irgasan; 1,0 mg/l Ticarcillin; 1,0 g/l Kaliumchlorat (ITC-Supplement)  
 D: 2,0 mg/l Irgasan; 2,0 mg/l Ticarcillin; 2,0 g/l Kaliumchlorat (2 x ITC-Supplement)  
 E: 5,0 mg/l Irgasan; 1,0 mg/l Ticarcillin; 1,0 g/l Kaliumchlorat; 15,0 mg/l Cefsulodin;  
 2,5 mg/l Novobiocin (ITC- und CIN-Supplement)

Bei jeder Probe erfolgte zum Vergleich und zur Kontrolle auch ein Ausstrich auf CIN-Agar. Isolierte verdächtige Kolonien wurden nach Anzüchtung von Reinkulturen im API 20E identifiziert.

Die Proben wurden wie folgt verarbeitet: 10 g der Proben (bei Kot 1 g) wurden zunächst in 90 ml PBS (bei Kot 9 ml PBS) gegeben und mit Hilfe des Stomachers

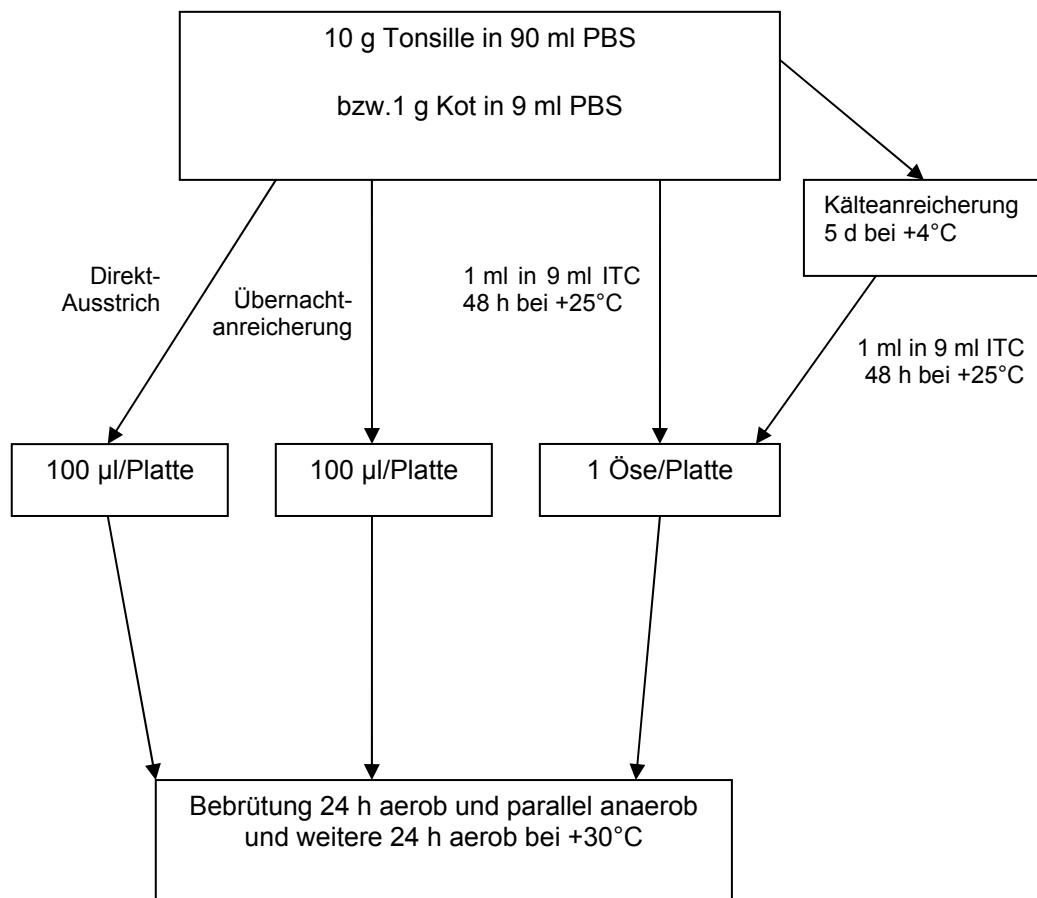
für 30 Sekunden vermengt. Danach wurden die Homogenisate nach vier verschiedenen Verfahren untersucht (Abbildung 2).

Zum einen wurde ein **Direktausstrich** von jeder gestomacherten Probe angefertigt. Es erfolgte ein Ausstrich von je 100 µl des Homogenisats auf den jeweiligen Selektivnährböden bzw. auf CIN-Agar und die Untersuchung auf Kolonienanzahl, -morphologie und -größe sowie die Farbveränderungen des Agars selbst nach 24 h und 48 h bei +30°C. Außerdem wurde von jeder gestomacherten Probe je 1 ml in 9 ml **ITC-Bouillon** gegeben und darin bei +25°C für 48 h bebrütet. Nach diesen zwei Tagen wurde je eine Öse Material entnommen und auf den neu entwickelten Selektivnährböden bzw. auf CIN-Agar ausgestrichen und wiederum für 24 h und 48 h bei +30°C bebrütet und ausgewertet.

Des Weiteren wurden für die **Übernachtanreicherung** die gestomacherten Proben für 24 h im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt und am folgenden Tag wurden von diesen Proben wieder 100 µl jeweils auf den neu entwickelten Selektivnährböden bzw. auf CIN-Agar verteilt und nach einer 24- bzw. 48-stündigen Bebrütung bei +30°C ausgewertet.

Ebenso erfolgte eine **Kältevoranreicherung** mit anschließender Anreicherung in der ITC-Bouillon, indem die gestomacherte Probe 5 d im Kühlschrank bei +4°C unter aeroben Bedingungen aufbewahrt wurde. Nach diesen 5 Tagen wurde von den Proben jeweils 1 ml in die ITC-Bouillon gegeben und weitere 48 h bei +25°C bebrütet. Aus diesen beimpften und bebrüteten Röhrchen wurde dann jeweils eine Öse auf den neu entwickelten Selektivnährböden bzw. auf CIN-Agar ausgestrichen und 24 h bzw. 48 h bei +30°C bebrütet. Die Kälteanreicherung hatte den Zweck, eventuell vorhandenen *Y. enterocolitica* Kolonien ein besseres Wachstum gegenüber der Begleitflora zu ermöglichen.

**Abbildung 2: Anreicherung und Isolierung von *Y. enterocolitica* aus Schweinetonsillen und Schweinekot**



PBS: phosphatgepufferte Salzlösung

Übernachtanreicherung: 24 h bei +4°C aerob

Kälteanreicherung: 5 d bei +4°C aerob

ITC-Anreicherung: 1 ml in 9 ml ITC-Bouillon 48 h bei +25°C

## 6.4 Testen des entwickelten Urea-Selektivagars

### 6.4.1 Testen des entwickelten Urea-Selektivagars an Keimen

Um den endgültig entwickelten Urea-Selektivagar zu testen, wurden die Keime (Tabelle 10) aus der Mikrobank entnommen. Dazu erfolgte unter Beachtung einer sterilen Umgebung (Sicherheitsbank) die Entnahme je eines Keramikkügelchens mit einer Staböse aus dem Röhrchen und Übertragung in ein Reagenzglas mit 5 ml BHI-Bouillon. Dieses Reagenzglas wurde für 24 h bei +30°C aerob bebrütet und, falls nach diesen 24 h keine Trübung der Bouillon erkennbar war, für weitere 24 h bebrütet. Aus den beimpften Röhrchen wurde dann je eine Öse Material auf CASO-Agar ausgestrichen und für 24 h bei +30°C bebrütet. Von diesen gewachsenen Reinkulturen wurden etwa 10 Kolonien in 10 ml ITC-Bouillon gegeben und weitere 48 h bei +25°C bebrütet. Aus den beimpften und bebrüteten Röhrchen wurde nach diesen zwei Tagen jeweils eine Öse mittels Dreiösenausstrich auf den neu entwickelten Selektivnährböden bzw. auf CIN-Agar ausgestrichen und die ersten 24 h aerob und im Parallelansatz anaerob bei +30°C bebrütet. Die beimpften Platten wurden die zweiten 24 h alle aerob bei +30°C bebrütet. Die gewachsenen Kolonien wurden nach 24 h und nach 48 h auf ihr Wachstum, ihre Morphologie und auf ihre Größe hin untersucht. Als Gegenkontrolle wurden die Keime jeweils auch auf CIN-Agar (MERCK) ausgestrichen und ebenfalls nach 24 h und 48 h geprüft.

### 6.4.2 Beimpfung von Hackfleischproben mit *Y. enterocolitica* 4/O:3

Es wurden insgesamt 2 Impftests (Tabelle 15) durchgeführt, wobei im ersten Impftest zwei Rinderhackfleischproben jeweils im Doppelansatz untersucht wurden. Dieser erste Impftest wurde gemacht, um zu überprüfen, ob die Methodik funktioniert und mit welchem Keimgehalt in der Ausgangs-BHI-Bouillon zu rechnen ist. Es wurde Rinderhackfleisch gewählt, da bei diesem im Gegensatz zu Schweinehackfleisch nur sehr selten *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 gefunden wird. Im zweiten Impftest wurden sowohl Rinderhackfleisch, Schweinehackfleisch und gemischte Hackfleischproben ebenso im Doppelansatz verwendet.

Als Nährboden wurde jeweils der Urea-Selektivagar verwendet, der als Selektivfaktoren 5,0 g/l Gallensalz sowie 1,0 mg/l Irgasan, 1,0 g/l Kaliumchlorat und 1,0 mg/l Ticarcillin enthält (**Agar I C**) (Tabelle 12 und Tabelle 13).

**Tabelle 15: Darstellung der Impftests**

Impftest	Proben			Agar
	R	RS	S	
Impftest 1	4			I C
Impftest 2	2	2	2	I C

R: Hackfleisch aus Rindfleisch

RS: gemischtes Hackfleisch

S: Hackfleisch aus Schweinefleisch

I C: 5,0 g/l Gallensalz, 1,0 mg/l Irgasan, 1,0 g/l Kaliumchlorat und 1,0 mg/l Ticarcillin

Am **ersten Tag** wurden die entsprechenden *Y. enterocolitica* 4/O:3 Keime (HYE 8798) aus der Mikrobank entnommen. Dazu wurde ein Keramikkügelchen unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitsbank aus dem Mikrobank-Röhrchen entnommen und auf einer CASO-Agarplatte ausgestrichen und bei +30°C im Brutschrank 24 h lang bebrütet (Abbildung 3).

Am **zweiten Tag** erfolgte die Abnahme von 10 Kolonien mit einer sterilen Öse von dem CASO-Agar und die Übertragung in je ein BHI-Bouillonröhrchen. Dieses BHI-Bouillonröhrchen wurde über Nacht (18-20 h) bei +30°C bebrütet.

Am **dritten Tag** wurde ein Homogenat aus der zu beimpfenden Hackfleischprobe angefertigt und zwar aus 10 g Probe und 90 ml PBS (phosphatgepufferter Salzlösung). Eine Vermengung im Stomacher über 30 Sekunden schloß sich an. Gleichzeitig wurde aus der beimpften und bebrüteten BHI-Bouillon eine Verdünnungsreihe mit sechs Verdünnungsstufen angelegt. Damit die genaue Keimzahl in den jeweiligen Verdünnungsstufen errechenbar war, wurden von jeder Verdünnungsstufe 100 µl im Spatelverfahren auf eine CASO-Agarplatte übertragen und mit einem sterilen Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt. Die Bebrütung der beimpften Platte erfolgte bei +30°C für 24 h.

Es musste zunächst eine Kontrolle angelegt werden. Dazu wurde von dem noch unbeimpften Hackfleischhomogenat 1 ml in 9 ml ITC-Bouillon gegeben und anschließend das Hackfleischhomogenat mit den jeweiligen Verdünnungsstufen beimpft. Dazu wurde von der höchsten Verdünnungsstufe der BHI-Röhrchen 1 ml in das Homogenat pipettiert und dieses wieder mit Hilfe des Stomachers vermischt. Von diesem Homogenat wurde dann 1 ml in ein weiteres ITC-Bouillonröhrchen mit 9 ml übertragen. Bei der nächst niedrigeren Verdünnungsstufe musste nur noch 0,901 ml in das Homogenat einpipettiert werden, damit Keime entsprechend der Verdünnungsstufe im Homogenat enthalten waren.

Es folgte das Stomachern des Gemisches und die Übertragung von 1 ml in ein weiteres ITC-Bouillonröhrchen. Dementsprechend wurde mit jeder weiteren Verdünnungsstufe verfahren. Die nun mit den Keimen in verschiedenen Konzentrationen beimpften ITC-Bouillonröhrchen wurden für 48 h bei +25°C aerob bebrütet.

Am **vierten Tag** fand die Auswertung der mit 100 µl beimpften CASO-Agarplatten und die Zählung der Kolonien statt, um die tatsächlich vorhandene Konzentration der Keime in den jeweiligen Verdünnungsstufen nach folgender Formel (BAUMGART 1999) hochzurechnen. Dabei wurden nur Platten mit Kolonienzahlen zwischen 10 und 300 ausgewertet.

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

$\bar{c}$	=	gewogenes arithmetisches Mittel der Koloniezahlen
$\sum c$	=	Summe der Kolonien aller Petri-Schalen, die zur Berechnung herangezogen werden
$n_1$	=	Anzahl der Petri-Schalen der niedrigsten Verdünnungsstufe
$n_2$	=	Anzahl der Petri-Schalen der nächsthöheren Verdünnungsstufe
$d$	=	Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe; hierbei handelt es sich um die auf $n_1$ bezogene Verdünnungsstufe

Am **fünften Tag** wurde aus den ITC-Bouillonröhrchen eine Öse beimpftes Material sowohl auf den neu entwickelten Agar als auch auf CIN-Agar ausgestrichen. Diese beimpften Agars wurden dann für 24 h und für 48 h bei +30°C bebrütet und nach einem bzw. zwei Tagen auf die Kolonienmorphologie hin untersucht.

**Abbildung 3: Methode zur Beimpfung von Hackfleischproben**

1. Tag: Ausbringen der Keime aus der Mikrobank auf CASO-Agar

24 h bei +30°C

2. Tag: Abnahme je 10 Kolonien in BHI-Bouillon

Übernacht (18-20 h) bei +30°C

3. Tag: Anlegen einer Verdünnungsreihe mit  
sechs Verdünnungsstufen aus BHI-Bouillon

100 µl Spatelverfahren  
auf CASO-Agar

Homogenat (10+90)

1 ml bzw. 0,901 ml

Homogenat (10+90)

4. Tag: Keimzahl-  
bestimmung

1 ml

1 ml

ITC-Bouillon

48 h bei +25°C

5. Tag: Ausstrich einer Öse aus ITC-Bouillon auf  
Urea-Selektivagar bzw. CIN-Agar

24 h bei +30°C

6. Tag: Auswertung der Platten

24 h bei +30°C

7. Tag: Auswertung der Platten

### 6.4.3 Test des entwickelten Urea-Selektivagar an unbeimpften Hackfleischproben

Dieser neu entwickelte Urea-Selektivagar wurde an 15 unbeimpften Hackfleischproben (5 Rinder-, 5 Schweine- und 5 gemischte-Hackfleischproben) getestet.

Jedes Mal erfolgte zum Vergleich und zur Kontrolle ein Ausstrich der Probe auch auf CIN-Agar. Isolierte verdächtige Kolonien wurden nach Anzüchtung von Reinkulturen im API 20E identifiziert.

Die Proben wurden wie folgt verarbeitet: 10 g der Proben wurden zunächst in 90 ml PBS gegeben und mit Hilfe des Stomachers für 30 Sekunden vermengt. Danach wurden die Homogenisate nach zwei verschiedenen Verfahren untersucht. Von jeder gestomacherten Probe wurde je 1 ml in 9 ml **ITC-Bouillon** gegeben und darin bei +25°C für 48 h bebrütet. Nach diesen zwei Tagen wurde je eine Öse Material entnommen und auf den neu entwickelten Selektivnährböden bzw. auf CIN-Agar ausgestrichen und für 24 h und 48 h bei +30°C bebrütet und ausgewertet.

Ebenso wurde eine **Kältevoranreicherung** mit anschließender Anreicherung in der ITC-Bouillon versucht, indem die gestomacherte Probe 5 d im Kühlschrank bei +4°C unter aeroben Bedingungen aufbewahrt wurde. Nach diesen 5 Tagen wurde von den Proben jeweils 1 ml in die ITC-Bouillon gegeben und weitere 48 h bei +25°C bebrütet. Aus diesen beimpften und bebrüteten Röhrchen wurde dann jeweils eine Öse auf den neu entwickelten Selektivnährböden bzw. auf CIN-Agar ausgestrichen und es erfolgte für die ersten 24 h eine aerobe und parallel dazu eine anaerobe Bebrütung bei +30°C und für weitere 24 h eine aerobe Bebrütung. Die Kälteanreicherung hatte den Zweck, eventuell vorhandenen *Y. enterocolitica* Kolonien ein Wachstumsvorteil gegenüber der Begleitflora zu ermöglichen.

## 6.5 Identifikation der Keime

### 6.5.1 CIN-Agar

Um die auf dem Urea-Selektivagar gewachsenen Keime zu identifizieren, wurde jeweils eine Kolonie mit einer Öse auf einen nicht selektiven CASO-Agar übertragen und bei +30°C 24 h lang bebrütet, um ein Wachstum möglichst reiner

Kolonien zu gewährleisten. Diese „reinen“ Kolonien wurden dann wiederum auf eine CIN-Agarplatte übertragen, um zu sehen, ob diese Kolonien auch das typische „bull's eye“ Wachstum von *Y. enterocolitica* auf CIN-Agar zeigten.

### 6.5.2 API 20E

Um eine sichere Identifikation zu erreichen, wurde auf das biochemische Testverfahren des API 20E (bioMérieux®sa, Lyon, Frankreich) zurückgegriffen. API 20E ist ein standardisiertes System zur Identifizierung von *Enterobacteriaceae* und anderen gramnegativen, nicht anspruchsvollen Stäbchen anhand 21 miniaturisierten biochemischen Reaktionen und einer Datenbasis. Der API 20E Streifen besteht aus 20 Mikroröhrchen, die dehydrierte Substrate enthalten. Die zu identifizierenden Kolonien wurden nochmals auf einem CASO-Agar mittels eines Dreiösenausstrichs ausgestrichen und für 24 h bei +30°C bebrütet. Nach diesen 24 h musste zunächst mit Hilfe des KOH-Testes geprüft werden, ob die Kolonien von grampositiven oder gramnegativen Keimen stammen. Dazu wurde auf einem Objektträger eine Kolonie mit einer sterilen Öse mit einem Tropfen 3%-iger Kalilauge vermengt. Gramnegative Keime lassen sich daran erkennen, dass an der Öse ein schleimiger Faden hängen bleibt, da die Zellwand gramnegativer Keime durch die Einwirkung der Kalilauge zerstört wird und die austretende DNA zu einer Viskositätsveränderung führt. Des Weiteren wurde mit Hilfe des Oxidase-Testes zwischen oxidasenegativen Keimen, wie z.B. *Enterobacteriaceae*, und oxidase-positiven Keimen, wie z.B. *Pseudomonas* spp. und *Aeromonas* spp., unterschieden. Für die Durchführung des API 20E Testes wurden dann etwa fünf gut isolierte Einzelkolonien von dem nicht selektiven Agar genommen und mit 5 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung in einem Reagenzglas sorgfältig vermengt. Die Röhrchen des API 20E Testsystems wurden dann mit der Keimsuspension beimpft, welche die Substrate löste. Anschließend erfolgte die Bebrütung bei +30°C 20-24 h zum Teil aerob, zum Teil aber auch anaerob, indem die entsprechenden Mikroröhrchen (ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE) mit flüssigem Paraffinöl überdeckt wurden.

Die Mikroröhrchen sowie die Mikrobecher von CIT, VP und GEL wurden wie in der Anleitung beschrieben komplett aufgefüllt. Die Stoffwechselprodukte, die während

der Inkubation entstehen, bewirkten entweder direkt Farbumschläge oder bei den Mikroröhrchen von TDA, IND, VP und GLU nach Zugabe der entsprechenden Reagenzien. Die Auswertung erfolgte anhand einer vorgegebenen Tabelle (Tabelle 16), die Identifizierung der Isolate mit Hilfe eines entsprechenden Computerprogramms.

Die für die Identifizierung von *Y. enterocolitica* wichtigsten Reaktionen, sind v.a. die Urease, die Citratverwertung, die Acetoinproduktion und die Zuckerreaktionen (Abbildung 6). Mit Hilfe der Indolreaktion kann man sogar schon zwischen den Serotypen O:3 (Indol-negativ) und O:9 (Indol-positiv) unterscheiden.

## 6.6 Lagerung der identifizierten Keime

Die mittels API 20E identifizierten Keime wurden in der Mikrobank bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Dazu wurden die Kolonien zunächst auf CASO-Agar ausgestrichen und 24 h bei +30°C bebrütet. Am nächsten Tag wurden dann die gewachsenen „reinen“ Kolonien unter der sterilen Sicherheitsbank in das entsprechende Mikrobankröhrchen verbracht. Nach etwa 30 Minuten Wartezeit wurde die in den Röhrchen enthaltene Flüssigkeit abpipettiert und die nun an den Keramikkügelchen fixierten Keime eingefroren.

**Tabelle 16: Ablesetabelle des API 20E Testsystems**

Test	Reaktion	Ergebnis		
		negativ	positiv	<i>Y. enterocolitica</i>
OPNG	β-Galaktosidase	farblos	gelb	+
ADH	Arginin-dehydrolase	gelb	rot/orange	-
LDC	Lysin-decarboxylase	gelb	rot/orange	-
ODC	Ornithin-decarboxylase	gelb	rot/orange	+
CIT	Citratverwertung	hellgrün/gelb	blau-grün/blau	-
H <sub>2</sub> S	H <sub>2</sub> S-Produktion	farblos/gräulich	schwarzer Niederschlag	-
URE	Urease	gelb	rot/orange	+
TDA	Tryptophan-desaminase	gelb	rotbraun	-
IND	Indolproduktion	farblos hellgrün/gelb	rosa	- (O:3) / + (O:9)
VP	Acetoinproduktion	farblos	rosa/rot	+
GEL	Gelatinase	keine Diffusion	Diffusion	-
GLU	Fermentation/ Oxidation (Glukose)	blau/blau-grün	gelb/gelb-grau	+
MAN	Fermentation/ Oxidation (Mannit)	blau/blau-grün	gelb	+
INO	Fermentation/ Oxidation (Inositol)	blau/blau-grün	gelb	-
SOR	Fermentation/ Oxidation (Sorbit)	blau/blau-grün	gelb	+
RHA	Fermentation/ Oxidation (Rhamnose)	blau/blau-grün	gelb	-
SAC	Fermentation/ Oxidation (Saccharose)	blau/blau-grün	gelb	+
MEL	Fermentation/ Oxidation (Melibiose)	blau/blau-grün	gelb	-
AMY	Fermentation/ Oxidation (Amygdalin)	blau/blau-grün	gelb	+
ARA	Fermentation/ Oxidation (Arabinose)	blau/blau-grün	gelb	+
NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> -Produktion	gelb	rot	+

## ERGEBNISSE

### 7 Herstellung eines Selektivnährbodens für *Y. enterocolitica*

#### 7.1 Ergebnisse bei der Entwicklung eines Urea-Selektivagars

Bei der differenzierten Betrachtung zahlreicher Komponenten, die als mögliche Grundlage für einen *Yersinia*-spezifischen Nährboden in Frage kommen können, erwiesen sich nachstehende Zutaten als optimal. Bei den getesteten Nährböden mit den unterschiedlichen Eiweißträgern Pepton aus Fleisch bzw. Tryptose bzw. Pepton aus Soja wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Letztendlich wurde Pepton aus Fleisch als Eiweißquelle für den Urea-Selektivagar ausgewählt.

Bei der Verwendung eines geeigneten Zuckers wurde bedacht, dass *Y. enterocolitica* Glukose und Inositol verstoffwechseln kann, Laktose dagegen nicht. Es sollte so eine gute Abgrenzung von anderen Bakterien, wie z.B. von *P. aeruginosa*, erreicht werden. Bei Benutzung von Laktose allein oder Laktose zusammen mit Inositol färbte sich der Agar bei *Y. enterocolitica* O:3 und O:9 als auch bei *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* und *S. typhimurium* rosa an, so dass keine Differenzierung möglich war. Wurde Glukose verwendet, so färbte sich der Agar nur bei den Ureapositiven Keimen, wie *Y. enterocolitica* und *P. aeruginosa*, rosa an.

Das Hauptaugenmerk bei dieser Arbeit lag auf dem Zusatz von Urea in dem zu entwickelnden Agar. Es zeigte sich bei allen durchgeführten Tests, dass eine wesentlich geringere als die in der Literatur angegebene Menge an Urea ausreicht, nämlich nur 5,0 g pro Liter Agar. Es war kein Unterschied in der Morphologie der Kolonien bzw. der Farbveränderung des Nährbodens feststellbar, unabhängig davon ob 20,0 g/l, 10,0 g/l oder nur 5,0 g/l Urea im Agar enthalten waren.

So wurde folgender Urea-Basisagar zusammengestellt (Tabelle 17).

**Tabelle 17: Zusammensetzung des Urea-Basisagars**

	g/l
<b>Pepton aus Fleisch</b>	1,0
<b>Glukose</b>	1,0
<b>Natriumchlorid</b>	5,0
<b>Dinatriumhydrogenphosphat</b>	1,2
<b>Kaliumdihydrogenphosphat</b>	0,8
<b>Phenolrot</b>	0,012
<b>Agar</b>	18,0
<b>UREA</b>	5,0
<b>pH 6,76 ± 0,2</b>	

*Y. enterocolitica* O:3 und O:9 zeigten auf diesem gelblichen Urea-Basisagar nach 24 h Bebrütung bei +30°C ein gutes Wachstum. Die Yersinien wuchsen leicht rosa mit einem Durchmesser von 0,5 mm und einem glatten Rand. *S. typhimurium*, *E. coli* und *S. aureus* Kolonien erschienen auf dem Urea-Basisagar als weißliche glattrandige erhabene Kolonien mit einem Durchmesser von 1,5 mm (*S. typhimurium*) bzw. 2,0 mm (*E. coli*) bzw. 0,3 mm (*S. aureus*). *P. aeruginosa* vermehrten sich auf dem Urea-Basisagar dagegen als transparent wachsende Kolonien mit einem Durchmesser von 0,5 mm. Bei Wachstum von *Y. enterocolitica* und *P. aeruginosa* färbt sich der Agar nach 24 h leicht rosa an. Nach 48 h Bebrütungszeit waren alle Kolonien insgesamt etwas größer (*Y. enterocolitica* 1,0 mm, *P. aeruginosa* 1,0 mm, *S. typhimurium* 2,5 mm, *E. coli* 2,5 mm, *S. aureus* 0,8 mm). Der Agar färbte sich sowohl bei *Y. enterocolitica* als auch bei *P. aeruginosa* nach 48 h Bebrütung komplett rosa an. Bei den anderen gewachsenen Keimen war der Agar nach 48 h immer noch gelblich.

## 7.2 Ergebnisse bei der Entwicklung eines selektiven Urea-Agars

### 7.2.1 Ergebnisse bei der Zugabe von Selektivfaktoren zum Urea-Basisagar

Bei der Untersuchung, welche zusätzlichen Faktoren (Tabelle 12) jeweils für die Isolierung von *Y. enterocolitica* nützlich sind, wurde festgestellt, dass *S. aureus* als Vertreter der grampositiven Keime in seinem Wachstum vollständig durch die Zugabe von **Gallensalzen** in einer Konzentration von 5,0 g/l (Agar I-IV) gehemmt wurde (Tabelle 18). Es war kein Unterschied hinsichtlich der Morphologie bzw. des Koloniewachstums der anderen Keime feststellbar, wenn **Gallensalze** allein (Agar I) oder **Gallensalze** zusammen mit **Natrium-Oxalat** (Agar II) dem Urea-Basisagar zugesetzt wurde, so dass auf Natrium-Oxalat im Endagar verzichtet werden konnte.

Bei den Agarkombinationen, die **Hefe** enthielten (Agar III und IV), fiel auf, dass sich alle Nährboden nach 24 h hellrosa verfärbten und somit keine Differenzierung zuließen. Dies war auch bei Keimen, die Urea-negativ sind, der Fall. Somit stellte sich Hefe als ungeeigneter Zusatzbestandteil für den zu entwickelnden Nährboden heraus, obwohl Hefe das Wachstum der einzelnen *Y. enterocolitica* Keime positiv beeinflusste.

Bei allen Keimen außer *Y. enterocolitica* O:3 war ein vermindertes Wachstum feststellbar, sobald **Gallensalze**, **Hefe** und **Natrium-Oxalat** (Agar IV) zusammen kombiniert wurden. Dennoch stellte sich diese Kombination als ungeeignet dar, da wie bereits oben angesprochen keine Differenzierung der einzelnen Keime möglich ist, sobald Hefe mitenthalten war.

Insgesamt zeigten die getesteten Vertreter der gramnegativen Keime nach 24 h alle ein gutes Wachstum auf den verschiedenen erprobten Nährböden. *Y. enterocolitica* O:3 und O:9 wuchsen als glattrandige erhabene rosatransparente Kolonien mit einem Durchmesser zwischen 0,2 mm und 0,8 mm nach 24 h bei +30°C. *P. aeruginosa* zeigte ein schleimiges Wachstum. Nach 48 h waren die Nährböden, die nach 24 h nur zum Teil rosa verfärbt waren, vollständig rosa verfärbt (Agar I-IV beimpft mit *Y. enterocolitica* O:3, O:9 und *P. aeruginosa* sowie Agar III und IV beimpft mit *S. typhimurium* und *E. coli*).

Auf den Nährböden, die Gallensalze zusammen mit Hefe enthielten, traten nach 48 h größere Kolonien im Durchmesser auf als auf den anderen Agarkombinationen. Auf den Agars mit allen drei Bestandteilen (Gallensalz, Hefe, Natrium-Oxalat) war auch nach 48 h noch ein reduziertes Wachstum feststellbar.

Insgesamt gesehen zeigte sich für ein gutes Wachstum der gramnegativen Keime Agar I (Tabelle 12) als der am besten geeignete Nährboden (Tabelle 18). Die Kombination von Gallensalzen mit Natrium-Oxalat (Agar II) ließ kein besseres Wachstum der Yersinien erkennen. Ein Hefezusatz (Agar III+IV) erschwerte die Differenzierung der Keime, da sich bei allen getesteten Keimen der Nährboden rosa anfärbte.

**Tabelle 18: Ergebnisse der Kolonienmorphologie für verschiedene Agarkombinationen**

Keim	Agar	Koloniefarbe / Agarfarbe [24 h/+30°C]	Ømm 24 h (48 h)
<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3	I	rosatransparent / gelbrosa	0,5 mm (1,5 mm)
	II	rosatransparent / gelbrosa	0,5 mm (1,0 mm)
	III	rosatransparent / gelbrosa	0,5 mm (1,5 mm)
	IV	rosatransparent / gelbrosa	0,5 mm (1,5 mm)
<i>Y. enterocolitica</i> 2/O:9	I	rosatransparent / rosa	0,5 mm (1,5 mm)
	II	rosatransparent / rosa	0,5 mm (1,5 mm)
	III	rosatransparent / rosa	0,8-1,0 mm (1,5-2,0 mm)
	IV	rosatransparent / rosa	0,2 mm (1,0 mm)
<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	I	weißlich / gelb	1,0-1,5 mm (1,5 mm)
	II	weißlich / gelb	1,0-1,5 mm (1,5 mm)
	III	weißlich / gelbrosa	1,5-2,0 mm (3,0 mm)
	IV	weißlich / gelbrosa	0,5-1,0 mm (1,5-2,0 mm)

<i>Escherichia coli</i>	I	weißlich / gelb	1,5-2,0 mm (2,0-2,5 mm)
	II	weißlich / gelb	1,5-2,0 mm (2,0 mm)
	III	weißlich / gelbrosa	1,5-2,0 mm (3,0 mm)
	IV	weißlich / gelbrosa	0,5 mm (2,0 mm)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I	transparent / gelbrosa	1,0-1,5 mm (1,5 mm)
	II	transparent / gelbrosa	0,4 mm (1,5 mm)
	III	transparent / gelbrosa	1,0-1,5 mm (2,5 mm)
	IV	transparent / gelbrosa	0,3 mm (1,5 mm)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	I	transparent / gelb	0,2 mm(0,5 mm)
	II	transparent / gelb	0,2 mm (0,5 mm)
	III	transparent / gelbrosa;	0,2 mm (0,5 mm)
	IV	transparent / gelbrosa	0,2 mm (0,3 mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	I-IV	Keine Kolonien;	-

I 5,0 g/l Gallensalz  
 II 5,0 g/l Gallensalz, 4,0 g/l Natrium-Oxalat  
 III 5,0 g/l Gallensalz, 3,0 g/l Hefe  
 IV 5,0 g/l Gallensalz, 4,0 g/l Natrium-Oxalat, 3,0 g/l Hefe

### 7.2.2 Ergebnisse bei der Zugabe weiterer Selektivfaktoren

Die Keime wurden wie oben dargestellt aus der Mikrobank genommen und auf die zu testenden Nährböden Agar I A-E (Tabelle 13) übertragen.

Für das Wachstum von *Y. enterocolitica* O:3 zeigten sich die Agars I B (Gallensalz mit CIN-Supplement), I C (Gallensalz mit ITC-Supplement) und I D (Gallensalz mit doppeltem ITC-Supplement) als optimal heraus (Tabelle 19). Auf diesen Nährböden trat ein typisches Wachstum, nämlich rosatransparente Kolonien mit einem Durchmesser von 0,5 mm und einer gelblichrosa Verfärbung des Nährbodens auf. *Y. enterocolitica* O:9 Keime wuchsen auf allen getesteten Nährböden sehr schlecht. Wies der Agar sowohl CIN- als auch ITC-Supplement auf (Agar E), so konnten nur *Y. enterocolitica* O:3 Kolonien wachsen. Diese zeigten aber nur ein geringgradiges Wachstum.

*S. aureus* als Vertreter grampositiver Keime konnte auf keinem dieser getesteten Nährböden wachsen, da jeweils Gallensalze in einer Konzentration von 5 g/l und verschiedene Antibiotika (Cefsulodin, Novobiocin, Ticarcillin) als Hemmstoff enthalten waren. Auch das Wachstum von *S. typhimurium* und *E. coli* konnte durch die Zugabe von Irgasan sowie der antibiotischen Wirkstoffe Cefsulodin, Ticarcillin und Novobiocin verhindert werden.

Sobald im Agar CIN-Supplement (Agar B und E) enthalten war, konnten aufgrund des antibiotischen Wirkstoffes Cefsulodin weder *P. aeruginosa* noch *P. fluorescens* wachsen. War dagegen ITC-Supplement (Agar C und D) enthalten, hemmte dies deren Wachstum nicht. Die Keime wuchsen als rosa schleimige Kolonien mit einem Durchmesser von etwa 0,5 mm. Der Agar färbte sich jeweils um die Kolonien rosa an.

**Tabelle 19: Ergebnisse der Kolonienmorphologie auf dem Urea-Basisagar mit weiteren Selektivfaktoren**

Keim	Agar	Koloniefarbe / Agarfarbe [24 h/+30°C]	Ø24 h (48 h)
<i>Y. enterocolitica</i> O:3	I A	rosatransparent /gelblichrosa	0,3 mm (1,3 mm)
	I B	rosatransparent /gelblichrosa;	0,5 mm (1,0 mm)
	I C	rosatransparent /gelblichrosa	0,5 mm (1,3 mm)
	I D	rosatransparent /gelblichrosa;	0,5 mm (1,0 mm)
	I E	rosatransparent /gelblichrosa	0,2 mm (0,5 mm)
<i>Y. enterocolitica</i> O:9	I A	rosatransparent /gelblichrosa;	0,3 mm (0,8 mm)
	I B	rosatransparent /gelblichrosa	0,2 mm (0,5 mm)
	I C	rosatransparent /gelblichrosa	0,2 mm (0,5 mm)
	I D	rosatransparent /gelblichrosa	0,2 mm (0,5 mm)
	I E	keine Kolonien /gelblichrosa;	
<i>P. aeruginosa</i>	I A	transparent / gelblichrosa	0,5 mm (1,5 mm)
	I B	keine Kolonien / gelblich;	
	I C	transparent / gelblichrosa	0,5 mm (1,5 mm)
	I D	transparent / gelblichrosa	0,2 mm (1,0 mm)
	I E	keine Kolonien / gelblich	
<i>P. fluorescens</i>	I A	transparent / gelblichrosa	0,5 mm (1,0 mm)
	I B	keine Kolonien / gelblich;	
	I C	transparent / gelblichrosa	0,5 mm (1,3 mm)
	I D	transparent / gelblichrosa	0,2 mm (0,8 mm)
	I E	keine Kolonien / gelblich	
<i>S. aureus</i>	I A-I E	Keine Kolonien;	
<i>S. typhimurium</i>	I A-I E	Keine Kolonien;	
<i>E. coli</i>	I A-I E	Keine Kolonien;	

- I: 5,0 g/l Gallensalz  
 A: 4,0 mg/l Irgasan  
 B: 4,0 mg/l Irgasan, 15,0 mg/l Cefsulodin, 2,5 mg/l Novobiocin (CIN-Supplement)  
 C: 1,0 mg/l Irgasan, 1,0 g/l Kaliumchlorat, 1,0 mg/l Ticarcillin (ITC-Supplement)  
 D: 2,0 mg/l Irgasan, 2,0 g/l Kaliumchlorat, 2,0 mg/l Ticarcillin (2 x ITC-Supplement)  
 E: 5,0 mg/l Irgasan, 1,0 g/l Kaliumchlorat, 1,0 mg/l Ticarcillin, 15,0 mg/l Cefsulodin, 2,5 mg/l Novobiocin (ITC- und CIN-Supplement)

## 8 Ergebnisse der Nährböden an unbeimpften Naturproben

### 8.1 Schweinetonsillen

Zum Testen der entwickelten Agarkombinationen wurden Tonsillen von 34 Schlachtschweinen gesammelt.

#### 8.1.1 Tonsillenproben 1-10

Die Untersuchung der ersten 10 Tonsillenproben erfolgte anhand der Nährböden I A-I E (Tabelle 12+Tabelle 13).

**Agar I A**, dem als Selektivfaktoren lediglich Gallensalze und Irgasan in einer Konzentration von 4,0 mg/l zugesetzt wurde, wies unabhängig von der Vorbehandlung, d.h Direktausstrich, Übernachtanreicherung, Voranreicherung in ITC-Bouillon oder fünftägige Kälteanreicherung, nur eine geringe Selektivität auf. Es trat bei jeder Probe ein so starkes Koloniewachstum auf, dass weder nach 24 h noch nach 48 h eine Differenzierung der Kolonien bzw. eine eindeutige Identifizierung von *Y. enterocolitica* Kolonien möglich war.

**Agar I B**, der als Selektivfaktor das CIN-Supplement enthielt, wies nach 24 h Inkubation beim Direktausstrich und nach einer Übernachtanreicherung nur vereinzelt Kolonien auf. Ein typisches Wachstum der Yersinien war schwierig zu erkennen. Der Nährboden verfärbte sich meist erst nach 48 h rosa. Eine eindeutige Differenzierung war nicht möglich. Erfolgte eine Voranreicherung in ITC-Bouillon, so war eine so starke Selektivität gegeben, dass bei keiner Probe Kolonien wachsen konnten. Der Agar blieb jeweils gelb. Auch nach 48 h trat kein Koloniewachstum auf. Nach einer fünftägigen Kälteanreicherung war dagegen auf Agar I B ein sehr starkes Keimwachstum feststellbar. Es waren typische *Yersinia*-Kolonien erkennbar, jedoch war eine deutliche Unterscheidung der gewachsenen Kolonien aufgrund der hohen Begleitflora äußerst erschwert.

Bei **Agar I C**, der das ITC-Supplement enthielt, zeigten sich beim Direktausstrich und nach der Übernachtanreicherung nach 24 h kleine Kolonien, erst nach 48 h Bebrütungszeit trat ein typisches Kolonienwachstum mit einer rosa Verfärbung des Nährbodens auf. Dagegen war nach einer Voranreicherung in ITC-Bouillon nach 24 h auf diesen Platten ein eindeutiges Ergebnis ablesbar. *Y. enterocolitica* traten

als gelblichrosa transparente erhabene glattrandige Kolonien auf (Abbildung 4). Es traten nur vereinzelt andere Kolonien auf. Auch nach einer fünftägigen Kälteanreicherung konnten die positiven Proben identifiziert werden. Jedoch war ein starkes Wachstum anderer Keime, die sich im API 20E als Serratien, Aeromonaden und Morganellen identifizieren ließen, vorhanden, so dass das Ablesen der Platten erschwert war.

Auf **Agar I D**, der die doppelte Menge des ITC-Supplements enthielt, wuchsen die Kolonien nach 24 h bei aerober Bebrütung als winzigkleine Kolonien, so dass keine Differenzierung der einzelnen Kolonien möglich war. Der Agar verfärbte sich erst nach 48 h leicht rosa.

Sobald dem Urea-Basisagar das ITC-Supplement und das CIN-Supplement zugesetzt waren (**Agar I E**), war eine zu starke Selektivität gegeben. Es war sowohl nach einem Direktausstrich, einer Übernachtanreicherung, einer Voranreicherung in ITC-Bouillon sowie einer 5-tägigen Kälteanreicherung kein Koloniewachstum feststellbar. Der Urea-Selektivagar blieb jeweils gelb.

Wurden die verschiedenen Agarkombinationen die ersten 24 h anaerob bebrütet, so wuchsen nur winzig kleine Kolonien, so dass keine eindeutige Differenzierung möglich war. Nach weiteren 24 h aerober Bebrütung trat ein diffuses Wachstum mehrerer Keime auf, die sich im API 20E als Serratien, Morganellen und Aeromonaden herausstellten.

### 8.1.2 Tonsillenproben 11-34

Aus oben genannten Ergebnissen kristallisierten sich Agar I B (Gallensalz mit CIN-Supplement) und Agar I C (Gallensalz mit ITC-Supplement) als geeignet heraus, *Y. enterocolitica* nachzuweisen. Diese zwei Nährböden wurden an weiteren 24 Tonsillenproben getestet.

Auch bei diesen weiteren 24 Proben traten auf Agar I C nach einer Voranreicherung in ITC-Bouillon typische *Y. enterocolitica* Kolonien auf, nämlich kleine rosa transparente glattrandige erhabene Kolonien mit einem Durchmesser von 0,5 mm (nach 24h aerober Bebrütung bei +30°C). Bei anaerober Bebrütung waren die Kolonien kleiner in ihrer Größe. Der Agar färbte sich um die typischen Kolonien leicht rosa an. Mit dieser Methode und diesem Agar stimmten die

positiven Ergebnisse mit denen, die mit Hilfe des CIN-Agars ermittelt wurden, überein (Tabelle 20). Um die Yersinien zu bestätigen, wurden mehrere Kolonien aus der Mitte und aus der Peripherie des Urea-Agars mit einer Öse auf CIN-Agar übertragen. Es wuchsen darauf jeweils nach 24 h typische „bull's eye“-Kolonien, die sich im API 20E als *Y. enterocolitica* Kolonien identifizieren ließen. Es waren insgesamt keine anderen Kolonien auf diesen Agars feststellbar.

Wurden die Proben mit den anderen Verfahren (D, ON, K) untersucht, war nur eine schlechte Differenzierung auf Agar I C möglich. Es wuchsen neben typischen *Y. enterocolitica* Kolonien auch Serratien (Probe Nr. 11, Nr. 18, Nr. 20) und Aeromonaden (Probe Nr. 15, Nr. 19). Bei der Übernachtanreicherung erzielte der Agar I C die gleichen Ergebnisse wie CIN-Agar, nur dass daneben auch einige andere Kolonien nachzuweisen waren, die sich im API 20E als Aeromonaden, Pseudomonaden und Morganellen herausstellten.

**Tabelle 20: Positiver *Y. enterocolitica* Nachweis auf Agar I B und Agar I C bei 34 Tonsillenproben**

Methode	I B	I C	CIN-Agar
D	7	16	16
ON	11	18	19
ITC	0	25	25

D: Direktausstrich

ON: Anreicherung über Nacht bei +4°C

ITC: Anreicherung in ITC-Bouillon 48h bei +25°C

I: 5,0 g/l Gallensalz

B: 4,0 mg/l Irgasan, 15,0 mg/l Cefsulodin, 2,5 mg/l Novobiocin (CIN-Supplement)

C: 1,0 mg/l Irgasan, 1,0 g/l Kaliumchlorat, 1,0 mg/l Ticarcillin (ITC-Supplement)

Aus Tabelle 20 ist ersichtlich, dass mit Agar I C die gleichen Resultate erzielt wurden wie mit dem herkömmlichen CIN-Agar. Auch wenn beim Direktausstrich genausoviele positive Proben, bei der Übernachtanreicherung nur eine weniger als mit CIN-Agar ermittelt wurden, so war keine sichere Identifizierung der Yersinien

bei diesen zwei Nachweismethoden möglich. Nur nach einer Voranreicherung in ITC-Bouillon trat das für Yersinien typische Wachstum auf, weshalb eindeutige positive Ergebnisse erzielt werden konnten.

Insgesamt zeigten sich auf den beiden getesteten Nährböden nach einer 5-tägigen Kältevoranreicherung bei jeder positiven Probe neben typischen *Y. enterocolitica* Kolonien auch zahlreiche morphologisch unterschiedliche Kolonien, was die Identifizierung von *Y. enterocolitica* Kolonien erschwerte. Es wuchsen neben den typisch rosa transparenten *Y. enterocolitica* Kolonien leicht dichter erscheinende gelbliche Kolonien, die sich im API 20E als Serratien identifizieren ließen. Aber auch einige andere Keime traten auf, darunter z.B. *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobriae* und non fermenter spp.. Auch wenn die beimpften Nährböden die ersten 24 h anaerob bebrütet wurden, war keine bessere Selektivität erreichbar. In Probe 31 war auch ein *P. fluorescens* nachzuweisen.

Nach der ITC-Anreicherung war auf Agar I B eine zu hohe Selektivität. Es konnte von den 24 Proben nur bei einer Probe (Tonsille 28) Koloniewachstum nachgewiesen werden, die jedoch nicht wie *Y. enterocolitica* aussahen. Es waren rosa glattrandige Kolonien mit Durchmesser von 0,8 mm, die sich als *M. morganii* im API 20E identifizieren ließen.

In diesem Versuchsaufbau zeigte sich eine vorhergehende zweitägige Anreicherung in ITC-Bouillon mit anschließendem Ausstreichen der Probe auf Agar I C als geeignetes Nachweisverfahren für *Y. enterocolitica*.

## 8.2 Schweinekot

Ein Direktausstrich der 34 Kotproben war nicht erfolgreich, da sich nur wenige Minuten nach dem Ausstreichen der Probe der komplette Agar rosa verfärbte. Auch der Ausstrich nach der Anreicherung über Nacht und nach 5 d Kälteanreicherung schlug fehl aufgrund eines zu starken Wachstums der Begleitflora, so dass keine Differenzierung möglich war. Nur nach einer 48-stündigen Voranreicherung in der ITC-Bouillon konnten verwertbare Ergebnisse erzielt werden. Der Nachweis von *Y. enterocolitica* gelang dennoch nur in wenigen Kotproben (Probe Nr. 11, Nr. 15, Nr. 16). Bei den Proben 11-34 konnten mit Hilfe des Agars I C sogar bei drei

Proben (Nr. 11, Nr. 15, Nr. 16) *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden, auf CIN-Agar dagegen nur bei einer Probe (Nr. 11) (Tabelle 21).

**Tabelle 21: Ergebnisse Kotuntersuchung**

Test	Kotprobe	Methode	Agar	positive Ergebnisse	
				Urea- Selektivagar	CIN-Agar
<b>1</b>	1-10	ITC	I A-IE	0	0
<b>2</b>	11-34	ITC	I B	1	1
			I C	3	1

ITC: Anreicherung in ITC-Bouillon 48h bei +25°C  
 I: 5,0 g/l Gallensalz  
 A: 4,0 mg/l Irgasan  
 B: 4,0 mg/l Irgasan, 15,0 mg/l Cefsulodin, 2,5 mg/l Novobiocin (CIN-Supplement)  
 C: 1,0 mg/l Irgasan, 1,0 g/l Kaliumchlorat, 1,0 mg/l Ticarcillin (ITC-Supplement)  
 D: 2,0 mg/l Irgasan, 2,0 g/l Kaliumchlorat, 2,0 mg/l Ticarcillin (2 x ITC-Supplement)  
 E: 5,0 mg/l Irgasan, 1,0 g/l Kaliumchlorat, 1,0 mg/l Ticarcillin, 15,0 mg/l Cefsulodin, 2,5 mg/l Novobiocin (ITC- und CIN-Supplement)

Auch bei der Untersuchung der Kotproben stellt sich Agar I C kombiniert mit einer vorhergehenden 48-stündigen Anreicherung in ITC-Bouillon als die erfolgreichste Methode zum Nachweis von *Y. enterocolitica* Kolonien dar.

## 9 Ergebnisse mit dem Urea-Selektivagar

### 9.1 Wachstumsergebnisse der Keime auf dem Urea-Selektivagar

Aus den oben dargestellten Ergebnissen erwies sich folgende Zusammensetzung des Urea-Selektivagars als optimal:

**Tabelle 22: Optimale Zusammensetzung des Urea-Selektivagars:**

	g/l
Pepton	1,0
Glukose	1,0
Natriumchlorid	5,0
Dinatriumhydrogenphosphat	1,2
Kaliumdihydrogenphosphat	0,8
Phenolrot	0,012
Agar	18,0
Gallensalze	5,0
pH 6,76 ± 0,2	
UREA	5,0
Irgasan	0,001
Ticarcillin	0,001
Kaliumchlorat	1,0

Bei der Überprüfung des Urea-Selektivagars fand gleichzeitig eine Untersuchung der Morphologie der Keime auf CIN-Agar statt.

Am Besten wuchsen die Kolonien von *Y. enterocolitica* O:3 (Tabelle 23). Die typische Morphologie von *Y. enterocolitica* auf dem Urea-Selektivagar, nämlich gelblichrosa transparente erhabene glattrandige Kolonien mit einem Durchmesser von etwa 0,5-1 mm sowie eine leicht rosa Verfärbung des Agars um die gewachsenen Kolonien (Abbildung 4), kam bei *Y. enterocolitica* O:9 meist erst nach 48 h deutlich zum Vorschein. Nach 24 h waren *Y. enterocolitica* O:9 kleiner und geringer in ihrer Zahl im Vergleich zu *Y. enterocolitica* O:3. Unter anaeroben Bedingungen konnten *Y. enterocolitica* O:3 und O:9 zwar wachsen, erreichten aber

nicht dieselbe Größe wie unter dem Einfluss von Sauerstoff. Auf CIN-Agar zeigten sich charakteristische „bull's eye“-Kolonien beim Wachstum von *Y. enterocolitica* O:3 und O:9.

*Y. enterocolitica*-like Bakterien wuchsen auf dem Urea-Selektivagar sowohl unter aeroben wie auch unter anaeroben Bedingungen winzig klein. *Y. kristensenii* Kolonien zeigten in diesem Testdurchlauf auf Urea-Selektivagar überhaupt kein Wachstum. Dagegen stellten sie sich auf CIN-Agar von der Morphologie ähnlich dar wie *Y. enterocolitica*, unterschieden sich jedoch geringgradig in der Größe.

Auf dem Urea-Selektivagar unterschieden sich die Pseudomonaden von *Y. enterocolitica* Kolonien dadurch, dass sie nach 24 h als relativ große (1,5 mm) schleimig wachsende Kolonien mit unregelmäßigem Rand auftraten. Der Agar verfärbte sich beim Wachstum der Pseudomonaden leicht rosa. Bei der anaeroben Bebrütung war kein Wachstum der obligat aeroben Pseudomonaden feststellbar. Pseudomonaden wurden auf CIN-Agar durch das Antibiotikum Cefsulodin in ihrem Wachstum vollständig gehemmt.

*Morganella morganii* Keime sind auf dem Urea-Selektivagar nach 24 h leicht anhand ihrer relativ großen Größe (1,5-2,0 mm) von *Y. enterocolitica* zu unterscheiden (Abbildung 5). Der Agar färbte sich bei Morganellen auch rosa an. Unter anaeroben Bedingungen konnten sie z.T. ebenfalls wachsen, erreichten aber nicht dieselbe Größe wie unter aeroben Bedingungen. Nach 48 h war der Agar tiefrosa verfärbt. Auf CIN-Agar erschienen sie als große farblose Kolonien mit ausgefranstem Rand.

Aeromonaden wuchsen auf dem Urea-Agar als leicht milchig aussehende Kolonien mit einem Durchmesser von etwa 0,8 mm. Unter anaeroben Bedingungen war kein Wachstum feststellbar. Auf CIN-Agar traten sie als schleimig helle Kolonien auf.

**Tabelle 23: Kolonienmorphologie der getesteten Keime ( $10^4$  KbE/g) auf dem Urea-Selektivagar (aerob bebrütet bei +30°C)**

Keim	Wachstum	Morphologie	Ø 24 h (48 h)
<i>Y. enterocolitica O:3</i>	+++	gelblichrosa transparente Kolonien;	0,5 mm (1,5 mm)
<i>Y. enterocolitica O:9</i>	++	gelblichrosa transparente Kolonien;	0,3 mm (1,0 mm)
<i>Y. intermedia</i>	++	winzigkleine transparente Kolonien;	0,2 mm (0,5 mm)
<i>Y. frederiksenii</i>	+++	winzigkleine transparente Kolonien;	0,2 mm (0,5 mm)
<i>Y. kristensenii</i>	-	keine Kolonien;	
<i>S. aureus</i>	-	keine Kolonien;	
<i>S. typhimurium</i>	-	keine Kolonien;	
<i>E. coli</i>	-	keine Kolonien;	
<i>P. aeruginosa</i>	++	schleimige transparente Kolonien mit unregelmäßigem Rand;	1,5 mm (2,0 mm)
<i>M. morganii</i>	+++	rosa transparente glattrandige Kolonien;	1-1,3 mm (2,0 mm)
<i>A. hydrophila</i>	++	milchig	0,8 mm (1,5 mm)
<i>S. liquefaciens</i>	+++	gelblichrosa transparente Kolonien;	0,5 mm (1,5 mm)
<i>E. faecalis</i>	-	keine Kolonien;	
<i>E. faecium</i>	-	keine Kolonien;	

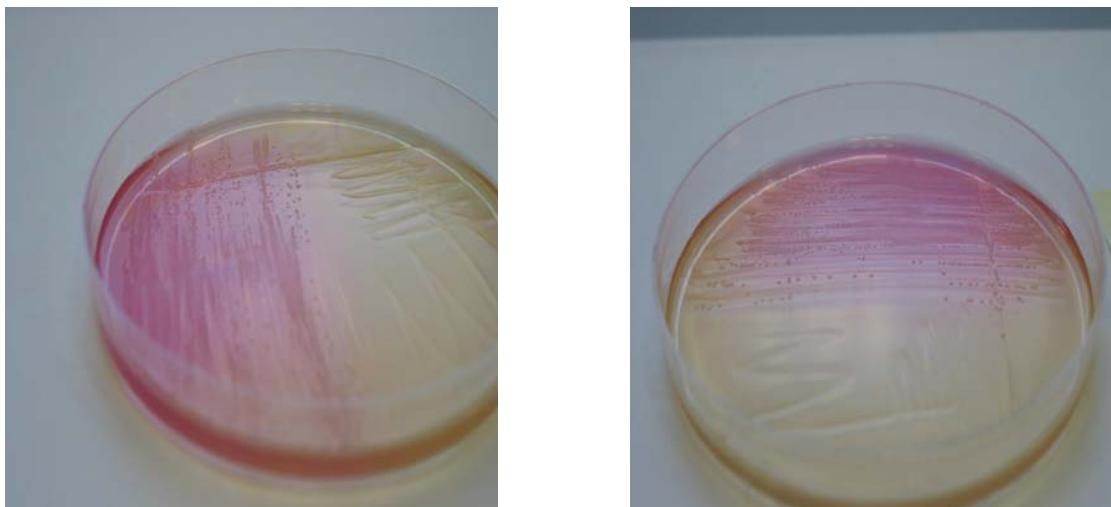
Serratien stellen bei der Identifizierung von Yersinien ein großes Problem dar. Sie wachsen auf CIN als große rötliche schleimige Kolonien mit heller Zone, können aber bei starker Begleitflora gelegentlich mit Yersinien verwechselt werden. Auch auf dem Urea-Selektivagar stellten sie die größten Schwierigkeiten dar, denn sie ähnelten den Yersinien von allen getesteten Keimen am meisten. Unter anaeroben Bedingungen konnten die Serratien nicht wachsen. Als Reinkultur konnten

Serratien auf dem Urea-Agar deutlicher von *Y. enterocolitica* Kolonien unterschieden werden als bei Naturproben mit einer starken Begleitflora.

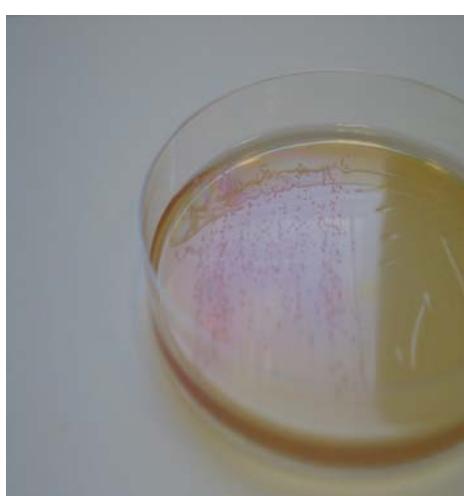
Die Wachstumsergebnisse (Tabelle 23) der einzelnen Keime in einer Ausgangskonzentration von  $10^4$  KBE/g nach einer Anreicherung in der ITC-Bouillon auf dem Endagar zeigten, dass Keime wie *E. coli*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. typhimurium*, *S. aureus* auf diesem Agar in ihrem Wachstum gehemmt wurden. Weder nach 24 noch nach 48 h ließ sich irgendein Koloniewachstum dieser Keime erkennen.

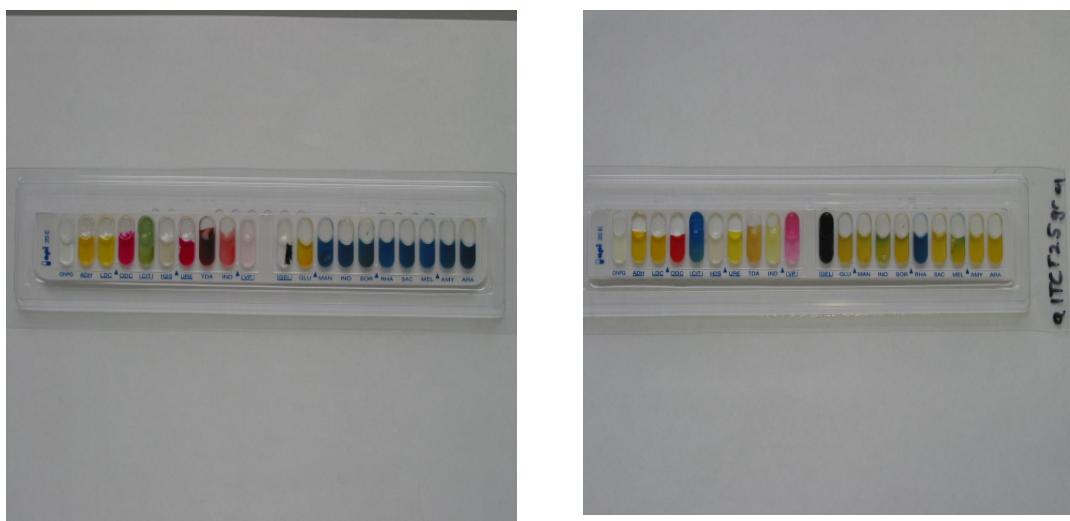
Unter anaeroben Bedingungen konnten nach 24 h nur *Morganella morganii*, *Y. enterocolitica* O:3, *Y. enterocolitica* O:9, *Y. fredriksenii* und *Y. intermedia* wachsen.

**Abbildung 4: Typisches Wachstum von *Y. enterocolitica* Kolonien auf Agar I C**



**Abbildung 5: Wachstum von *M. morganii* auf Agar I C**



**Abbildung 6: API-Profil von *Y. enterocolitica* (links) und *Y. kristensenii* (rechts)****Abbildung 7: API-Profil von *M. morganii* (links) und *S. liquefaciens* (rechts)**

## 9.2 Ergebnisse aus der Beimpfung von Hackfleischproben

Im **ersten Impftest** ergab sich bei der Hochrechnung der tatsächlich vorhandenen *Y. enterocolitica* Keimzahl in der BHI-Bouillon eine Keimzahl von  $1,6 \times 10^9$  KbE/g nach folgender Berechnung:

$10^{*-7}$ : 146 Kolonien + 158 Kolonien

$10^{*-8}$ : 36 Kolonien + 28 Kolonien

$$c = \frac{36 + 28 + 146 + 158}{2 \times 1 + 2 \times 0,1} \times 10^7 = 167,3 \times 10^7 = 1,6 \times 10^9 \text{ KbE/g}$$

In den Kontrollgruppen der unbeimften Homogenisatprobe waren jeweils keine *Y. enterocolitica* Kolonien nachzuweisen. Sowohl auf dem Urea-Selektivagar (Tabelle 22) als auch auf CIN-Agar wuchsen bei den Kontrollgruppen nach 24 und nach 48 h keine Kolonien und es trat keine Verfärbung des Nährbodens auf.

Insgesamt wuchsen die Yersinien auf Agar I C nach 24 h bei  $+30^\circ\text{C}$  bis zur  $10^{-6}$  Verdünnung, das entspricht etwa  $10^3$  KbE/g im Ausgangshomogenisat, sehr gut. Der Agar war jeweils gelb und um die Kolonien leicht rosa verfärbt. Die Kolonien an sich zeigten ein sehr gutes Wachstum und erschienen als kleine glattrandige erhabene transparente rosaarbene Kolonien mit einem Durchmesser von ca. 0,5 mm (nach 48 h bis 1,5 mm).

Auf CIN-Agar konnte das typische „bull's eye“-Wachstum der *Y. enterocolitica* Kolonien ebenfalls in den geichen Verdünnungsstufen nachgewiesen werden.

Um sicher zu gehen, dass es sich auch jeweils um *Y. enterocolitica* handelte, wurden von einigen gewachsenen Kolonien APIs angelegt, die dies bestätigten. Daneben wurden, um ein schnelleres Ergebnis zu erhalten, von jeder Platte Kolonien auf CIN-Agar übertragen und 24 h bei  $+30^\circ\text{C}$  bebrütet. Diese Kolonien zeigten alle das für Yersinien typische „bull's eye“ Wachstum.

Im **zweiten Impftest** ergab sich bei der Hochrechnung des Ausgangskeimgehaltes in der BHI-Bouillon ein Keimgehalt von  $1,9 \times 10^9$  KbE/g.

$10^{-8}$ : 18 Kolonien + 27 Kolonien

$10^{-7}$ : 180 Kolonien + 203 Kolonien

$$c = \frac{18 + 27 + 180 + 203}{2 \times 1 + 2 \times 0,1} \times 10^7 = 194,5 \times 10^7 = 1,9 \times 10^9 \text{ KbE/g}$$

Die Kontrolluntersuchungen, ob die Hackfleischproben schon vorher mit Yersinien behaftet waren, verliefen jeweils negativ. Nur beim Schweinehackfleisch und beim Halb&Halb-Hackfleisch waren bei der Kontrolluntersuchung auf CIN-Agar große rote schleimige Kolonien mit hellem Hof erkennbar, die im API 20E als *S. liquefaciens* Kolonien identifiziert wurden. Auf dem Urea-Selektivagar waren diese Keime im Kontrolldurchgang nicht nachweisbar.

Die Proben wurden dann mit *Y. enterocolitica* 4/O:3 (HYE 8798) gemäß Abbildung 3 beimpft.

#### Rinderhackfleisch:

Insgesamt wuchsen die Yersinien nach einer 24-stündigen aeroben Bebrütung bei  $+30^{\circ}\text{C}$  bis zur  $10^{-6}$  Verdünnung, das entspricht etwa  $10^3$  KbE/g, sehr gut (Tabelle 24). Der Agar war jeweils gelb und um die Kolonien leicht rosa verfärbt. Die Kolonien an sich zeigten ein sehr gutes Wachstum und erschienen als kleine glattrandige transparente rosafarbene Kolonien mit einem Durchmesser von ca. 0,5 mm. Bei der  $10^{-7}$  Verdünnung ( $10^2$  KBE/g) waren zwar einige Kolonien erkennbar, aber es war noch keine rosa Verfärbung des Agars bzw. der Kolonien sichtbar.

Der Urea-Selektivagar war nach 48 h bei  $+30^{\circ}\text{C}$  jeweils zur Hälfte gelb, zur Hälfte rosa verfärbt. Die Kolonien zeigten sich als glattrandige erhabene gelblichrosa transparente Kolonien mit einem Durchmesser von 1-1,5 mm. So konnten die Yersinien bereits ab der  $10^{-7}$  Verdünnung bestätigt werden. Um sicher zu gehen, dass es sich auch jeweils um *Y. enterocolitica* handelte, wurden von einigen

gewachsenen Kolonien APIs angelegt, die dies bestätigten. Daneben wurden, um ein schnelleres Ergebnis zu erhalten, einige der Kolonien, die auf den modifizierten Agars gewachsen sind, auf CIN-Agar übertragen, und 24 h bei +30°C bebrütet. Diese Kolonien zeigten jedes Mal das für Yersinien typische „bull's eye“ Wachstum.

Auf CIN-Agar waren bereits ab der  $10^{-7}$  Verdünnung (entspricht  $10^2$  KbE/g) typische „bull's eye“ Kolonien erkennbar.

#### Halb und Halb:

Wie beim Rinderhackfleisch waren bei der  $10^{-7}$  Verdünnung ( $10^2$  KbE/g) auf dem Urea-Selektivagar Kolonien erkennbar aber noch keine typische rosa Verfärbung. Erst ab der  $10^{-6}$  Verdünnung ( $10^3$  KbE/g) traten wieder „typische“ Kolonien mit rosa Verfärbung des Agars.

Nach 48 h waren auch auf der  $10^{-7}$  Verdünnung ( $10^2$  KbE/g) typische Kolonien mit einem Durchmesser von 1,5 mm erkennbar. Die Rosaverfärbung des Agars trat hier ebenfalls auf. Dazwischen traten vereinzelt leicht dichter erscheinende Kolonien auf, die sich im API 20E als Serratien identifizieren ließen.

Nach 48 h Bebrütungszeit wies der Urea-Selektivagar die gleiche Nachweisgrenze auf wie CIN-Agar, nämlich  $10^2$  KbE/g.

Auf CIN-Agar waren nach 24 h bei +30°C schon bereits ab der  $10^{-7}$  Verdünnung ( $10^2$  KbE/g) typische „bull's eye“ Yersinia Kolonien erkennbar, daneben aber auch Serratien.

#### Schweinehackfleisch:

Auf Agar I C ließen sich nach 24 h bei +30°C ab der  $10^{-6}$  Verdünnung (entspricht  $10^3$  KbE/g) transparente erhabene gelblich rosa Kolonien mit einem Durchmesser von 0,8 mm erkennen, um die der ansonst gelbliche Agar leicht rosa verfärbt war (Tabelle 24). Dazwischen wuchsen aber auch andere Kolonien von unterschiedlicher Morphologie wie z.B. leicht milchig aussehende Kolonien mit einem Durchmesser von 0,5 mm und gelblich dichten Kolonie mit dunkelgelbem Zentrum und einem Durchmesser von 0,5 mm (*S. liquefaciens*). Bei der  $10^{-7}$  Verdünnung (entspricht  $10^2$  KbE/g) war zwar ein Koloniewachstum von gelblich

transparenten Kolonien erkennbar, aber keine rosa Verfärbung des Agars. Auf CIN-Agar waren typische *Y. enterocolitica* ab der  $10^{-7}$  Verdünnung (entspricht  $10^2$  KE/g) feststellbar. Daneben traten wieder Serratien auf.

Auf dem Urea-Selektivagar waren nach 48 h bei  $+30^{\circ}\text{C}$  bereits ab der  $10^{-7}$  Verdünnung (entspricht  $10^2$  KbE/g) typische Kolonien mit der rosa Agarverfärbung erkennbar. Der Agar hatte sich zu Zweidritteln rosa verfärbt. Zwischen den typischen Kolonien treten aber auch vereinzelt Kolonien auf, die sich deutlich von diesen unterscheiden. Sie erschienen etwas dichter und etwas größer. Im API 20E stellten sich diese wieder als *S. liquefaciens* Kolonien heraus.

**Tabelle 24: Nachweiskonzentration der Yersinien in der beimpften Hackfleischprobe nach 24h**

	Rinderhackfleisch 24 h (48 h)	Halb & Halb 24 h (48 h)	Schweinehackfleisch 24 h (48 h)
<b>Urea-Selektivagar</b>	$10^3$ ( $10^2$ )	$10^3$ ( $10^2$ )	$10^3$ ( $10^2$ )
<b>CIN-Agar</b>	$10^2$ ( $10^2$ )	$10^2$ ( $10^2$ )	$10^2$ ( $10^2$ )
<b>Kontrolle</b>	negativ (negativ)	negativ (negativ)	negativ (negativ)

### 9.3 Hackfleisch

Auf den bisherigen Ergebnissen basierend wurde bei der Untersuchung der 15 Hackfleischproben als Nährboden der Urea-Selektivagar (Tabelle 22) verwendet. Ein Direktausstrich und eine Übernachtanreicherung der Proben wurden nicht versucht, da von einer starken Begleitflora der Hackfleischproben ausgegangen wurde und außerdem in den vorhergegangen Tests sich eine zweitägige Voranreicherung in ITC-Bouillon als günstig erwiesen hatte für den Nachweis von Yersinien. Des Weiteren erfolgte die Kombination aus einer

fünftägigen Kälteanreicherung bei +4°C mit anschließender 48-stündigen Anreicherung in ITC-Bouillon.

Dabei zeigte sich weder auf dem Urea-Selektivagar noch auf CIN-Agar ein typisches Koloniewachstum, das auf das Vorhandensein von *Y. enterocolitica* Rückschlüsse zugelassen hätte (Tabelle 25). Auf allen Nährböden trat ein sehr starkes diffuses Koloniewachstum auf. Somit konnten evtl. vorhandene *Y. enterocolitica* Keime auch leicht überwachsen sein.

Es gab dabei keinen Unterschied, ob es sich bei den Proben um Rinder-, Schweine- oder gemischtes Hackfleisch handelte.

Auf dem Urea-Selektivagar wuchsen unter aeroben Bedingungen v.a. kleine farblose transparente Kolonien mit einem Durchmesser von etwa 0,2-0,5 mm, die sich im API 20E als *non fermenter* spp. identifizieren ließen. Auf CIN-Agar erschienen diese Keime als farblose helle Kolonien mit ausgefranstem Rand. Daneben wuchsen auf dem Urea-Selektivagar zahlreiche gelblich dichte Kolonien mit dunkelgelbem Zentrum und einem Durchmesser von etwa 1 mm. Diese Keime zeigten sich bei der weiteren Differenzierung auf CIN-Agar als 2 mm große rote schleimige Kolonien mit hellem Rand und wurden im API 20E als *S. liquefaciens* identifiziert (Abbildung 7). Serratien ließen sich in allen 15 Hackfleischproben nachweisen.

**Tabelle 25: Ergebnisse der untersuchten Hackfleischproben**

Probe	Methode	positive Ergebnisse		
		Urea-Selektivagar (aerob bebrütet)	Urea-Selektivagar (anaerob bebrütet)	CIN-Agar
Probe 1-15	ITC	0	0	0
	Kälte	0	0	0

ITC: nach 48-stündiger Anreicherung in ITC-Bouillon bei +25°C

Kälte: nach 5 d Kälteanreicherung bei +4°C und nachfolgender Anreicherung in ITC-Bouillon

Desweiteren entwickelten sich auf dem Urea-Selektivagar transparente Kolonien, die im API 20E zu 97% als *Pantotae* spp. identifiziert wurden. Auch die Möglichkeit von *Ewingella* spp. wird bei diesem Code eingeräumt. Auf CIN-Agar erschienen diese Kolonien als pinkfarbene große schleimige Kolonien mit hellem Hof.

Wenn der Urea-Selektivagar die ersten 24 h anaerob bebrütet wurde, zeigte sich entweder überhaupt kein Kolonienwachstum oder es waren nur winzigkleine transparente Kolonien erkennbar. Nach weiteren 24 h unter aerober Bebrütung waren auf diesen Platten wieder *Serratien* und *non fermenter* spp., aber keine *Y. enterocolitica* Kolonien zu isolieren.

Auch nach einer Kälteanreicherung von 5 d bei +4°C waren weder auf dem Urea-Selektivagar noch auf CIN-Agar *Y. enterocolitica* Keime nachweisbar. Es war ebenfalls ein sehr starkes überwucherndes Koloniewachstum vorhanden. Vor allem *S. liquefaciens*, *non fermenter* spp., *Pantotae* spp. und *Ewingella* spp. konnten hier von den Platten isoliert werden.

## DISKUSSION

### 10 Entwicklung eines Urea-Basisagars

Der UREA-Test ist fester Bestandteil im standardisierten Nachweisverfahren nach ISO 10273 (Abbildung 1) für die Untersuchung von *Y. enterocolitica*. Verdächtige auf CIN-Agar wachsende Kolonien werden bei diesem Nachweisverfahren mittels eines Harnstoff-Pepton-Schrägagar nach Christensen differenziert. *Y. enterocolitica* hydrolisiert Urea durch das Enzym Urease in Ammoniak und Karbonsäure, was letztendlich zu einem Anstieg des pH-Wertes führt und durch den Indikator Phenolrot zu einer rosa Verfärbung des Agars führt (DE KONING-WARD und ROBINS-BROWNE 1997). Fällt dieser Test positiv aus, d.h. ein rosa Farbumschlag des Mediums, so werden die Kolonien in weiteren Tests identifiziert. Die Überlegung war nun dahingehend, einen Agar zu entwickeln, auf dem *Y. enterocolitica* Kolonien ein spezifisches Aussehen aufweisen und gleichzeitig der Abbau von Harnstoff nachgewiesen werden kann. Somit könnte dieser Identifizierungsschritt, der mit dem Harnstoff-Pepton-Schrägagar nach Christensen durchgeführt wird, eingespart werden.

Um die optimalen Inhaltsstoffe für einen solchen kombinierten Identifizierungsagar zu eruieren, wurden neben den Angaben aus der Literatur auch eigenständige Vergleichsuntersuchungen durchgeführt.

Als Grundgerüst wurde bei diesem Urea-Basisagar 18,0 g/l Agar verwendet. Wie sich in Vorversuchen herausstellte, ergaben 15,0 g/l, wie in der Harnstoff-Pepton-Agar-Basis nach Christensen (OXOID) verwendet werden, eine zu weiche Konsistenz des Agars, so dass ein Ausstreichen der Proben erschwert war. Mit zusätzlichen 3,0 g/l Agar war eine ausreichende Festigkeit des Agars gegeben.

Der Schrägagar nach Christensen enthält laut Herstellerangabe Urea in einer Menge von 20,0 g/l (CHRISTENSEN 1946). In dieser Studie wurde bei der Herstellung des Urea-Basisagars zunächst von dieser Ureamenge (20,0 g/l) ausgegangen. In weiteren Untersuchungen wurde die Menge erst auf die Hälfte und im weiteren Verlauf auf ein Viertel reduziert. Auffallend war, dass sowohl bei

einer Verringerung dieser Urea-Ausgangsmenge auf 10,0 g/l als auch auf 5,0 g/l kein Unterschied in der Morphologie der Kolonien bzw. beim Farbumschlag des Nährbodens erkennbar war, so dass 5,0 g/l ausreichend für die Herstellung des Urea-Basisagars sind. Dies ist bisher in der Literatur nicht erwähnt und kann als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dienen.

Bei der Auswahl der Zucker wurde erwogen, dass mit Laktose als Zuckerbestandteil für *Yersinia*, als laktosennegativen Keim, eine gute Abgrenzung zu anderen laktosepositiven Keimen möglich sein könnte. Der selektive SSDC-Agar z.B. enthält 10,0 g/l Laktose. Laktose-positive Keime wachsen auf diesem Agar als rote Kolonien, *Y. enterocolitica* dagegen farblos (WAUTERS 1973). In dieser Studie gelang bei der Verwendung der Laktose eine solche Differenzierung nicht. Der Agar färbte sich bei allen Keimen rosa an, unabhängig davon, ob Laktose-positive oder -negative Keime ausgestrichen wurden. Mit Glukose als Kohlenhydratquelle hingegen traten keinerlei Farbstörungen auf, nur Ureapositive Keime färbten den Nährboden rosa an. *Y. enterocolitica* zeigten zudem mit Glukose ein gutes Wachstumsverhalten.

Bei der Untersuchung eines geeigneten Eiweißträgers war kein Unterschied unabhängig von der Verwendung von Pepton aus Fleisch, Pepton aus Soja oder Tryptose feststellbar. So wurde in den nachfolgenden Untersuchungen Pepton aus Fleisch verwendet.

Um den neuen Urea-Basisagar einfach und schnell herstellen zu können, wurde die im Handel erhältliche Urea Agar Base nach Christensen (OXOID) verwendet, die bereits 1,0 g/l Pepton aus Fleisch, 1,0 g/l Glukose, 5,0 g/l NaCl, 1,2 g/l Dinatriumhydrogenphosphat, 0,8 g/l Kaliumdihydrogenphosphat, 0,012 g/l Phenolrot, und 15,0 g/l Agar enthält. Zusätzlich musste der Urea Agar Base nach Christensen wie bereits oben beschrieben lediglich 3,0 g/l Agar zugefügt werden, um eine festere Konsistenz des Agars zu erreichen und somit ein besseres Ausstreichen der Proben zu ermöglichen. Urea wurde als Supplement in der beschriebenen Menge zugegeben.

In dieser Studie erfolgte die Inkubation der beimpften Nährböden im Wärmeschrank bei +30°C, da in der Literatur der Urease bei +28°C eine stärkere Aktivität als bei

+37°C zugeschrieben wird (DE KONING-WARD und ROBINS-BROWNE 1997). Gleichzeitig liegt die verwendete Temperatur sehr nahe an der optimalen Wachstumstemperatur (+28°C und +29°C) von Yersinien (BOCKEMÜHL 1999).

## 11 Zugabe verschiedener Selektivfaktoren

Entscheidend für einen in der Routinediagnostik verwendbaren Agar für *Y. enterocolitica* ist eine ausreichende Selektivität, wobei das Wachstum der zu untersuchenden Keime nicht gehemmt werden darf. Daher wurden bei der Auswahl der Selektivfaktoren für den neuen Agar auf verschiedene Faktoren aus der Literatur zurückgegriffen und diese in Bezug auf Selektivität und Wachstumsbeeinflussung untersucht.

Als Selektivfaktoren wurden **Gallensalze** in einer Menge von 5,0 g/l ausgewählt, da Gallensalze das Wachstum der grampositiven Begleitflora hemmen (HANNA et al. 1977) und *Y. enterocolitica* sehr tolerant gegenüber Gallensalzen ist (SCHIEMANN 1989). CIN-Agar enthält nur 1,0 g/l Gallensalze (SCHIEMANN 1989), SSDC-Agar und DYS-Medium dagegen 8,5 g/l (Tabelle 9). In dieser Studie wurde daher ein Mittelwert der in der Literatur verwendeten Gallensalzkonzentrationen gebildet und für den Einsatz getestet. Mit 5,0 g/l Gallensalzen konnte ein Wachstum grampositiver Keime (hier an *S. aureus* getestet) sehr gut auf den untersuchten Nährböden (Agar I-IV) unterbunden werden, wobei das Wachstum der Yersinien bei dieser Gallensalzkonzentration nicht beeinträchtigt wurde.

Natrium-Oxalat variiert in den verschiedenen Selektivnährböden in einer Menge von 1,0 g/l (VYE-Agar nach Fukushima) bis 20,0 g/l (DYS-Medium) (Tabelle 9). In dieser Studie konnte durch die Zugabe von 4,0 g/l **Natrium-Oxalat** (Agar II) hinsichtlich der Morphologie bzw. des Wachstumsverhaltens der Kolonien (*Y. enterocolitica* 4/O:3, *Y. enterocolitica* 2/O:9, *S. typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa* und *P. fluorescens*) und auch bzgl. des Farbumschlages des Nährbodens selbst kein Unterschied zu Agar I, der nur Gallensalz als Selektivfaktor enthielt, erkannt werden, so dass auf Natrium-Oxalat im Urea-Selektivagar verzichtet werden kann.

BERCOVIER et al. (1984) verwendeten bei der Herstellung ihres Baby 4-Agars 3,0 g/l Hefe, womit ein gutes Wachstum der *Yersinia* Kolonien erreicht wurde. Auch in dieser Studie beeinflusste der Zusatz von 3,0 g/l **Hefe** das Wachstum der einzelnen *Y. enterocolitica* Kolonien positiv. Dennoch war es nachteilig in der Hinsicht, dass sich alle Nährböden komplett rosa verfärbten. Dies war auch bei ureanegativen Keimen der Fall, so dass keine eindeutige Differenzierung anhand der Harnstoffverstoffwechslung möglich war.

In dieser Studie wurden weiterhin verschiedene **Irgasan**Konzentrationen getestet (Tabelle 13). Irgasan ist hydrophob und lipophil und tritt als Surfactant in die äußere Zellmembran ein und beschädigt diese, wodurch Antibiotika einen besseren Zugang erhalten und besser wirken können (LOGUE et al. 2000). Die meisten gramnegativen Keime, außer *A. hydrophila*, *M. morganii*, *P. aeruginosa* und *S. liquefaciens* werden durch Irgasan in einer Konzentration von 4 µg/ml in ihrem Wachstum gehemmt (TOORA et al. 1994). Dies konnte auch in dieser Studie bestätigt werden. Sowohl Aeromonaden als auch *Morganella*, Pseudomonaden und Serratien ließen sich nicht in ihrer Entwicklung durch den Zusatz von Irgasan in einer Menge von 4 mg/l beeinflussen, wohingegen das Wachstum anderer *Enterobacteriaceae* wie *Samonella* und *E. coli* unterbunden werden konnte. CIN-Agar nach Schiemann und VYE-Agar nach Fukushima enthalten ebenfalls Irgasan in einer Menge von 4 mg/l. Irgasan allein in einer Konzentration von 1,0 mg/l erwies sich als unzureichend selektiv. Wurde der Selektivfaktor dagegen in Kombination mit Ticarcillin (1,0 mg/l) und Kaliumchlorat (1,0 g/l) verwendet, waren 1,0 mg/l ausreichend. 5,0 mg/l zeigten sich in dieser Studie dagegen in Kombination mit den anderen Selektivfaktoren zu selektiv, so dass kein Koloniewachstum der getesteten Keime möglich war.

In dieser Studie wurden 1,0 g/l **Kaliumchlorat** verwendet, da im ITC-Supplement bereits 1,0 g/l enthalten sind. Im Baby 4 Agar und im DYS-Medium sind dagegen nur 0,8 g/l zugesetzt. Kaliumchlorat hemmt bestimmte Keime aus der Familie der *Enterobacteriaceae*, indem die vorhandene A-Nitratase das Chlorat aufspaltet. Die entstehenden Produkte sind toxisch für diese Keime. *Yersinia* spp. besitzen dagegen eine B-Nitratase, die keine Wirkung auf das Chlorat besitzt. Ein Abbau und die Entstehung toxischer Produkte finden somit nicht statt. Dies erklärt die

Unempfindlichkeit gegenüber Kaliumchorat (WAUTERS et al. 1988). Dennoch findet scheinbar eine Beeinflussung des Wachstumsverhaltens insbesondere von Bioserotyp 2/O:9 statt. Die Ergebnisse der Evaluierungsstudie von DE ZUTTER et al. (1994) hierzu konnten in dieser Untersuchung bestätigt werden. Auch hier wiesen die Stämme des Serotyps O:9 nach einer Voranreicherung in der selektiven ITC-Bouillon nur ein mittelgradiges Wachstum im Vergleich zu *Y. enterocolitica* O:3 auf. DE ZUTTER et al. (1994) führen dieses verminderte Wachstum auf die hohe Konzentration von Kaliumchlorat (1,0 g/l) zurück, da diese weit oberhalb der minimalen Hemmkonzentration für Serotyp O:9 liegt.

Die verwendete Menge an **Cefsulodin** richtete sich in dieser Studie nach der Literaturangabe von SCHIEMANN (1979) im CIN-Agar. Cefsulodin hemmt das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* (LÖSCHER et. al. 2003), ohne das Wachstum der Yersinien zu beeinträchtigen. Sobald in den getesteten Nährböden Cefsulodin in einer Menge von 15 mg/l enthalten war (Agar B und E), konnte kein Wachstum von Pseudomonaden festgestellt werden. FUKUSHIMA (1987) verwendet dagegen lediglich 4,0 g/l Cefsulodin in seinem VYE-Agar, benötigt dafür aber noch weitere zwei Antibiotika (10,0 g/l Oleandomycin und 20,0 g/l Josamycin).

Um den Nährboden einfach für die Routinediagnostik herstellen zu können, wurde auf die im Handel erhältlichen CIN- und ITC-Supplemente (MERCK) zurückgegriffen. CIN-Supplement enthält 15,0 mg/l Cefsulodin, 4,0 mg/l Irgasan sowie 2,5 mg/l Novobiocin. Das ITC-Supplement besteht aus 1,0 mg/l Irgasan, 1,0 mg/l Ticarcillin und 1,0 g/l Kaliumchlorat.

## 12 Testen der verschiedenen Nährböden an Nativproben

Um die Nährböden mit den verschiedenen Inhaltsstoffen (Tabelle 12 + Tabelle 13) auf ihre Eignung für den Nachweis von *Y. enterocolitica* zu testen, wurden als Probenmaterial Tonsillen- und Kotproben von Schweineschlachtkörpern gesammelt. BUCHER (2001) fand in seiner Untersuchung mit Poolproben in 85% der untersuchten Tonsillen pathogene *Y. enterocolitica*. NESBAKKEN et al. (2003) fanden in ihrer Studie in 12,5% der Kotproben *Y. enterocolitica* 4/O:3. Bei

Schweinetonsillen und Schweinekot wird von einer hohen Prävalenz von *Y. enterocolitica* ausgegangen und eignen sich daher sehr gut als Testmaterial.

Bei der Untersuchung der Nativproben wurden verschiedene Verfahren getestet. Als beste Methode hat sich eine 48-stündige Anreicherung in ITC Bouillon vor dem Ausstreichen auf den selektiven Nährböden (Agar I A – I E) herausgestellt. Nach einem Direktausstrich bzw. nach einer Übernachtanreicherung war keine gute Differenzierung möglich aufgrund der starken Begleitflora. Nach einer fünftägigen Kälteanreicherung ließen sich zwar typische Yersinienkolonien erkennen, jedoch trat ebenso eine starke Begleitflora (Serratien, Aeromonaden, Morganellen) auf, wodurch eine eindeutige Differenzierung der Kolonien erschwert wurde. Auch in der Untersuchung von BUCHER (2001) war eine Voranreicherung in ITC-Bouillon (52,6 % positiv) dem Direktausstrich (6,4 % positiv), der Übernachtanreicherung (9,0 % positiv) sowie einer Kälteanreicherung (5,1 % positiv) überlegen.

Als bester Agar hat sich bei der Untersuchung der Nativproben Agar I C erwiesen, der als Selektivfaktoren Gallensalze, Irgasan, Ticarcillin und Kaliumchlorat (ITC-Supplement) enthielt. *Y. enterocolitica* Kolonien wuchsen darauf als gelblichrosa transparente erhabene Kolonien mit einem Durchmesser von 0,5 mm bis 1,0 mm (Abbildung 4). Der Agar färbte sich um die Kolonien rosa an.

Mit Hilfe des Agars I C wurden nach einer Voranreicherung in ITC-Bouillon ebenso viele positive Proben gefunden wie mit Hilfe von CIN-Agar. Das typische Wachstum von *Y. enterocolitica* auf dem Urea-Selektivagar weist gleichzeitig den Abbau von Harnstoff durch die rosa Verfärbung des Agars nach. Der Agar I B, der das CIN-Supplement enthielt, hat sich bei der Untersuchung der Nativproben nicht für einen erfolgreichen Nachweis von *Y. enterocolitica* herausgestellt. Nach einer Voranreicherung in ITC-Bouillon war die Selektivität so hoch, dass überhaupt keine Kolonien mehr wachsen konnten.

Bei der Untersuchung der Kotproben wurden nur positive Ergebnisse erzielt, wenn eine 48-stündige Voranreicherung in ITC-Bouillon vorausging. Mit Hilfe des Agars I C wurden sogar bei zwei Proben (Probe Nr. 15 und 16) nach einer Voranreicherung in ITC-Bouillon *Yersinia* nachgewiesen, während hingegen mit CIN-Agar diese Proben negativ ausfielen. Im Gegensatz zu FREDRIKSSON-

AHOMAA et al. (2001d), wo alle positiven Kotproben nach einer Anreicherung über Nacht nachgewiesen werden konnten, konnte in dieser Studie keine Differenzierung der einzelnen Kolonien erfolgen, da sich der Nährboden Minuten nach dem Ausstreichen rosa verfärbte, vermutlich wegen Inhaltsstoffen aus der Kotprobe.

Bei einer Kälteanreicherung von Lebensmittelproben, aber auch von Umweltproben werden die Yersinien des Öfteren von Pseudomonaden überwuchert (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990). Diese Überwucherung versuchten z.B. BERCOVIER et al. (1984) durch eine anaerobe Bebrütung der Baby 4 Agarplatten zu verhindern. Auch in vorliegender Studie konnte die Begleitflora durch eine 24-stündige anaerobe Bebrütung der Agarplatten recht gut minimiert werden. Jedoch wuchsen *Y. enterocolitica* Keime wie bei der Untersuchung von HUDSON und MOTT (1993) unter anaeroben Bedingungen langsamer und waren nur als winzigkleine Kolonien erkennbar, wodurch eine Differenzierung nicht möglich war. Eine eintägige anaerobe Bebrütung der Agarplatten hat sich in dieser Studie nicht bewährt.

### 13 Untersuchung des entwickelten Urea-Selektivagars

Aus den Ergebnissen und Schlussfolgerungen der bisherigen Teiluntersuchungen stellte sich der Agar I C als der am besten geeignete Urea-Selektivagar für den Nachweis von *Y. enterocolitica* heraus (Tabelle 22).

*Y. enterocolitica* wachsen darauf nach 24 h aerober Bebrütung als rosa transparente, erhabene Kolonien mit einem Durchmesser von 0,5 mm. Der Nährboden selbst färbt sich um die Kolonien rosa an. Auch auf dem in dieser Studie entwickelten Agar stellt das Wachstum einer Begleitflora die größte Herausforderung dar. Im Vordergrund stehen hierbei Serratien, die bei der Identifizierung von Yersinien problematisch sind. Sie wachsen auf CIN-Agar als große rötliche schleimige Kolonien mit heller Zone und können, obwohl die Morphologie unterschiedlich ist, bei starker Begleitflora gelegentlich mit Yersinien verwechselt werden (SCHIEMANN 1979). Auch auf dem Urea-Selektivagar ergaben sich bei der Differenzierung die größten Schwierigkeiten, denn die Morphologie der Serratien ähnelte den Yersinien von allen getesteten Keimen am

meisten. Dennoch ist bereits makroskopisch ein Unterschied feststellbar, da Serratien im Vergleich zu *Y. enterocolitica* dichter erscheinen und ein etwas dunkleres Zentrum aufweisen. Als Reinkultur konnten Serratien auf dem Urea-Agar deutlicher von *Y. enterocolitica* Kolonien unterschieden werden als bei Naturproben mit einer starken Begleitflora. Auch *M. morganii* zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten (Abbildung 5), konnten aber anhand der Größe von den kleineren *Y. enterocolitica* Kolonien unterschieden werden. Auf dem Urea-Selektivagar kann das Wachstum grampositiver Keime als auch bestimmter gramnegativer Keime (*Salmonella*, *E. coli*) unterbunden werden, wie dies auch auf CIN-Agar möglich ist (SCHIEMANN 1979).

Mit Beimpfungstests von Rinder-, Schweine- und gemischten Hackfleischproben mit *Y. enterocolitica* O:3 sollten in diesem Zusammenhang die Selektivität sowie die Spezifität des neu entwickelten Agars untersucht werden. Mit dem Urea-Selektivagar konnten nach 24 h aerober Bebrütung bei  $10^3$  KbE/g typische *Y. enterocolitica* Kolonien nachgewiesen werden. Nach 48 h Inkubation traten diese bereits bei  $10^2$  KbE/g auf. Im Vergleich dazu konnte bei dieser Konzentration auf CIN-Agar bereits nach 24 h Bebrütung typische *Y. enterocolitica* Kolonien identifiziert werden. DE ZUTTER (1994) beobachtete für *Y. enterocolitica* eine Konzentration von ungefähr  $10^3$  KbE/ml auf frischem Fleisch. Somit weist der Urea-Selektivagar mit einer Nachweismöglichkeit von  $10^3$  KbE/g nach einer 48-stündigen Anreicherung in ITC-Bouillon eine ausreichende Spezifität auf.

Bei der Untersuchung der 15 nativen Hackfleischproben war eine Differenzierung der gewachsenen Kolonien trotz einer 48-stündigen Voranreicherung in ITC-Bouillon auf dem Urea-Selektivagar aufgrund eines zu starken unspezifischen Koloniewachstums nicht möglich. Aber auch die Kontrolluntersuchung mit Hilfe des CIN-Agars schlug aufgrund einer überwuchernden Begleitflora fehl. Selbst eine eintägige anaerobe Bebrütung konnte die Differenzierung nicht erleichtern. Eine anaerobe Bebrütung kann zwar die Begleitflora sehr gut unterdrücken, jedoch wachsen auch die Yersinien selbst sehr langsam und so klein, dass eine eindeutige Identifizierung nicht möglich ist. FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999) konnten bei der Untersuchung von Schweinehackfleisch in Finnland mit dem

Kulturverfahren ebenfalls nur eine geringe Prävalenz von *Y. enterocolitica* nachweisen (nur 2%), was auch dort ein methodisches Problem war, da bei den gleichen Proben mit dem PCR-Verfahren eine Prävalenz von 25% erreicht worden ist.

Ein Nachteil dieses neu entwickelten Urea-Selektivagars ist die im Vergleich zu CIN-Agar schwierigere Differenzierung der gewachsenen Kolonien. CIN-Agar ist leichter abzulesen, was bei einer großen Menge zu untersuchender Proben von großem Vorteil ist (HOORFAR und HOLMVIG 1999). Des Weiteren können anhand der Morphologie der Kolonien keine Rückschlüsse auf die mögliche Pathogenität der Yersinien gezogen werden. Daher sind weitere Differenzierungstests unbedingt erforderlich, die jedoch auch bei verdächtigen, auf CIN-Agar wachsenden, Kolonien durchgeführt werden müssen. Denn ohne Charakterisierung des Stammes fehlen wichtige epidemiologische Informationen (FREDRIKSSON-AHOMAA und KOREALA 2003).

Der Urea-Selektivagar weist ähnliche Probleme auf wie CIN-Agar, da die Selektivität gegenüber Serratien, Aeromonaden und Morganellen unzureichend ist (SCHIEMANN 1979). Eine bessere Identifizierung der *Yersinia* Kolonien kann erreicht werden, wenn nach einer zweitägigen Voranreicherung in ITC Bouillon die Proben parallel auf CIN- und auf dem neu entwickelten Urea-Selektivagar ausgestrichen werden. Der Urea-Selektivagar bedarf sicherlich noch weiterer Evaluierungstests, ist aber neben CIN-Agar ein nützliches Instrument *Y. enterocolitica* 4/O:3 aus Lebensmittelproben nachzuweisen. *Y. enterocolitica* Bioserotyp 2/O:9, der im Allgemeinen nicht so häufig nachgewiesen wird, war auf diesem neu entwickelten Agar aufgrund des langsameren Wachstums hingegen schwieriger nachzuweisen. Mit dem Urea-Selektivagar kann im Gegensatz zu CIN-Agar bereits nach 24 h ein Harnstoffabbau der Yersinien Kolonien anhand der rosa Verfärbung der Kolonien bzw. des Nährbodens selbst abgelesen werden. Um eine höhere Nachweisrate zu erhalten, sollten die Proben zwei Tage in ITC Bouillon vorangereichert werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die einzelnen Bioserotypen von *Y. enterocolitica* verschiedene Anforderungen an die Zusammensetzung der Kulturmedien stellen, speziell im Hinblick auf die Art und Konzentration von

Selektivfaktoren. Daher ist es schwierig, ein einzelnes Anreicherungsverfahren auszuwählen, das effizient genug ist, alle pathogenen Stämme von *Y. enterocolitica* nachzuweisen. Von mehreren Autoren (SCHIEMANN 1982, STENGEL 1986, DE BOER und SELDAM 1987, WAUTERS et al. 1988, COX et al. 1990, ALDOVÁ et al. 1990, KWAGA et al. 1990, VARNAM und EVANS 1991, DE BOER 1992, DE BOER 1995, JIANG et. al 2000) wird deshalb empfohlen, mindestens zwei verschiedene Anreicherungs- und Ausstrichmedien für die Isolierung von pathogenen *Y. enterocolitica* zu benützen. Hierfür eignet sich der neu entwickelte Urea-Selektivagar in Kombination mit dem herkömmlich gebrauchten CIN-Agar sehr gut. Um ein möglichst breites Spektrum an Serotypen nachzuweisen, empfiehlt sich die zweitägige Voranreicherung in der selektiven ITC-Bouillon mit einem Ausstrich auf dem Urea-Selektivagar in Kombination mit einem Direktausstrich bzw. einer Übernachtanreicherung mit Austrich auf dem CIN-Agar.

## ZUSAMMENFASSUNG

*Y. enterocolitica* 4/O:3 und *Y. enterocolitica* 2/O:9 sind die in unseren Breitengraden am meist verbreitetten humanpathogenen Bioserotypen, wobei *Y. enterocolitica* 4/O:3 am häufigsten aus Lebensmitteln isoliert wird. Ein großes Problem besteht in der relativ geringen Nachweisrate für pathogene *Y. enterocolitica* Stämme aus Lebensmittelproben mit den derzeit verfügbaren Nachweismethoden. Verschiedene Selektivnährböden wurden für die Isolierung von *Y. enterocolitica* entwickelt, sie werden aber häufig von anderen Bakterien überwachsen. *Y. enterocolitica* Stämme können von den meisten anderen enteropathogenen gramnegativen Keimen anhand eines positiven Harnstoffabbaus unterschieden werden. Ziel dieser Studie sollte daher die Entwicklung eines selektiven Nährbodens sein, der geeignet ist, *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 und 2/O:9 aus Fleischproben nachzuweisen.

Es wurden verschiedene Peptone, Zucker, Harnstoff- und Agarkonzentrationen für die Grundlage des Urea-Agars getestet. Des Weiteren wurden verschiedene selektive Faktoren zugegeben, wie Gallensalze, Hefe, Natrium-Oxalat, Kaliumchlorat, Irgasan und Antibiotika (Cefsulodin, Novobiocin, Ticarcillin). Der neu entwickelte Nährboden wurde anhand verschiedener gramnegativer und grampositiver Keime getestet (*Y. enterocolitica* 4/O:3, *Y. enterocolitica* 2/O:9, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *M. morganii*, *A. hydrophila*, *S. liquefaciens*, *E. faecalis* und *E. faecium*). Außerdem fand eine Untersuchung des Nährbodens mit künstlich kontaminiertem Hackfleisch sowie unbeimpften Nativproben (Tonsillen- und Kotproben von 34 Schlachtschweinen sowie 15 unbehandelten Hackfleischproben) statt.

Die angewandten Verfahren bestanden aus einem Direktausstrich, einer Übernachtanreicherung, einer Voranreicherung in ITC-Bouillon sowie eine Kältevoranreicherung mit nachfolgender Anreicherung in ITC-Bouillon. Die Proben wurden jeweils zum Vergleich auf CIN-Agar nach Schiemann ausgestrichen.

Zusammensetzung des Agars (g/l): Pepton aus Fleisch (1,0), Glucose (1,0), Natriumchlorid (5,0), Dinatriumhydrogenphosphat (1,2), Kaliumhydrogenphosphat (0,8), Gallensalze (5,0), Phenolrot (0,012), Agar (18,0), Urea (5,0), Irgasan (0,001), Ticarcillin (0,001), Kaliumchlorat (1,0); pH 6,76±0,2.

Urea-positive Bakterien wuchsen auf diesem Urea-Selektivagar rosa, während hingegen Urea-negative Bakterien gelb wuchsen. *Y. enterocolitica* 4/O:3 zeigte ein gutes Wachstum auf diesem Agar nach einer 24-stündigen Inkubation bei +30°C. *Y. enterocolitica* 2/O:9 wuchs im Vergleich zu *Y. enterocolitica* 4/O:3 kleiner und geringer in ihrer Zahl, zeigte jedoch auch die typische Morphologie nach 48 h. *Y. intermedia* und *Y. frederiksenii* wuchsen kleiner. Durch die enthaltenen Selektivfaktoren konnte ein Wachstum von *Y. kristensenii*, grampositiven Spezies, *S. typhimurium* und *E. coli* unterbunden werden. Pseudomonaden und Aeromonaden wuchsen transparent und konnten leicht von den Yersinien abgegrenzt werden. Die größten Probleme hinsichtlich der Differenzierung bereiteten *M. morganii* und *S. liquefaciens*, da diese eine ähnliche Morphologie aufwiesen wie *Y. enterocolitica* 4/O:3. *Y. enterocolitica* 4/O:3 konnte erfolgreich isoliert werden aus künstlich kontaminiertem Hackfleisch und nativen Tonsillen, wenn eine selektive Anreicherung in ITC Bouillon dem Ausstreichen vorausging.

Der neu entwickelte Urea Selektivagar ist zusammen mit CIN-Agar ein geeigneter selektiver Nährboden für die Isolierung von Bioserotyp 4/O:3 aus Fleisch. Eine Selektivanreicherung in ITC Bouillon sollte bei der Untersuchung von Fleischproben vor dem Ausstreichen auf dem festen Agar immer stattfinden.

## SUMMARY

### **Development of a selective agar for isolation of *Yersinia enterocolitica***

*Y. enterocolitica* 4/O:3 and *Y. enterocolitica* 2/O:9 are the most widely distributed human pathogenic bioserotypes of which *Y. enterocolitica* 4/O:3 is the most frequently isolated in foods. However, the isolation rate of pathogenic *Y. enterocolitica* 4/O:3 and 2/O:9 have been low when food samples were studied. One reason may be the insensitive isolation methods available. Several selective agar plates have been designed for *Y. enterocolitica* isolation but they are mostly overgrown with other bacteria. *Y. enterocolitica* strains can be differentiated from most other gram-negative bacteria with a positive result of urea hydrolysis. The aim of this study was to design a urea-based selective agar plate suitable for isolation of *Y. enterocolitica* belonging to bioserotypes 4/O:3 and 2/O:9 from meat samples.

Different peptones, sugars, urea, and agar concentrations were tested for the urea-agar base. Further, several selective factors, like yeast, bile salts, sodium oxalate, potassium chlorate, and antibiotics (cefsulodin, novobiocin and ticarcillin) were tested. The design „*Yersinia* selective urea agar“ was tested with several bacterial species (9) and strains (15), artificial contaminated minced meat (10) and natural contaminated pig tonsils (34) and faeces (34) and natural contaminated minced meat (15).

The designed urea agar base consisted of following components: peptone (0,1 %), glucose (0,1 %), sodium chloride (0,5 %), phenol red (0,0012 %), bile salts (0,5 %) and agar (1,8 %), urea (0,5 %), potassium chlorate (0,1 %), irgasan (0,0001 %) and ticarcillin (0,0001 %); pH 6,76±0,2 . The urea-positive bacteria were growing pink when urea-negative were growing yellow. *Y. enterocolitica* 4/O:3 grew well on the agar after 24 h incubation at +30°C when bioserotype 2/O:9 needed 48 h incubation. *Y. intermedia* and *Y. frederiksenii* grew more slowly. The growth of *Y. kristensenii*, gram-positive species, *Salmonella* and *E. coli* was inhibited. *Pseudomonas* and *Aeromonas* were growing transparent and could easily be differentiated from *Yersinia*. There were some difficulties to differentiate *Morganella*

and *Serratia* species from *Yersinia* because they were growing well as light pink colonies on the urea agar. *Y. enterocolitica* 4/O:3 could effectively be isolated from artificially contaminated minced meat and naturally contaminated tonsils when selective enrichment in ITC bouillon was used before plating on the agar.

The new designed „*Yersinia* selective urea agar“ was shown to be a useful selective agar for isolation of bioserotype 4/O:3 from meat parallel with selective CIN agar. However, selective enrichment in ITC bouillon before plating on the selective urea agar is needed when meat samples are studied.

## ANHANG

### 14 Medien zur Anreicherung, Isolierung und Identifizierung von *Y. enterocolitica*

#### 14.1 Flüssige Medien

##### ITC-Nährbouillon

(Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Nährbouillon)

##### ITC-Bouillon (MERCK, 116723)

Pepton aus Casein	10,0 g
Hefeextrakt	1,0 g
Magnesiumchlorid (wasserfrei) (MERCK 105833)	28,1 g
Natriumchlorid	5,0 g
Malachitgrün	0,01 g
Destilliertes Wasser	ad 1000ml

Mischen und zum Lösen erhitzen

Abfüllen von je 9,6 ml in Reagenzglasröhrchen

Autoklavieren für 15 min bei +121°C

pH 6,9±0,2 bei +25°C

##### ITC-Selektiv-Supplement (MERCK, 1.16725.0001)

Irgasan	0,5 mg
Ticarcillin	0,5 mg
Kaliumchlorat	500mg

Lyophilisat durch Zugabe von 18ml sterilem demineralisiertem Wasser und 2 ml Ethanol absolut lösen

**Peptonwasser gepuffert nach ISO 6579 (MERCK 107228)**

Pepton aus Casein	10,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	9,0 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

Mischen und zum Lösen erhitzen

Abfüllen zu je 9 ml in Reagenzglasröhrchen und zu je 90 ml in kleine Erlenmeyerkolben

Autoklavieren für 15 min bei +121°C

pH: 7,0±0,2 bei +25°C

**14.2 Feste Medien**

**Baird-Parker-Agar**

Baird-Parker-Agar (MERCK, 105406)	58,0 g
Destilliertes Wasser	950 ml

Zugabe von Eigelb-Tellurit-Emulsion

(MERCK, 103785) 50 ml

**TSA-Agar**

(Tryptic soy agar / CASO-Agar) (MERCK, 105458)

Pepton aus Casein	15,0 g
Pepton aus Sojamehl	5,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Agar-Agar	15,0 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

Mischen und zum Lösen erhitzen

Autoklavieren 15 min bei +121°C

ca. 15 ml in sterile Petrischalen

pH 7,3±0,2 bei +25°C

### **CIN-Agar nach Schiemann**

(Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar)

#### Basismedium:

Pepton aus Casein	10,0 g
Pepton aus Fleisch	10,0 g
Hefeextrakt	2,0 g
D(-)-Mannit	20,0 g
Natriumpyruvat	2,0 g
Natriumchlorid	1,0 g
Magnesiumchlorid	0,01 g
Gallesalzmischung	1,0 g
Neutralrot	0,03 g
Kristallviolett	0,001 g
Agar-Agar	12,5 g
Destilliertes Wasser	ad 1000ml

Mischen und zum Lösen erhitzen

Autoklavieren 15 min. bei +121°C

pH 7,4±0,2 bei +25°C

#### Yersinia-Selektivsupplement (MERCK, 1.16466.0001)

Cefsulodin	7,5 mg
Irgasan	2,0 mg
Novobiocin	1,25 mg
Ethanol absolut (vergällt) (MERCK 100974)	1 ml
destilliertes Wasser	1 ml

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

Abfüllen von je ca. 12,5 ml in sterile Petrischalen

**Urea-Selektivagar**

Pepton aus Fleisch	1,0 g
Glukose	1,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Gallensalze	5,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat	1,2 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,8 g
Phenolrot	0,012 g
Agar-Agar	18,0 g
Destilliertes Wasser	ad 1000ml

Mischen und zum Lösen erhitzen

Autoklavieren 15 min. bei +121°C

pH 7,4±0,2 bei +25°C

**Zugabe von UREA**

(40% Urea Solution SR20, Oxoid)	20,0 bzw. 10,0 bzw 5,0 g
---------------------------------	--------------------------

**Zugabe von ITC-Selektiv-Supplement**

(MERCK, 1.16725.0001)

Irgasan	0,5 mg
Ticarcillin	0,5 mg
Kaliumchlorat	500mg

Lyophilisat durch Zugabe von 18ml sterilem demineralisiertem Wasser und

2 ml Ethanol absolut lösen

**14.3 Aufbewahrungsmedium**

**Mikrobank**

Cryobank™ (MASTDIAGNOSTICA; Laboratoriums-Präparate GmbH; Reinfeld) zur Aufbewahrung von Keimen

## 15 Testsysteme und Reagenzien

### API 20E (REF 20 100)

Testsystem zur Identifizierung von Enterobacteriaceae

bioMérieux® SA, Marcy-l'Étoile, France

Zusätzlich benötigte Reagenzien:

TDA Reagenz	70400 (bioMérieux)
JAMES Reagenz	70540 (bioMérieux)
VP 1 Reagenz	70420 (bioMérieux)
VP 2 Reagenz	70430 (bioMérieux)
NIT 1 Reagenz	70440 (bioMérieux)
NIT 2 Reagenz	70450 (bioMérieux)

Paraffin dickflüssig (MERCK, 107160)

### KOH-Lösung

Potassiumhydroxid (KOH) (Sigma P-1767)	2,5 g
Natriumchlorid (NaCl) (MERCK, 106404)	8,5 g
destilliertes Wasser	ad 1000 ml

### Oxidase-Test

BD BBL™ DrySlide™ REF 231746 (BECTON DICKINSON)

zur Bestimmung der Oxidasereaktion von Bakterien

## 16 Geräte und Hilfsmittel

### Aludeckel

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

### Anaerobiersysteme

Anaerobiertopf HP11	OXOID
AnaeroGen™ AN 25	OXOID

**Aufbewahrungsgefäß**

Erlenmeyerkolben 100 ml	MERCK
Erlenmeyerkolben 200 ml	MERCK
Erlenmeyerkolben 500 ml	MERCK
Erlenmeyerkolben 1000 ml	MERCK

**Autoklav**

Tischautoklav Typ 3850EL	TUTTNAUERSYSTE
Varroklav 500 Dampfsterilisator	BIOMEDICS

**Brutschränke**

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

**Glaspipetten**

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

**Handschuhe**

Einmal-Handschuhe PE gehämmert	MERCK
--------------------------------	-------

**Kühlschränke**

Kühl-Gefrier-Kombination Typ „Premium“	LIEBHERR
FKS 5000 Index 10C Typ 200071	LIEBHERR
Economic cooler automatic	BOSCH

**Magnetrührer mit Heizplatte**

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

**Messzylinder**

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

**Mikrobank**

Microbank™ Product Code PL. 160	PRO-LAB DIAGNOSTICS
---------------------------------	---------------------

**Objektträger**

Objektträger einfach 76 x 26 mm	MENZEL-GLÄSER
---------------------------------	---------------

**Ösen**

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

**Petrischalen**

Sterile Petrischalen Nr. 100	WALDECK
------------------------------	---------

**pH-Meter**

pH 535 Multical mit Temperaturabgleich	WTW
--	-----

**Pipetten**

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

**Pipettenspitzen**

Standartips 100 µl	EPPENDORF
Standartips 1000 µl	EPPENDORF

**Plastikbeutel**

Sterile Kunststoffbeutel (Stomacher '400'Bags)	SEWARD
--	--------

**Reagenzgläser**

Reagenzgläser 160 x 16 mm

SCHOTT

**Reagenzglas-Schüttelgerät**

Vibro-FixVF 2 JANKE & KUNKEL

IKA-LABORTECHNIK

**Sicherheitsbrenner**

Fireboy S 1000

TECNOMARA AG

Gasi Fabrik-Nr.: 94113

SCHÜTT

**Sterilbank**

Sterilbank BSB

GELAIRE®

**Stomacher**

Stomacher® 400

SEWARD

**Waagen**

Laborwaage MC1 Typ LC 6200 D

SARTORIUS

Laborwaage Typ L 2200 P

SARTORIUS

Laborwaage BABA 200

SARTORIUS

**Wattestopfen**

STERI-Wattestopfen Nr. 14

SCHUBERT

## 17 API 20E-Profile der verwendeten Keime

Keim	API 20E-Profil	Code
<i>Y. enterocolitica O:3</i>	+--- +-- +-- --+ +-+ -+- ++- +--	11145231
<i>Y. enterocolitica O:9</i>	+--- +-- +-- --+ +--+ -+- ++- +--	11547231
<i>Y. intermedia</i>	+--- +-- +-- --+ +-+ ++- +-+ +--	11545331
<i>Y. frederiksenii</i>	+--- +-- +-- --+ +-+ ++- +-+ +--	11545331
<i>Y. kristensenii</i>	+--- +-- +-- --+ +-+ --- +-+ +--	11545031
<i>S. typhimurium</i>	nicht untersucht	
<i>E. coli</i>	+--- +-- --+ --+ +-+ +-+ -+- +--	11445525
<i>P. aeruginosa</i>	-+- -+- --- -++ --- --- --+ --+	22060044
<i>P. fluorescens</i>	nicht untersucht	
<i>M. morganii</i>	--- +-- +--+ +-+ --- --- --- +--	01750005
<i>A. hydrophila</i>	++- --- --+ -++ +-+ -+- +--+ +--	30461275
<i>S. liquefaciens</i>	+-- ++- --- -++ +--+ -+- +-- +--	53067635

**18 API 20E-Ergebnisse aus den Tonsillen- und Kotproben**

Probe	API 20E Code	Keim
Probe T 1	10041235	<i>Pantoea spp.</i>
Probe T 2	00055205	<i>Pantoea spp.</i>
Probe T 2	53067635	<i>S. liquefaciens</i>
Probe T 4	00000045	<i>Non fermenter spp.</i>
Probe T 4	53067635	<i>S. liquefaciens</i>
Probe T 4	10145231	<i>Y. enterocolitica</i>
Probe T 5	53067635	<i>S. liquefaciens</i>
Probe T11	53065635	<i>S. liquefaciens</i>
Probe T 12	01740005	<i>M. morganii</i>
Probe T 15	70471265	<i>A. hydrophila</i>
Probe T 15	53065635	<i>S. liquefaciens</i>
Probe T 16	10145231	<i>Y. enterocolitica</i>
Probe T 20	30461275	<i>A. hydrophila</i>
Probe T 21	10145231	<i>Y. enterocolitica</i>
Probe T 26	10471265	<i>A. hydrophila</i>
Probe T 27	01740005	<i>M. morganii</i>
Probe T 28	01740005	<i>M. morganii</i>
Probe T 30	10145231	<i>Y. enterocolitica</i>

---

<b>Probe T 31</b>	03160005	<i>P. mirabilis</i>
<b>Probe T 31</b>	22020045	<i>P. fluorescens</i>
<b>Probe T 31</b>	10461275	<i>A. hydrophila</i>
<b>Probe T 33</b>	10145231	<i>Y. enterocolitica</i>
<b>Probe T 33</b>	7247126	<i>A. sobriae</i>
<b>Probe K 15</b>	11547231	<i>Y. enterocolitica</i>
<b>Probe K 16</b>	11547231	<i>Y. enterocolitica</i>
<b>Probe K 17</b>	11557211	<i>Y. enterocolitica</i>
<b>Probe K 19</b>	51441135	<i>E. fergusonii</i>
<b>Probe K 26</b>	01740005	<i>M. morganii</i>

## LITERATURVERZEICHNIS

ABER, R. C. (1990)

Transfusion-associated *Yersinia enterocolitica*

Transfusion **30**: 193-195

AGBONLAHOR, D.E.; ODUGBEMI, T.; DOSUNMU-OGUNBI, O (1982)

Differential and selective medium for isolation of *Yersinia enterocolitica* from stools

J. Clin. Microbiol. **15**: 599-602

AHVONEN, P. (1972)

Human yersiniosis in Finland: II. Clinical features

Ann. Clin. Res. **4**: 39-48

ALDOVÁ, E.; SOBOTKOVA, J.; BREZINOVA, A.; CERNA, J.; JANECKOVA, M.; REGRIMKOVA, I.; POKORNA, V. (1981)

*Yersinia enterocolitica* in water and foods

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B **173**: 464-470

ALDOVÁ, E.; ŠVANDOVÁ, E.; VOTÝPKA, J.; ŠOUREK, J. (1990)

Comparative study of culture methods to detect *Yersinia enterocolitica* Serogroup O3 on swine tongues

Zbl. Bakt. **272**: 306-312

ALEKSIĆ, S.; BOCKEMÜHL, J. (1984)

Proposed revision of the Wauters et al. antigenic scheme for serotyping of *Yersinia enterocolitica*

J. Clin. Microbiol. **20**: 99-102

ALEKSIĆ, S.; BOCKEMÜHL, J.; WUTHE, H. H.; ALEKSIĆ, 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

ALEKSIĆ, S.; BOCKEMÜHL, J. (1990)

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

ALEKSIĆ, S.; BOCKEMÜHL, J. (1996)

Untersuchungen von *Yersinia*-Stämmen aus Deutschland, 1993-1994  
Bundesgesundheitsblatt **3**: 94-97

ANDERSEN, J. K. (1988)

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

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

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

ARNOLD, T.; NEUBAUER, H.; NIKOLAOU, K.; ROESLER, U.; HENSEL, A. (2004)

Identification of *Yersinia enterocolitica* in minced meat: A comparative analysis of  
API 20E, *Yersinia* identification kit and a 16S rRNA-based PCR method  
J. Vet. Med. B **51**: 23-27

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

Alkali methods for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods  
Appl. Environ. Microbiol. **39**: 135-140

BAUMGART, J. (1999)

Kapitel 5: Bestimmung der Keimzahl  
In: Baumgart, J. (Hrsg.), Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, S. 71-98  
Behr's Verlag, Hamburg

BERCOVIER, H.; BRENNER, D. J.; URSING, J.; STEIGERWALT, A. G.; FANNING, G. R.;  
ALONSO, J. M.; CARTER, G. P.; MOLLARET, H. H. (1980)

Characterization of *Yersinia enterocolitica* *sensu stricto*  
Curr. Microbiol. **4**: 201-206

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

Genus XIV. *Yersinia*

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

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

BERCOVIER, H.; BRAULT, J.; COHEN, S.; MELIS, R.; LAMBERT, T.; MOLLARET, H. H. (1984)

A new isolation medium for the recovery of *Yersinia enterocolitica* from environmental sources

Curr. Microbiol. **10**: 121-124

BHADURI, S.; COTTRELL, B. (1997)

Direct detection and isolation of plasmid-bearing virulent serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various foods

Appl. Environ. Microbiol. **63**: 4952-4955

BHADURI, S.; COTTRELL, B.; PICKARD, A. R. (1997)

Use of a single procedure for selective enrichment, isolation, and identification of plasmid-bearing virulent *Yersinia enterocolitica* of various serotypes from pork samples

Appl. Environ. Microbiol. **63**: 1657-1660

BLACK, R. E.; JACKSON, R. J.; TSAI, T.; MEDVERSKY, M.; SHAYEGANI, M.; FEELEY, J. C.; MacLEOD, K. I. E.; WAKELER, A. M. (1978)

Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk

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

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

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

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

BOCKEMÜHL, J. (1999)

*Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis*

In: Baumgart, J. (Hrsg.), Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, S. 168-176  
Behr's Verlag, Hamburg

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

Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria  
Int. J. Food Microbiol. **30**: 9-25

BOTTONE, E.J. (1997)

*Yersinia enterocolitica*: The Charisma Continues  
Clin. Microbiol. Rev. **10**: 257-276

BOTTONE, E.J. (1999)

*Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates  
Microb. Infekt. **1**: 323-333

BOYCE, J. M.; EVANS, D. J.; EVANS, D. G.; DUPONT, H. L. (1979)

Production of heat-stable, methanol-soluble enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*  
Infect. Immun. **25**: 532-537

BRENNER, D. J. (1981)

Classification of *Yersinia enterocolitica*  
In: Bottone, E. J. (Hrsg.), *Yersinia enterocolitica*  
CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida: 1-8

BROCKLEHURST, T. F.; LUND, B. M. (1990)

The influence of pH, temperature, and organic acids on the initiation of growth of  
*Yersinia enterocolitica*  
J. Appl. Microbiol. **69**: 390-397

BRUBAKER, R. R. (2003)

Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to *Yersiniae*: roles of Yops and LcrV (V-  
antigen)  
Infect. Immun. **71**: 3673-3681

BUCHER, M. (2001)

Ein Beitrag zur Epidemiologie von *Yersinia enterocolitica* in Schlachtnebenprodukten vom  
Schwein unter besonderer Berücksichtigung methodischer Aspekte  
Diss. med. vet., LMU München

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

Vorkommen von Yersinien-Arten in Kälbern und Jungrindern  
Fleischwirtsch. **9**: 125-127

BUCHER, M.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; GERHARDT, M.; STOLLE, A. (2004)

Stabile Prävalenz von *Y. enterocolitica* in Schweinetonsillen 2000 und 2004  
44. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, DVG, Garmisch 2004

CAPILLA, S.; GONI, P.; RUBIO, M. C.; CASTILLO, J.; MILLAN, L.; CERDA, P.; SAHAGUN, J.; PITART, C. BELTRAN, A.; GOMEZ-LUS, R. (2003)

Epidemiological study of resistance to Naldixic acid and other antibiotics in clinical  
*Yersinia enterocolitica* O:3 isolates  
J. Clin. Microbiol. **41**: 4876-4878

CASEY, M. F.; GILLIGAN, P. H.; SMILEY, M. L. (1987)

*Yersinia enterocolitica* meningitis and osteomyelitis: a case report  
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **8**: 47-50

CHIESA, C.; PACIFICO, L.; RENZULLI, F.; MIDULLA, M. (1987)

Gastrointestinal features of *Yersinia enterocolitica* infections  
Gastroenterology **93**: 1147-1148

CHRISTENSEN, W. B. (1946)

Urea decomposition as means of differentiating *Proteus* und *Paracolon* cultures from each  
other and from *Salmonella* and *Shigella* types  
J. Bact. **52**: 461-466

CHRISTENSEN, S. G. (1980)

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

CIEBIN, B. W.; WAN, K.; JAMIESON, F. B. (2001)

A simple biochemical screening test to determine pathogenic strains of *Y. enterocolitica*  
Abstr. 101<sup>st</sup> ASM General Meeting, Abstr. C-177

CORNELIS, G.R.; LAROCHE, Y.; BALIGNAD, G.; SORY, M.-P.; WAUTERS, G. (1987)

*Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness

Rev. Infect. Dis. **9**: 64-87

CORNELIS, G.R. (1998)

The *Yersinia* deadly kiss

J. Bacteriol. **180**: 5495-5504

CORNELIS, G.R.; BOLAND, A.; BOYD, A. P.; GEUIJEN, C.; IRIARTE, M.; NEYT, C.; SORY, M. P.; STAINIER, I. (1998)

The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome

Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**: 1315-1352

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

*Yersinia enterocolitica*

New Engl. J. Med. **321**: 16-24

COX, N. A.; BAILEY, J. S.; DEL CORRAL, F.; SHOTTS, E. B. (1990)

Comparison of enrichment and plating media for isolation of *Yersinia*

Poultry Sci. **69**: 686-693

CROWE, M.; ASHFORD, K.; ISPAHANI, P. (1996)

Clinical features and antibiotic treatment of septic arthritis and osteomyelitis due to

*Yersinia enterocolitica*

J. Med. Microbiol. **45**: 302-309

DAVEY, G. M.; BRUCE, J.; DRYSDALE, E. M. (1983)

Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from the faeces of cows.

J. Appl. Bacteriol. **55**: 439-443

DE BOER, E.; HARTOG, B. J.; OOSTEROM, J. (1982)

Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in Poultry Products

J. Food Prot. **45**: 322-325

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

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

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

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

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

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

DE BOER, E. (1992)

Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods

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

DE BOER, E. (1995)

Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods

Contrib. Microbiol. Immunol. **13**: 71-73

DEDIÉ, K.; BOCKEMÜHL, J.; KÜHN, H.; VOLKMER, K.-I.; WEINKE, T. (1993)

Yersiniosen mit enteritischem Verlauf beim Menschen, S.377-398

In: Lehrbuch über bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch, Epidemiologie, Pathologie,

Klinik, Diagnostik und Bekämpfung

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

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

Contribution to urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*

Infect. Immun. **63**: 3790-3795

DE KONING-WARD, T. F.; ROBINS-BROWNE, R. M. (1997)

A novel mechanism of urease regulation in *Yersinia enterocolitica*

FEMS Microbiol. Lett. **147**: 221-226

DEVENISH, J. A.; SCHIEMANN, D. A. (1982)

An abbreviated scheme for identification of *Yersinia enterocolitica* isolated from food enrichments on CIN (cefsulodin-irgasan-novobiocin) agar

Can. J. Microbiol. **27**: 937-941

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

Short-comings of irgasan ticarcillin chlorate broth for the enrichment of *Yersinia enterocolitica* biotype 2, serotype 9 from meat  
Int. J. of Food Microbiol. **23**: 231-237

DOYLE, M. P.; HUGDAHL, M. B.; TAYLOR, S. L. (1981)

Isolation of virulent *Yersinia enterocolitica* from porcine tongues  
Appl. Environ. Microbiol. **42**: 661-666

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

Improved procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from meats  
Appl. Environ. Microbiol. **45**: 127-135

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

Medium for isolation of *Yersinia enterocolitica*  
J. Clin. Microbiol. **10**: 180-183

EISS, J. (1975)

Selective culturing of *Yersinia enterocolitica* at a low temperature  
Scand. J. Infect. Dis. **7**: 249-251

EWING, W.; ROSS, A.; BRENNER, D.; FANNING, G. (1978)

*Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium  
Int. J. syst. Bacteriol. **28**: 37-44

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

Pyrazinamidase, CR-MOX Agar, Salicin fermentation-Esclulin hydrolysis, and D-Xylose fermentation for identifying pathogenic serotypes of *Yersinia enterocolitica*  
J. Clin. Microbiol. **30**: 2589-2594

FREDERIKSEN, W. (1964)

A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria, "Bacterium enterocoliticum" and "Pasteurella X"  
Proc. XIVth Scand. Congr. Pathol. Microbiol. Oslo: pp.103-104

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; AUTIO, T.; KORKEALA, H. (1999)

Efficient subtyping of *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 with pulsed-field gel electrophoresis

Lett. Appl. Microbiol. **29**: 308-312

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

Correspondence of genotypes of sporadic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 strains from human and porcine sources

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

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

High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on pig offal in Southern Germany: a slaughtering technique problem

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

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

Transmission of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 to pets via contaminated pork

Lett. Appl. Microbiol. **127**: 375-378

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; BUCHER, M.; HANK, C.; STOLLE, A. (2001d)

Auswertung verschiedener Anreicherungsmethoden für den Nachweis von *Yersinia enterocolitica* 4/O:3

42. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Ober-Mörlen, 2001: 449-452

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; NISKANEN, T.; NEUBAUER, H.; LAUKKANEN, R.; KORKEALA, H. (2002)

Characterisation of sucrose-negative *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 isolates recovered from pig tonsils

Int. J. Food Microbiol. **75**: 19-25

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

Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem

Clin. Microbiol. Reviews **16**: 220-229

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; NISKANEN, T.; BUCHER, M.; KORTE, T.; STOLLE, A; KORKEALA, H (2003)

Different *Yersinia enterocolitica* 4:O3 genotypes found in pig tonsils in southern Germany and Finland

System. Appl. Microbiol. **26**: 132-137

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

Different genotypes of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains widely distributed in butcher shops in the Munich area

Int. J. Food Microbiol. **95**: 89-94

FUKUSHIMA, H.; NAKAMURA, R.; ITO, Y.; SAITO, K.; TSUBAKURA, M. (1983)

Ecological studies of *Yersinia enterocolitica*

Vet. Microbiol. **8**: 469

FUKUSHIMA, H. (1985)

Direct isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from meat

Appl. Environ. Microbiol. **50**: 710-712

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

Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* biotype 3B serotype O3 inhibited on Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin agar

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

FUKUSHIMA, H. (1987)

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

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

FUKUSHIMA, H.; MARYAMA K.; OMORI, I.; ITO, K.; IORIHARA, M. (1989)

Role of the contaminated skin of pigs in fecal *Yersinia* contamination of pig carcasses at slaughter

Fleischwirtsch. **69**: 369-372

FUKUSHIMA, H.; MARUYAMA K.; OMORI, I.; ITO, K.; IORIHARA, M. (1990)

Kontamination von Schweinen mit *Yersinia* im Schlachthaus

Fleischwirtsch. **70**: 1330-1333

FUNK, J. A.; TROUTT, H. F.; ISAACSON, R. E.; FOSSLER, C. P. (1998)

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

FUNK, J. A.; TROUTT, H. F.; DAVIS, S. A.; FOSSLER, C. P. (2000)

In vitro susceptibility of *Yersinia enterocolitica* isolated from the oral cavity of swine  
J. Food Prot. **63**: 395-399

GARIN-BASTUJI, B.; HUMMEL, N.; GERBIER, G.; CAU, C.; POUILLOT, R.; DaCOSTA, M.; FONTAINE, J.-J. (1999)

Non specific serological reactions in the diagnosis of bovine brucellosis: experimental oral infection of cattle with repeated doses of *Yersinia enterocolitica* O:9  
Vet. Microbiol. **66**: 223-233

GEMSKI, P.; LAZERE, J.R.; CASEY, T. (1980)

Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*  
Infect. Immun. **27**: 682-685

GRAU, F. H. (1981)

Role of pH, lactate, and anaerobiosis in controlling the growth of some fermentative gram-negative bacteria on beef  
Appl. Environ. Microbiol. **42**: 1043-1050

GRIPENBERG-LERCHE, C. ZHANG, L.; AHTONEN, P.; TOIVANEN, P.; SKURNIK, M. (2000)

Construction of urease-negative mutants of *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and O:8:  
role of urease in virulence and arthritogenicity  
Infect. Immun. **68**: 942-947

GROSDNET, N.; MARIDONNEAU-PARINI, I.; SORY, M.-P.; CORNELIS, G. R. (2002)

Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis  
Infect. Immun. **70**: 4165-4176

HÄSSIG, A.; KARRER, J.; PUSTERLA, F. (1949)

Über Pseudotuberkulose beim Menschen  
Schweiz. Med. Wschr. **79**: 971-973

HAHN, G (1989)

Yersinia - Yersiniosen

In: Walther Heeschen (Hrsg.), Pathogene Mikroorganismen und deren Toxine in Lebensmitteln tierischer Herkunft  
Behr's Verlag, Hamburg

HANNA, M. O.; ZINK, D. L.; CARPENTER, Z. L.; VANDERZANT, C. (1976)

*Yersinia enterocolitica*-like organisms from vacuum-packed beef and lamb  
J. Food Sci. **41**: 1254

HANNA, M. O.; STEWART, J. C.; CARPENTER, Z. L.; VANDERZANT, C. (1977a)

Effect of heating, freezing, and pH on *Yersinia enterocolitica*-like organisms from meat  
J. Food Prot. **40**: 689-692

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

Development of *Yersinia enterocolitica* on raw and cooked beef and pork at different temperatures  
J. Food Sci. **42**: 1180-1184

HANSKI, C. KUTSCHKA, U.; SCHMORANZER, H. P.; NAUMANN, M.; STALLMACH, A.; HAHN, H.; MENGE, H.; RIECKEN, E. O. (1989)

Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis  
Infect. Immun. **57**: 673-678

HARIHARAN, H.; GILES, J. S.; HEANEY, S. B.; LECLERC, S. M.; SCHURMAN, R. D. (1995)

Isolation, serotypes, and virulence-associated properties of *Yersinia enterocolitica* from the tonsils of slaughter hogs  
Can. J. Vet. Res. **59**: 161-166

HARMON, M. C.; YU, C. L.; SWAMINATHAN, B. (1983)

An evaluation of selective differential plating media for the isolation of *Y. enterocolitica* from experimentally inoculated fresh ground pork homogenate  
J. Food Sci. **48**: 6-9

HARTUNG, M.; GERIGK, K. (1991)

*Yersinia* in effluents from the food-processing industry  
Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. **10**: 799-811

HAWARI, A. D.; AMTSBERG, G.; KIRPAL, G. (1981)

Kulturelle und serologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica*-Infektionen bei Schweinen und Rindern  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **94**: 404-409

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

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

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

HEIM, F.; FEHLHABER, K.; SCHEIBNER, G. (1983)

Untersuchungen über das Verhalten von *Yersinia enterocolitica* bei unterschiedlichen Temperaturen und verschiedenen Pökelsalzkonzentrationen  
Arch. exper. Vet. med. Leipzig **38**: 720-734

HEIN, J; KNAUFF, H. G. (1987)

Die Yersiniosis in Deutschland  
Dtsch. med. Wschr. **103**: 490-491

HESSEMAN, J.; ALGERMISSSEN, B.; LAUFS, R. (1984)

Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*  
Infect. Immun. **46**: 105-110

HESSEMAN, J.; LAUFS, R. (1985)

Double Immunofluorescence Microscopic Technique for accurate differentiation of extracellular and intracellular located bacteria in cell culture  
J. Clin. Microbiol. **22**: 168-175

HESSEMANN, J.; GRÜTER, L. (1987)

Genetic evidences that the outer membrane protein YOP1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagozytosis resistance to human epithelial cell  
FEMS Microbiol. Lett.: **40**: 37-41

HEESEMANN, J. (1990)

Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische Methoden  
Immun. Infect. **18**: 186-191

HILBERT, F.; MAYRHOFER, S.; SMULDERS, F.J.M. (2003)

Rapid urease screening of *Yersinia* on CIN agar plates  
Int. J. Food Microbiol. **84**: 111-115

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

Clinical aspects, diagnosis and therapy of *Yersinia enterocolitica* infections  
Immun. Infect. **18**: 192-197

HOORFAR, J.; HOLMVIG, C. B. F. (1999)

Evaluation of culture methods for rapid screening of swine faecal samples for *Yersinia enterocolitica* O:3 / Biotype 4  
J. Vet. Med. B **46**: 189-198

HUDSON, J. A.; MOTT, S. J. (1993)

Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cooked beef under refrigeration and mild temperature abuse  
Food Microbiol. **10**: 429-437

HURVELL, B. (1981)

Zoonotic *Y. enterocolitica* infection: Host range, clinical manifestation and transmission between animals and man  
In: Bottone, E. J. (Hrsg.), *Yersinia enterocolitica*, S. 145-159  
CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida

HUSSEIN, H. M.; FENWICK, S. G.; LUMSDEN, J. S. (2001)

A rapid and sensitive method for the detection of *Yersinia enterocolitica* strains from clinical samples  
Lett. Appl. Microbiol. **33**:445-449

ISBERG R. R. (1990)

Pathways for the penetration of enteroinvasive *Yersinia* into mammalian cells  
Mol. Biol. Med. **7**: 73-82

ISO (2003)

Microbiology – general guidance for the detection of presumptive pathogenic  
*Yersinia enterocolitica* ISO 10273  
International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland

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

JACOBS, J.; JAMAER, D.; VANDEVEN, J.; WOUTERS, M.; VERMYLEN, C.;  
VANDEPITTE, J. (1989)

*Yersinia enterocolitica* in donor blood: A case report and review  
J. Clin. Microbiol. **27**: 1119-1121

JIANG, G. C.; KANG, D. H.; FUNG, D. Y. C. (2000)

Enrichment procedures and plating media for isolation of *Yersinia enterocolitica*  
J. Food Prot. **63**: 1483-1486

JOHNSON, J. L. (1998)

Isolation & identification of pathogenic *Yersinia enterocolitica* from meat and poultry  
products  
In: USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook, 3<sup>rd</sup> Edition 1998, Chapter 9

KANDOLO K.; WAUTERS, G. (1985)

Pyrazinamidase Activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms  
J. Clin. Microbiol. **21**: 980-982

KANEKO, S.; MARUYAMA, T. (1989)

Evaluation of enzyme immunoassay for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*  
and *Yersinia pseudotuberculosis* strains  
J. Clin. Microbiol. **27**: 748-751

KAPPERUD, G; BERGAN, T. (1984)

Biochemical and serological characterisation of *Yersinia enterocolitica*  
In. Bergan, N. (Hrsg.), Methods in microbiology, S. 295-344  
Academic press, London

KAPPERUD, G. (1991)

*Yersinia enterocolitica* in food hygiene  
Int. J. Food Microbiol. **12**: 53-66

KAY, B. A.; WACHSMUTH, K.; GEMSKI, P. (1982)

New virulence-associated plasmid in *Yersinia enterocolitica*  
J. Clin. Microbiol. **15**: 1161-1163

KAYSER, H.; BIENZ, K. A.; ECKERT, J.; ZINKERNAGEL, R. M. (1998)

Medizinische Mikrobiologie: Verstehen – Lernen - Nachschlagen  
Georg Thieme Verlag Stuttgart

KERBER, J. (1997)

Untersuchungen zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in den Luftwegen von  
Schweineschlachttierkörpern mit bekannten sowie unbekanntem serologischen Status  
und Nachweis von Yersinien im daraus hergestellten Wurstbrät  
Diss. med. vet., FU Berlin

KHALAFALLA, F. A. (1990)

*Yersinia enterocolitica* in processed poultry  
Fleischwirtsch. **70**: 305-306

KHARE, S. S.; KAMAT, A. S.; DOCTOR, T.R.; NAIR, P.M. (1996)

Incidence of *Yersinia enterocolitica* and related species in some fish, meat and meat  
products in India  
J. Sci. Food Agric. **72**: 187-195

KIESEWALTER, J. (1992)

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

KING, S.; METZGER, W. I. (1968)

A new plating medium for the isolation of enteric pathogens  
Appl. Microbiol. **16**: 577-578

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

*Yersinia* spp. in frischer Rohwurst – Untersuchungen zum Vorkommen und zur  
Charakterisierung der *Yersinia enterocolitica*-Isolate  
Fleischwirtsch. **74**: 1101-1103

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

Model experiments to establish behaviour of *Yersinia enterocolitica* O:9 strains in various  
types of fresh dry sausages  
J. Appl. Bacteriol. **80**: 10-12

KNAPP, W.; THAL, E. (1973)

Die biochemische Charakterisierung von *Yersinia enterocolitica* (syn. „*Pasteurella X*“) als  
Grundlage eines vereinfachten O-Antigenschemas  
Zbl. Bakt. Hyg. A **223**: 88-105

KNAPP, W. (1980)

Enterale Yersiniosen  
Dtsch. Ärztebl. **77**: 1671-1676

KNAPP, W. (1981)

*Yersinia*-Arthritis: Ein Beitrag zur Häufigkeit enteraler Yersiniosen und ihrer Diagnose  
Münch. Med. Wschr. **123**: 1903-1907

KNAPP, W. (1983)

*Yersinia enterocolitica*  
Bundesgesundhbl. **26**: 381-389

KOCH, C.U. (2003)

Ein Beitrag zur Epidemiologie und Verbreitung von pathogenen *Yersinia enterocolitica*  
4/O:3 in Münchener Metzgereien  
Diss. med. vet., LMU München

KOUNEV, Z. (1989)

A research note: Effects of enrichment medium and incubation temperature on recovery of *Yersinia enterocolitica* from cooked sausage  
J. Food Prot. **52**: 818-820

KWAGA, J.; IVERSEN, J. O.; SAUNDERS, J. R. (1990)

Comparison of two enrichment protocols for the detection of *Yersinia* in slaughtered pigs and pork products  
J. Food Protect. **53**: 1047-1049

LAIRD, W. J.; CAVENAUGH D. C. (1980)

Correlation of Autoagglutination and Virulence of *Yersiniae*  
J. Clin. Microbiol. **11**: 430-432

LANDGRAF, M.; IARIA, S. T.; FALCAO, D. P. (1993)

An improved enrichment procedure for the isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from milk  
J. Food Prot. **5**: 447-450

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

A comparison between a PCR method and a conventional culture method for detecting pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food  
J. Appl. Bacteriol. **81**: 303-308

LEE, W. H. (1977a)

Two plating media modified with Tween 80 for isolating *Yersinia enterocolitica*  
Appl. Environ. Microbiol. **33**: 215-216

LEE, W. H. (1977b)

An Assessmet of *Yersinia enterocolitica* and its presence in foods  
J. Food Prot. **40**: 486-489

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

Two modified selenite media for the recovery of *Yersinia enterocolitica* from meats  
Appl. Environ. Microbiol. **39**: 205-209

LEE, L. A.; TAYLOR, J.; CARTER, G. P.; FARMER III, 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

LÖSCHER, W.; UNGEMACH, F. R.; KROKER, R. (2003)

Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren  
Parey Verlag, Berlin, Wien

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

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

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

LOGUE, C. M.; SHERIDAN, J. J.; MC DOWELL, D. A.; BLAIR, I. S.; HEGARTY, T. (2000)

The effect of temperature and selective agents on the growth of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 in pure culture

J. Appl. Microbiol. **88**: 1001-1008

MAYRHOFER, S.; PAULSEN, P.; SMULDERS, F. J. M.; HILBERT, F. (2004)

Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry

Int. J. Food Microbiol. **97**: 23-29

MEHLMAN, I. J.; AULISIO, 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

MERILAHTI-PALO, R.; LAHESMAA, R.; GRANFORS, K; GRIPENBERG-LERCHE, C.; TOIVANEN, P. (1991)

Risk of *Yersinia* infections among butchers

Scand. J. Infect. Dis. **23**: 55-61

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

MILLER, V. L.; FARMER III, J. J.; HILL, W. E.; FALKOW, S. (1989)

The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease

Infect. Immun. **57**: 121-131

MITTAL, K. R.; TIZARD, I. R; BARNUM, D. A. (1985)

Serological cross-reactions between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9  
Int. J. Zoonoses **12**: 219-227

MOLLARET, H.; BERCOVIER, H.; ALONSO, J. (1979)

Summary of the data received at the Reference Center for *Yersinia enterocolitica*  
Contr. Microbiol. Immunol. **5**: 174-184

MURIANA, P.M. (2002)

*Yersinia* – Virulence and pathogenesis  
[www.okstate.edu/ag/tapc/fsw/yersinia/yersinpm.htm](http://www.okstate.edu/ag/tapc/fsw/yersinia/yersinpm.htm)

NAKTIN, J.; BEAVIS, K. G. (1999)

*Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*  
Clin. Lab. Med. **19**: 523-536

NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS (1996)

*Yersinia enterocolitica* – Detection in foods  
Nordic committee on food analysis, **117**, 3<sup>rd</sup> edition

NESBAKKEN, T.; KAPPERUD, G. (1985)

*Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria in Norwegian slaughter  
pigs  
Int. J. Food Microbiol. **1**: 301-309

NESBAKKEN, T. (1988)

Enumeration of *Yersinia enterocolitica* O:3 from the porcine oral cavity, and its occurrence  
on cut surfaces of pig carcasses and the environment in a slaughterhouse  
Int. J. Food Microbiol. **6**: 287-293

NESBAKKEN, T. (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.; NERBRINK, E.; RØTTERUD, O.-J.; BORCH, E. (1994)

Reduction of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria* spp. on pig carcasses by enclosure of the rectum during slaughter  
Int. J. Food Microbiol. **23**: 197-208

NESBAKKEN, T.; ECKNER, K.; HØIDAL, H. K.; RØTTERUD, O.-J. (2003)

Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures  
Int. J. Food Microbiol. **80**: 231-240

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

Comparison of systems for identification and differentiation of species within the genus *Yersinia*  
J. Clin. Microbiol. **36**: 3366-3368

NEUBAUER, H.; MOLITOR, M.; RAHALISON, L.; ALEKSIC, S.; BACKES, H.; CHANTEAU, S.; MEYER, H. (2000)

A miniaturised semiautomated system for the identification of *Yersinia* species within the genus *Yersinia*  
Clin. Lab. **46**: 561-567

NEUBAUER, H.; SPRAGUE, L. D.; SCHOLZ, H.; HENSEL, A. (2001a)

Die Diagnostik der *Yersinia enterocolitica* Infektionen: Eine Übersicht über klassische Nachweistechniken und neue molekularbiologische Methoden  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **114**: 1-7

NEUBAUER, H.; SPRAGUE, L. D.; SCHOLZ, H.; HENSEL, A. (2001b)

*Yersinia enterocolitica*-Infektionen: 1. Bedeutung bei Tieren  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **114**: 8-12

NEUBAUER, H.; SPRAGUE, L. D.; SCHOLZ, H.; HENSEL, A. (2001c)

*Yersinia enterocolitica*-Infektionen: 2. Bedeutung bei Menschen  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **114**: 81-87

NEU, H. C.; SCULLY, B. E. (1984)

Activity of cefsulodin and other agents against *Pseudomonas aeruginosa*  
Rev. Infect. Dis. **3**: 667-677

NILÉHN, B. (1969)

Studies on *Yersinia enterocolitica*: Growth on various solid media at 37 and 25°C  
Acta path. Microbiol. Scand. **77**: 685-697

ÖZBAS, Z. Y.; AYTAÇ, S. A. (1993)

Incidence of *Yersinia enterocolitica* in samples of pasteurized milk  
Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. **15**: 129-133

OOSTEROM, J. (1979)

Isolation and epidemiological significance of *Yersinia enterocolitica*  
Ant. Leeuwenhoek **45**: 630-633

OTTEN, H.; PLEMPER, M.; SIEGENTHALER, W. (1975)

Antibiotikafibel  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

PAI, C. H.; MORS, V. (1978)

Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*  
Infect. Immun. **19**: 908-911

PAI, C. H.; DeSTEPHANO, L. (1982)

Serum resistance associated with virulence in *Yersinia enterocolitica*  
Infect. Immun. **35**: 605-611

PATCHING, J. W.; ROSE, A. H. (1970)

The effects and control of temperature  
Methods in Microbiol. **2**: 23-38

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

PERRY, R. D.; BRUBAKER, R. R. (1983)

Vwa<sup>+</sup> pheotype of *Yersinia enterocolitica*

Infect. Immun. **40**: 166-171

PHAM, J. N.; BELL, S. M.; LANZARONE, J. Y. (1991)

A study of the beta-lactamases of 100 clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*

J. Antimicrob. Chemother. **28**: 19-24

PHAM, J. N.; BELL, S. M.; MARTIN, L.; CARNIEL, E. (2000)

The  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactam antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica*

J. Antimicrob. Chemo. **46**: 951-957

PIERSON, D. E.; FALKOW, S. (1990)

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

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

PIERSON, D. E.; FALKOW, S. (1993)

The *ail* gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing

Infect. Immun. **61**: 1846-1852

PORTNOY, D. A.; MOSELEY, S. L.; FALKOW, S. (1981)

Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis

Infect. Immun. **31**: 775-782

PORTNOY, D. A.; WOLF-WATZ, H.; BOLIN, I.; BEEDER, A. B.; FALKOW, S. (1984)

Characterization of common virulence plasmids in *Yersinia* species and their role in the expression of outer membrane proteins

Infect. Immun. **43**: 108-114

PORTNOY, D. A.; MARTINEZ, R. J. (1985)

Role of plasmids in the pathogenicity of *Yersinia* species

Curr. Top. Microbiol. Immunol. **118**: 29-51

PRATS, G.; MIRELIS, B.; LLOVET, T.; MUÑOZ, C.; MIRO, E.; NAVARRO, F. (2000)

Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1998 in  
Barcelona  
Antimicrob. Agents Chemotherapy **44**: 1140-1145

PRESTON, M.; BROWN, S.; BORCZYK, A.; RILEY, G.; KRISHNAN, C. (1995)

Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolated in Canada from  
1972 to 1990  
Contr. Microbiol. Immunol. **13**: 175-179

PRPIC, J. K.; ROBINS-BROWNE, R. M.; DAVEY, R. B. (1983)

Differentiation between virulent and avirulent *Yersinia enterocolitica* isolates by using  
congo red agar  
J. Clin. Microbiol. **18**: 486-90

RAEVUORI, M.; HARVEY, S. M.; PICKETT; M. J.; MARTIN, W. J. (1978)

*Yersinia enterocolitica*: In vitro antimicrobial susceptibility  
Antimicrob. Agents Chemother. **13**: 888-890

RASTAWICKI, W.; GIERCZYNKI, R.; JAGIELSKI, M.; KALUZEWSKI, S.;  
JELJASZEWICZ, J. (2000)

Susceptibility of Polish clinical strains of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 to antibiotics  
Int. J. Antimicrob. Agents **13**: 297-300

REVELL, P. A.; MILLER, V. L. (2001)

Mini Review: *Yersinia* virulence: more than a plasmid  
FEMS Microbiol. Lett. **205**: 159-164

RILEY, G.; TOMA, S. (1989)

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using congo red-magnesium oxalate  
agar medium  
J.Clin.Microbiol. **27**: 213-214

ROBERT KOCH INSTITUT (2001)

Epidemiologie spezifischer Krankheiten, Yersiniose  
Jahrbuch 2001, S. 124-126

ROBERT KOCH INSTITUT (2002)

Epidemiologie spezifischer Krankheiten, Yersiniose  
Jahrbuch 2002, S. 151-154

ROBERT KOCH INSTITUT (2003)

Spezielle Krankheiten, Yersiniose  
Jahrbuch 2003, S. 159-161

ROBINS-BROWNE, R. M. (1997)

*Yersinia enterocolitica*  
In: DOYLE, BEUCHART, MONTVILLE (ed.), Food microbiology: fundamentals and  
frontiers  
American Society for Microbiology, Washington D.C., S. 192-215

ROLLE, M.; MAYR, A. (2002)

Medizinische Mikrobiologie, Infektionslehre und Seuchenlehre  
Enke Verlag

ROSE, F. B.; CAMP, C. J.; ANTES, E. J. (1987)

Family outbreak of fatal *Yersinia enterocolitica* pharyngitis  
Am. J. Med. **82**: 636-637

ROSQVIST, R.; SKURNIK, M.; WOLF-WATZ, H. (1988)

Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations  
Nature **11**: 522-524

RYSER, E. (2002)

Advanced foodborne disease: *Yersinia enterocolitica*  
[www.msu.edu/course/fsc/840/lect\\_13.pdf](http://www.msu.edu/course/fsc/840/lect_13.pdf)

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. Geogr. Med **34**: 151-154

SCHIEMANN, D. A. (1979)

Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*  
Can. J. Microbiol. **25**: 1298-1304

SCHIEMANN, D. A. (1980)

Isolation of toxigenic *Yersinia enterocolitica* from retail pork products  
J. FOOD PROT. **43**: 360-365

SCHIEMANN, D. A. (1982)

Development of a two-step enrichment procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica*  
from food  
Appl. Environ. Microbiol. **43**: 14-27

SCHIEMANN, D. A. (1983a)

Alkalotolerance of *Yersinia enterocolitica* as a basis for selective isolation from food  
enrichments  
Appl. Environ. Microbiol **25**: 22-27

SCHIEMANN, D. A. (1983b)

Comparison of enrichment and plating media for recovery of virulent strains of *Yersinia*  
*enterocolitica* from inoculated beef stew  
Journal of Food Protection **46**: 957-964

SCHIEMANN, D. A.; OLSON, S. A. (1984)

Antagonism by gram-negative bacteria to growth of *Yersinia enterocolitica* in mixed  
cultures  
Appl. Environ. Microbiol. **48**: 539-544

SCHIEMANN, D.A. (1989)

*Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis*  
Doyle, foodborne bacterial pathogens S.601-672  
Marcel Dekker, NY

SCHINDLER, P. R. (1984)

Isolation of *Yersinia enterocolitica* from drinking water in South Bavaria  
Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg B **180**: 76-84

SCHLEIFSTEIN, J. I.; COLEMANN, M. B. (1939)

An unidentified organism resembling *B. lignieri* and *Past. pseudotuberculosis*, and pathogenic for man

N Y State Med. J. **39**: 1749

SHAYEGANI, M.; MORSE, D.; DeFORGE, I.; ROOT, T.; MALMBERG PARSONS, L.; MAUPIN, P. S. (1983)

Microbiology of a major foodborne outbreak of gastroenteritis caused by *Yersinia enterocolitica* Serogroup O:8

J. Clin. Microbiol. **17**: 35-40

SHEHEE, M. W.; SOBSEY, M. D. (2004)

Development of a L-rhamnose and D-arabitol supplemented MacConkey agar to identify pathogenic *Yersinia enterocolitica* among environmental *Yersinias* in swine production wastes

J. Microbiol. Methods **57**: 289-292

SINGH, I.; VIRDI, J. S. (2004)

Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*

J. Med. Microbiol. **53**: 1065-1068

SIRIKEN, B (2004)

The presence of *Yersinia enterocolitica* and other *Yersinia* spp. in ground beef in Aydin, Turkey

Turk. J. Vet. Anim. Sci. **28**: 489-495

SOLTESZ, L. V.; SCHALEN, C.; MARDH, P. (1980)

An effective, seletive medium for *Yersinia enterocolitica* containing sodium oxalate  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. **88**: 11-16

STENGEL, G. (1986)

Zur Diagnostik und Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Wasser  
J. Vet. Med. B **33**: 82-92

STERN, N. J.; PIERSON, M. D. (1979)

*Yersinia enterocolitica*: A review of the psychrotrophic water and foodborne pathogen  
J. Food Sci. **44**: 1736-1742

STERN, N. J.; PIERSON, M. D.; KOTULA, A. W. (1980)

Effects of pH and Sodium Chloride on *Yersinia enterocolitica* growth at room and refrigeration temperatures

J. Food Sci. **45**: 64-67

STOCK, I.; WIEDEMANN, B (1999)

An in-vitro study of the antimicrobial susceptibilities of *Y. enterocolitica* and the definition of a database

J. Antimicrob. Chemother. **43**: 37-45

STOCK, I.; HEISIG, P.; WIEDEMANN, B (2000)

β-lactamase expression in *Yersinia enterocolitica* biovars 1A, 1B and 3

J. Med. Microbiol. **49**: 403-408

STOCK, I.; WIEDEMANN, B (2003)

Natural antimicrobial susceptibilities and biochemical profiles of *Yersinia enterocolitica*-like strains: *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* and *rohdei*

FEMS Immun. and Med. Microbiol. **38**: 139-152

STOLK-ENGELAAR, V.; MEIS, J.; MULDER, J.; LOEFFEN, F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. (1995)

Activity of 24 antimicrobials against *Yersinia enterocolitica*

Contr. Microbiol. Immunol. **13**: 172-174

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

A review: *Yersinia enterocolitica*

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

SZITA, J.; KALI, M.; REDEY, B. (1973)

Incidence of *Yersinia enterocolitica* infection in Hungary

Contrib. Microbiol. Immunol. **2**: 106-110

SZITA, J.; SVIDRÓ, A. (1976)

A five-year survey of human *Yersinia enterocolitica* infections in Hungary

Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. **23**: 191-203

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

*Yersinia enterocolitica* infections and pork: The missing link  
The Lancet I: 1129-1132

TORRA, S.; BUDU-AMOAKO, E.; ABLETT, R.F.; SMITH, J. (1992)

Effects of high-temperature short-time pasteurization, freezing and thawing and constant freezing, on the survival of *Yersinia enterocolitica* in Milk  
J. Food Prot. 55: 803-805

TORRA, S.; BUDU-AMOAKO, E.; ABLETT, R.F.; SMITH, J. (1994)

Evaluation of different antimicrobial agents used as selective supplements for isolation and recovery of *Yersinia enterocolitica*  
J Appl Bacteriol. 77: 67-72

TREBESIUS, K; HARMSEN, D.; RAKIN, A.; SCHMELZ, 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

TZELEPI, E.; ARVANITIDOU, M.; MAVROIDI, A.; TSAKRIS, A. (1999)

Antibiotic susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* and *Y. intermedia* isolates from aquatic environments  
J. Med. Microbiol. 48: 157-160

VAN NOYEN ET AL. (1980)

Nonvalue of cold enrichment of stools for isolation of *Y. enterocolitica* serotypes 3 and 9 from patients  
J. Clin. Microb. 11: 127-131

VAN PEE, W.; STRAGIER, J. (1979)

Evaluation of some cold enrichment and isolation media for the recovery of *Yersinia enterocolitica*  
Antonie Van Leeuwenhoek 45: 465-477

VARNAM und EVANS (1991)

Foodborne pathogens - an illustrated text  
Wolf publishing Ltd, London, S. 131-157

VICHENROJ, K.; FUNG, D. Y. C. (1996)

The selective effects of pH, antibiotic and sodium chloride in dye containing medium on the growth of *Y. enterocolitica*

In: Food Safety Consortium Annu. Meet. Rep. 1996: 192-197

Food Safety Consortium, Kansas City, Mo

VOGT, S. (1996)

Untersuchungen zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Feinkostsalaten, cremehaltigen Backwaren und Speiseeis

37. Tagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygiene, DVG, Garmisch-Partenkirchen 1996

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

A comparison of media and methods for the recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria from milk containing simulated raw milk microfloras  
J Appl Bacteriol. **60**: 175-183

WALKER, S. J.; BROOKS, J. (1993)

Survey of the incidence of *Aeromonas* and *Yersinia* species in retail foods  
Food Control **4**: 34-40

WANNET, W. J. B.; REESSINK, M.; BRUNINGS, H. A.; MAAS, H. M. E. (2001)

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive duplex PCR assay  
J. Clin. Microbiol. **39**: 4483-4486

WAUTERS, G. (1970)

Contribution à l'étude de *Yersinia enterocolitica*  
thèse d'agrég., Vander, Louvain 1970

WAUTERS, G. (1973)

Improved methods for the isolation and the recognition of *Yersinia enterocolitica*  
Cont. Microbiol. Immun. **2**: 68-70

WAUTERS, G. (1981)

Antigens of *Yersinia enterocolitica*  
In: Bottone, E. (ed.), *Yersinia enterocolitica*  
CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 41-53

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

Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*  
Contrib. Microb. Immunol **9**: 14-21

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

New enrichment method for isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* Serogroup O:3  
from pork  
Appl. Environ. Microbiol. **54**: 851-854

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

Modified enrichment broth for isolation of *Yersinia enterocolitica* from nonfood sources  
Appl. Environ. Microbiol. **45**: 468-471

WEAGANT, S. D. (1998)

*Yersinia enterocolitica*  
[www.seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/Chapt21.htm](http://www.seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/Chapt21.htm)

WEBER, A.; KNAPP, W. (1981a)

Über die jahreszeitliche Abhängigkeit des Nachweises von *Yersinia enterocolitica* und  
*Yersinia pseudotuberculosis* in Tonsillen gesunder Schlachtschweine  
Zentralbl Bakt. Mikrob. Hyg. A **250**: 78-83

WEBER, A.; KNAPP, W. (1981b)

Nachweis von *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* in Kotproben  
gesunder Schlachtschweine in Abhängigkeit von der Jahreszeit  
Zbl. Vet. Med. B **28**: 407-413

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

Untersuchungen zum Vorkommen von humanpathogenen *Yersinia enterocolitica* bei  
Katzen  
Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. **94**: 325-327

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

Vergleichende Anwendung von zwei Anreicherungsverfahren und fünf Selektivnährböden  
zur Isolierung von *Yersinia enterocolitica* aus Tonsillen von Schlachtschweinen  
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A **250**: 72-77

WEBER, A.; LEMBKE, C.; SCHAFER, R. (1983)

Vergleichende Anwendung von zwei im Hande erhältlichen Sewlektivnährböden zur Isolierung von *Yersinia enterocolitica* aus Tonsillen von Schlachtschweinen  
Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B **30**: 532-536

WEISSFELD, A. S.; SONNENWIRTH, A. C. (1980)

*Yersinia enterocolitica* spp. in adults with gastrointestinal disturbances: need for cold enrichment  
J. Clin. Microbiol. **11**: 196-197

WEISSFELD, A. S.; SONNENWIRTH, A. C. (1982)

Rapid isolation of *Yersinia* spp. from feces  
J. Clin. Microbiol. **15**: 508-510

WEYNANTS, V.; TIBOR, A.; DENOEL, P. A.; SAEGERMAN, C.; GODFROID, J.; THIANGE, P.; LETESSON, J.-J. (1996)

Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests  
Vet. Microbiol. **48**: 101-112

WHITE, D. G.; ZHAO, S.; SIMJEE, S.; WAGNER, D. D.; McDERMOTT, P. F. (2002)

Antimicrobial resistance of foodborne pathogens  
Microbs Infect. **4**: 405-412

WINBLAD, S. (1967)

Studies on serological typing of *Yersinia enterocolitica*  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. **187**: 115

WORMERS, G. P.; KEUSCH, G. T. (1981)

*Yersinia enterocolitica* : Clinical observations  
In: Bottone, E. J. (ed.) *Yersinia enterocolitica* CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida: 83-93

WUTHE, H.-H.; ALEKSIĆ, S. (1992)

*Yersinia enterocolitica* Serovar 1, 2a, 3 Biovar 3 in Chinchillas  
Zbl. Bakt. **277**: 403-405

WUTHE, H.-H.; ALEKSIĆ, S. (1997)

*Yersinia enterocolitica* Serovar 2a, 2b, 3:b,c Biovar 5 bei Infektionen von Feldhase und Schaf

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **110**: 176-177

ZCT Zeitschrift für Chemotherapie (1981)

Cefsulodin – das erste Schmalspektrum-Cephlosporin gegen Pseudomonas

ZCT **3**

ZECHNER K. (2003)

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

Diss. med. vet., LMU München

ZHENG, X. B.; XIE, C. (1996)

Isolation, characterization and epidemiology of *Yersinia enterocolitica* from humans and animals

J. Appl. Bacteriol. **81**: 681-684

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Biochemische Differenzierung der <i>Yersinia</i> -Spezies (ALEKSIĆ und BOCKEMÜHL 1990, VARNAM und EVANS 1991, DEDIĆ et al. 1993)	5
Tabelle 2: Charakteristische Eigenschaften von <i>Y. enterocolitica</i> (nach BRENNER 1981; KAPPERUD und BERGAN 1984)	7
Tabelle 3: Biotypisierungsschema von <i>Y. enterocolitica</i> nach WAUTERS et al. (1987)	10
Tabelle 4: Klinisches Bild der Yersiniose in Abhängigkeit vom Alter des Patienten (nach KNAPP 1980, HOOGKAMP-KORSTANJE und DE KONING 1990)	23
Tabelle 5: Selektivanreicherungsverfahren	35
Tabelle 6: Selektivnährböden mit der jeweiligen Bebrütungstemperatur und –dauer zum Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i>	40
Tabelle 7: Selektivität von CIN-Agar gegenüber gramnegativen Bakterien (nach SCHIEMANN 1979)	42
Tabelle 8: Aufstellung über Nährstoffe, Indikatoren, pH und Inkubationszeiten der festen <i>Y. enterocolitica</i> Selektivnährböden	54
Tabelle 9: Selektivfaktoren in den verschiedenen Selektivnährböden	58
Tabelle 10: Herkunft der verwendeten Keime	61
Tabelle 11: Kombinationen für den Urea-Basisagar	65
Tabelle 12: Selektivfaktoren für den Urea-Basisagar	67
Tabelle 13: Weitere Selektivfaktoren für den Urea-Basisagar	68
Tabelle 14: Untersuchung von Tonsillen- und Kotproben mit verschiedenen Agarkombinationen	70
Tabelle 15: Darstellung der Impftests	74
Tabelle 16: Ablesetabelle des API 20E Testsystems	80
Tabelle 17: Zusammensetzung des Urea-Basisagars	82

Tabelle 18: Ergebnisse der Kolonienmorphologie für verschiedene Agarkombinationen	84
Tabelle 19: Ergebnisse der Kolonienmorphologie auf dem Urea-Basisagar mit weiteren Selektivfaktoren	87
Tabelle 20: Positiver <i>Y. enterocolitica</i> Nachweis auf Agar I B und Agar I C bei 34 Tonsillenproben	90
Tabelle 21: Ergebnisse Kotuntersuchung	92
Tabelle 22: Optimale Zusammensetzung des Urea-Selektivagars:	93
Tabelle 23: Kolonienmorphologie der getesteten Keime ( $10^4$ KbE/g) auf dem Urea-Selektivagar (aerob bebrütet bei $+30^\circ\text{C}$ )	95
Tabelle 24: Nachweiskonzentration der Yersinien in der beimpften Hackfleischprobe nach 24h	102
Tabelle 25: Ergebnisse der untersuchten Hackfleischproben	103

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Internationales Standardverfahren (ISO 10273:2003) zum Nachweis mutmaßlicher pathogener <i>Y. enterocolitica</i> .....	32
Abbildung 2: Anreicherung und Isolierung von <i>Y. enterocolitica</i> aus Schweinetonsillen und Schweinekot .....	72
Abbildung 3: Methode zur Beimpfung von Hackfleischproben .....	76
Abbildung 4: Typisches Wachstum von <i>Y. enterocolitica</i> Kolonien auf Agar I C ....	97
Abbildung 5: Wachstum von <i>M. morganii</i> auf Agar I C.....	97
Abbildung 6: API-Profil von <i>Y. enterocolitica</i> (links) und <i>Y. kristensenii</i> (rechts) ....	98
Abbildung 7: API-Profil von <i>M. morganii</i> (links) und <i>S. liquefaciens</i> (rechts).....	98

## **DANKSAGUNG**

Mein ausdrücklicher und herzlicher Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Andreas Stolle für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Ich danke ihm für sein Vertrauen und seine stets hilfsbereite und hervorragende Betreuung als Doktorvater.

Besonders danke ich Frau Dr. Maria Fredriksson-Ahomaa und Herrn Dr. Michel Bucher für die Einführung in die Thematik, für die organisatorische Unterstützung bei der Beschaffung der Proben, für die sowohl fachliche als auch kameradschaftliche Betreuung und die hilfreichen Tipps zum Anfertigen dieser Dissertation.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Frau U. Demuth, Frau H. Dietz, Frau I. Fitzek, Frau S. Holzmann, Frau U. Scheffler und Frau C. Wendt da Cruz für die gründliche Einweisung in das Arbeiten im mikrobiologischen Untersuchungslabor.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für ihre freundliche Hilfe und das immer gute und angenehme Arbeitsklima.

Für die Bereitstellung des Computers zur Auswertung der API 20E Codes danke ich den Mitarbeiterinnen aus der Milch.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern von ganzem Herzen bedanken, dass sie mich bis heute in allen Lebenslagen unterstützt und gefördert haben. Ich danke ihnen, meiner Schwester Doris mit Armin, Sabrina und Tobias für ihre andauernde geistige und moralische Unterstützung. Besonders herzlich danken möchte ich auch meinem Freund Thomas und den Katastrohpies Bille, Caro, Conny, Gisi, Minna, Moni und Nina, dass sie immer für mich da sind.

## LEBENSLAUF

Name: Carmen Lampert

Geburtsdatum: 6. Januar 1978

Geburtsort: Memmingen

Eltern: Fritz Lampert  
Helene Lampert, geb. Schmid

Geschwister: Doris Müller

Schulbildung: 1984-1988 Grundschule in Pfaffenhausen  
1988-1997 Gymnasium in Mindelheim  
27.06.1997 Abitur

Studium: 1997-2003: Studium der Tiermedizin an der Ludwig – Maximilians - Universität München

Staatsexamen: 30. Juli 2003

Approbation: 21. August 2003

seit Oktober 2003: Doktorarbeit am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät der LMU München

seit Februar 2005 Assistenztierärztin in der Tierärztlichen Klinik Dr. Susanne Medl, Babenhausen