

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 einer Real-Time PCR-Nachweismethode für
*Yersinia enterocolitica***

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

von
Britta Hartmann
aus Stuttgart

München 2007

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

Dekan: Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Stolle
Koreferent: Prof. Dr. H. Kaltner

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

EINLEITUNG	1
LITERATURÜBERSICHT	3
1. <i>Yersinia enterocolitica</i>	3
1.1. Taxonomie und Eigenschaften	3
1.1.1. Biotyp	5
1.1.2. Serotyp	6
1.2. Pathogenitätsfaktoren	7
1.3. Pathogenese	11
1.4. Krankheitsbild	13
1.5. Epidemiologie	15
1.5.1. Vorkommen beim Menschen	15
1.5.2. Vorkommen bei Tieren	16
1.5.3. Vorkommen in Lebensmitteln	20
1.5.4. Übertragungsmöglichkeiten	22
1.6. Nachweis	24
1.6.1. Klassische Nachweisverfahren	24
1.6.1.1. Identifizierung	27
1.6.1.2. Bio- und Serotypisierung	28
1.6.1.3. Pathogenitätsnachweis	28
1.6.2. Molekularbiologische Nachweismethoden	29
2. Polymerase Chain Reaction	33
2.1. Prinzip der PCR	34
2.1.1. Template	37
2.1.2. Primer	37
2.1.3. Polymerase	39
2.1.4. Weitere Reagenzien	40
2.2. Probenvorbereitung	41
2.2.1. Konzentrierung der Zielorganismen	42
2.2.2. Entfernung von Inhibitoren	42
2.2.3. Lyse der Zellen	43
2.2.4. Gewinnung der DNA	44
2.2.5. DNA Isolierung	45
2.3. Detektion	48

2.3.1.	Gelelektrophorese.....	48
2.3.2.	Real-Time PCR.....	49
2.3.2.1.	DNA-bindende Farbstoffe:.....	50
2.3.2.2.	Sequenzspezifische Hybridisierungssonden:	51
2.4.	Auswertung der Ergebnisse	57
2.4.1.	Falsch positive Ergebnisse.....	58
2.4.2.	Falsch negative Ergebnisse	59
2.4.3.	Quantifizierung	61
EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....		63
1.	Allgemeiner Versuchsaufbau.....	63
2.	Material.....	64
2.1.	Probenmaterial und Bakterien	64
2.2.	Untersuchungsmaterial	65
3.	Methoden	66
3.1.	Erster Teil: Vorversuche PCR	66
3.1.1.	Ermittlung der idealen Mastermix- und Primer-Konzentration	66
3.1.2.	Gradient zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur	67
3.1.3.	Real-Time PCR mit SYBR-Green	68
3.1.4.	Real-Time PCR mit einer TaqMan-Sonde (5' Nuclease PCR-Assay) .	71
3.1.5.	Konventionelle PCR.....	72
3.2.	Zweiter Teil: Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> aus beimpftem Fleisch	74
3.2.1.	PCR-Nachweis.....	78
3.2.1.1.	DNA-Extraktion.....	78
3.2.1.2.	Positivkontrolle	82
3.2.1.3.	Lagerung der gereinigten DNA.....	82
3.2.1.4.	PCR-Protokolle.....	82
3.2.1.5.	Sensitivitätsprüfung	82
3.3.	Dritter Teil: Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> aus Fleischproben.....	83
3.3.1.	PCR-Nachweis.....	84
3.3.1.1.	DNA-Extraktion.....	84
3.3.1.2.	PCR-Protokolle.....	84
3.3.2.	Identifizierung von <i>Y. enterocolitica</i>	85
ERGEBNISSE		87
1.	Vorversuche	87

1.1.	Ermittlung der idealen Mastermix- und Primer-Konzentration	87
1.2.	Ermittlung der idealen Annealing-Temperatur	88
2.	Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> in artifiziell beimpften Hackfleischproben	91
2.1.	Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> mittels PCR	92
2.1.1.	Vergleich der verschiedenen Aufreinigungsmethoden	93
2.1.2.	Real-Time PCR mit SYBR Green	94
2.1.3.	Real-Time PCR mit TaqMan Sonde	96
2.1.4.	Konventionelle PCR	97
2.2.	Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> mittels Kultur	99
3.	Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> in Schweinefleischproben	101
3.1.	Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> mittels PCR	101
3.1.1.	Allgemein	101
3.1.2.	Real-Time PCR mit SYBR Green	101
3.1.3.	Real-Time PCR mit TaqMan-Sonde	102
3.1.4.	Konventionelle PCR	103
3.1.5.	Vergleich der verschiedenen Aufreinigungsmethoden	104
3.2.	Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> mittels Kultur	106
	DISKUSSION	108
1.	Auswahl der Zielgene und der Sonde	108
2.	Vorversuche	109
3.	Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> in künstlich beimpftem Probenmaterial	111
3.1.	PCR-Nachweis	112
3.1.1.	Probenvorbereitung	112
3.2.	Vergleich der verschiedenen PCR-Methoden	114
3.3.	Kultureller Nachweis	115
4.	Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> in Schweinefleischproben aus dem Handel ...	116
4.1.	PCR-Nachweis	116
4.2.	Kultureller Nachweis	118
5.	Schlussfolgerung	120
	ZUSAMMENFASSUNG	122
	SUMMARY	124
	ANHANG	126
1.	Anhang zu Material und Methoden	126

1.1. Medien zur Aufgewahrung, Anreicherung und Identifizierung von <i>Y. enterocolitica</i>	126
1.1.1. Flüssige Medien	126
1.1.2. Feste Medien	127
1.1.3. Aufbewahrungsmedium.....	128
1.2. Testsysteme und Reagenzien.....	128
1.3. Geräte und Hilfsmittel.....	129
1.3.1. Allgemeine Materialien.....	129
1.4. PCR.....	131
1.4.1. Reagenzien zur Probenvorbereitung.....	131
1.4.2. Geräte und Hilfsmittel.....	131
1.4.3. Reagenzien für die PCR.....	132
2. Anhang zu Ergebnisse	133
2.1. Ergebnisse der beimpften Hackfleischproben	133
2.2. Ergebnisse der untersuchten Schweinefleischproben.....	137
LITERATURVERZEICHNIS.....	141
TABELLENVERZEICHNIS	177
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	179
DANKSAGUNG	181
LEBENS LAUF	182

ABKÜRZUNGEN

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Adenin
<i>ail</i>	attachment invasion locus
Aqua bidest	Aqua bidestillata
BDC	Buoyant density centrifugation
BHI	Brain-Heart-Infusion
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C _t	Threshold Cycle
ca.	circa
CASO	Casein-Sojamehl-Pepton
cDNA	complementary DNA
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
cm	Zentimeter
CRMOX	Kongorot-Magnesium-Oxalat
CTAB	Cetylmethylammoniumbromid
d	Tag
d.h.	das heißt
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	(lat. et alli) und andere
etc.	et cetera
FAE	Follikel-assoziiertes Gewebe
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FRET	fluoreszenz resonanz energy transfer
g	Gramm
G	Guanin
GALT	gut associated lymphoid tissue
ggf.	gegebenenfalls
GKZ	Gesamtkeimzahl
h	Stunde
H-Antigene	Geißel-Antigene
HF	Hackfleisch
i.d.R.	in der Regel
Ig	Immunglobulin
IMS	Immunomagnetische Separation
<i>inv</i> -Gen	Invasin-Gen
ISO	International Organization for Standardization
ITC	Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

Abkürzungen

KbE	Kolonien bildende Einheiten
KOH	Kalium-Hydroxid
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
M-Zellen	Microford-Zellen
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRB	modifizierte Rappaport-Bouillon
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTSB	modifizierte Trypton-Soja-Bouillon
n	absolute Zahl
NCFA	Nordic Committee of Food Analysis
ng	Nanogramm
O-Antigene	Oberflächenantigene
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PC	Plate Count
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PSB	peptone-sorbitol-bile
pYV	plasmid for <i>Yersinia</i> virulence (Virulenzplasmid)
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	reverse transcription
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSDC-Agar	Salmonella-Shigella-Desoxycholate-Calcium-Chlorate-Agar
ssp.	Subspezies
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBA	Tris-Bor-EDTA-Puffer
TSA	Trypton-Soja-Agar
TSB	Tryptone-Soja-Bouillon
U	Unit
u.a.	unter anderem
Urea	Harnstoff
ure	Urease
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v.a.	vor allem
WHO	World Health Organization
Y.	<i>Yersinia</i>
Yad	<i>Yersinia</i> adhesin
Ylp	<i>Yersinia</i> Lipoprotein
Yop	<i>Yersinia</i> outer membrane protein
Yst-Gen	heat-stable enterotoxine (hitzestabiles Enterotoxin)
z.B.	zum Beispiel

EINLEITUNG

Yersinia (Y.) enterocolitica ist ein bedeutender Erreger humaner Gastroenteritiden. Die Erkrankung steht derzeit an dritter Stelle der meldepflichtigen Lebensmittelinfektionen, nach Salmonellen und *Campylobacter*. Die Infektionsrate liegt vermutlich noch viel höher, da nur die ernstesten Fälle registriert werden. Eine Infektion zeigt sich meist in selbstlimitierendem Durchfall, vor allem bei Kindern. Sie kann aber auch zu Spätfolgen wie reaktive Arthritis oder Erythema nodosum, oder zu Septikämie führen.

Die Epidemiologie von *Y. enterocolitica*-Infektionen ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Hauptinfektionsquelle des Bioserotyps 4/O:3 für den Menschen kontaminiertes Schweinefleisch ist. Vor allem das persistent infizierte Schwein stellt ein bedeutendes Reservoir für den Erreger dar, da Infektionen mit *Y. enterocolitica* bei dieser Tierart überwiegend symptomlos verlaufen und bei der Schlachttier- und Fleischuntersuchung nicht erkannt werden.

Der Nachweis von *Y. enterocolitica* aus Schweinefleisch gelingt mit den klassischen kulturellen Verfahren nur selten, da die Keime von der Hintergrundflora in der Regel überwuchert werden. Zudem ist der Nachweis der Pathogenität sehr arbeits- und zeitaufwendig und liefert auch nicht immer ein eindeutiges Ergebnis. Keine Methode allein ermöglicht es, alle pathogenen Serotypen zu isolieren. Als Ergänzung der klassischen mikrobiologischen Nachweisverfahren wurden in den vergangenen Jahren vermehrt Methoden entwickelt, welche auf einem Nachweis des Genotyps basieren. Diese Verfahren können zur Identifizierung und Typisierung von Mikroorganismen herangezogen werden. Methoden wie die PCR, welche auf dem Nachweis von Nukleinsäuren basieren, ermöglichen den schnellen, sensitiven und spezifischen Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln. Der Keim ist ubiquitär in der Umwelt vorhanden und die meisten der aus Lebensmitteln isolierten Keime sind apathogen. Deshalb ist es wichtig, die Pathogenität nachzuweisen. Dies ist durch den gezielten Nachweis von Genen, welche für Pathogenitätsfaktoren codieren, möglich.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Real-Time PCR-Methode zum schnellen Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* in Schweinefleisch zu entwickeln. Das *ail*-Gen wurde ausgewählt, da nur *ail*-positive *Y. enterocolitica* als pathogen gelten und dieses Gen in apathogenen Stämmen nicht vorhanden ist. In Vorversuchen wurden die PCR-Bedingungen optimiert. Eine Evaluierung der Methode erfolgte an gezielt kontaminiertem Fleisch und schließlich an Schweinefleischproben aus dem Handel. Da die Probenvorbereitung einen großen Einfluss auf die PCR hat, wurden verschiedene Aufreinigungsmethoden miteinander verglichen. Zudem wurden die Ergebnisse von drei verschiedenen PCR-Methoden verglichen. Parallel dazu wurden die Proben auch mit klassischen kulturellen Verfahren untersucht, welche sich an die amtliche Methode nach DIN EN ISO 10273 anlehnen. Dadurch ist ein direkter Vergleich zwischen PCR-Methoden und klassischen kulturellen Methoden möglich.

LITERATURÜBERSICHT

1. *Yersinia enterocolitica*

1.1. Taxonomie und Eigenschaften

Yersinien gehören nach Bergey's Manual of Systematic Bacteriology zur Familie *Enterobacteriaceae*, den gram-negativen fakultativ anaeroben Stäbchen. Zum Genus *Yersinia* (Y.) gehören nach ALEKSIC und BOCKEMÜHL (1990) elf verschiedene Spezies:

Y. enterocolitica, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedium*, *Y. kristensenii*, *Y. rohdei*, *Y. aldovae*, *Y. mollareti*, *Y. bercovieri* und *Y. ruckeri*.

Pathogen für den Menschen sind die Arten *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*. *Y. enterocolitica* verursacht vor allem gastrointestinale Symptome von akuter Enteritis bis hin zu mesenterialer Lymphadenitis. *Y. pseudotuberculosis* verursacht mesenteriale Adenitis und Septikämie. Beide Arten werden vor allem über Lebensmittel übertragen und als sogenannte "foodborne"-Bakterien bezeichnet. Die Prävalenz von *Y. enterocolitica* ist um ein vielfaches höher als die von *Y. pseudotuberculosis*, welcher ein primär tierpathogener Keim ist und nur sehr selten bei Menschen nachgewiesen wird. *Y. pestis* ist der Erreger der Pest bei Nagetieren und beim Menschen und wird gewöhnlich durch Insekten übertragen (COVER und ABER 1989). Alle drei pathogenen Arten besitzen ein ca. 64 kb-langes gemeinsames Virulenzplasmid (plasmid for *Yersinia* virulence, pYV, 42-48 MDa, 64-75 kb; bei *Y. pestis* pCD1 genannt), wobei *Y. pestis* normalerweise noch zwei zusätzliche Virulenzplasmide besitzt. *Y. ruckerii* ist für Fische pathogen und zeigt deutliche genetische Unterschiede zu den anderen *Yersinia*-Arten auf (BAUMGARTEN et al. 1977, BEN-GURION und SHAFFERMAN 1981, COVER und ABER 1989, SCHIEMANN 1989, FUKUSHIMA et al. 1991, FUKUSHIMA und GOMYODA 1991, DEDIÉ et al. 1993, ALEKSIC et al. 1995, ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1999, BOCKEMÜHL und ROGGETIN 2004). Die anderen Arten der Gattung *Yersinia* sind in der Regel apathogene Umweltkeime, welche ubiquitär vorkommen. Sie wurden aus Oberflächengewässern, Abwasser oder Meerestieren und gelegentlich bei

Nagern nachgewiesen, auch können sie in klinischem Material und in Probenmaterial vorkommen. Deshalb ist ihre Abgrenzung von den pathogenen Yersinien notwendig (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Nach KAPPERUD (1991) wurde bisher keine dieser Arten mit einer Erkrankung beim Menschen oder beim Tier in Zusammenhang gebracht.

Yersinien sind bei 25°C kokkoide, bei 37°C stäbchenförmige, pleomorphe, kapsellose, alkalistabile, psychrotrophe Kurzstäbchen. Sie sind kulturell anspruchslos, zeigen aerobes und fakultativ anaerobes Wachstum, reduzieren Nitrat zu Nitrit, bilden Urease, sind Oxidase-negativ und Katalase-positiv. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 28-29°C. Sie können sich aber bei Temperaturen von 4-42°C vermehren. Yersinien fermentieren Glucose unter Säurebildung mit geringer oder fehlender (z.B. *Y. enterocolitica*) Gasbildung. Bei 22-25°C sind Yersinien (mit Ausnahme von *Y. pestis*) peritrich begeißelt und somit beweglich, bei 35-37°C unbegeißelt und somit unbeweglich (BERCOVIER und MOLLARET 1984, BOTTONE 1997, 1999, NEUBAUER et al. 2001). Nur einige für den Menschen pathogene Formen von *Y. enterocolitica* der Serogruppe O:3 sind bei beiden Temperaturen nicht beweglich (NESBAKKEN 1992). Die biochemischen Reaktionen, anhand derer zwischen den verschiedenen *Yersinia*-Spezies unterschieden werden kann, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Fermentation von Rhamnose, Melibiose und Sucrose spielen hierbei eine Schlüsselrolle.

Tabelle 1: Charakteristische Eigenschaften verschiedener *Yersinia*-Spezies (BERCOVIER et al. 1978, BRENNER 1981, KAPPERUD und BERGAN 1984, ALEKSIC et al. 1987, WAUTERS et al. 1988)

Eigenschaft	<i>Y.e.</i>	<i>Y. pst.</i>	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. frederiksenii</i>	<i>Y. kristensenii</i>	<i>Y. intermedia</i>	<i>Y. aldovae</i>	<i>Y. rohdei</i>	<i>Y. mollaretii</i>	<i>Y. bercovieri</i>
Fermentation										
von:										
D-Cellobiose	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
D-Melbiose	-	+	(+)	-	-	+	-	+	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
L-Rhamnose	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Sucrose	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+
L-Sorbose	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sonstige:										
Ornithin-decarboxylase	+	-	-	+	+	+	+	(+)	+	+
Voges-Proskauer	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Urease	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Y.e. *Y. enterocolitica*

Y.pst. *Y. pseudotuberculosis*

+

-

(+)

1.1.1. Biotyp

Die Spezies *Y. enterocolitica* selbst ist mit pathogenen und apathogenen Stämmen sehr heterogen und besitzt eine große biochemische Variabilität. Die Verstoffwechslung verschiedener Zucker, Decarboxylierung von Ornithin, Citratverwertung, Voges-Proskauer Reaktion und Indolbildung werden häufig zur Differenzierung herangezogen. Unterteilt wird die Art, je nach biochemischem Verhalten, in 6 Biotypen (1A, 1B, 2, 3, 4 und 5) wobei der Biotyp 1A lange Zeit als apathogen galt, inzwischen aber zunehmend auch als Enteritis-Erreger, vor allem bei Erwachsenen, erkannt wird (BURNENS et al. 1996). Nach TENNANT et al. (2003) existieren innerhalb des Biotyps 1A zwei Subgruppen. Zum einen pathogene Stämme klinischen Ursprungs, zum anderen apathogene Stämme welche in der

Umwelt vorkommen. WAUTERS et al. (1987) entwickelten ein Schema (Tabelle 2) für die Biotypisierung von *Y. enterocolitica*, das in der Routinediagnostik gute Verwendung finden kann.

Tabelle 2: Biotypisierung von *Y. enterocolitica*-Stämmen (nach WAUTERS et al. 1987)

Test	1A	1B	2	3	4	5
Äskulinhydrolyse 24h	v	-	-	-	-	-
Salicin (Säure 24h)	+	-	-	-	-	-
Tween-Esterase	+	+	-	-	-	-
Indol	+	+	(+)	-	-	-
Xylose (Säure)	+	+	+	+	-	v
Trehalose (Säure)	+	+	+	+	+	-
Pyrazinamidase	+	-	-	-	-	-

+ positiv
 (+) schwach positiv
 v variabel
 - negativ

1.1.2. Serotyp

Innerhalb der Biotypen von *Y. enterocolitica* existieren zahlreiche (ca. 60) Serotypen, welche überwiegend anhand der O-Antigene (LPS) unterteilt werden. Von diesen werden nicht alle mit Infektionen des Menschen in Verbindung gebracht (BOTTONNE 1999). Die O-Antigene sind nicht Spezies-spezifisch, d.h. sie können bei verschiedenen *Yersinia*-Arten vorkommen. So wurden die O:3, O:9 und O:8-Antigene auch bei anderen *Yersinia*-Spezies nachgewiesen. Deshalb sollte die Pathogenität von Isolaten immer auf dem Serotyp und Biotyp basieren, um das pathogene Potential eines Isolates abschätzen zu können (ALEKSIC 1995).

Als humanpathogen gelten vor allem die Serotypen O:3, O:8, O:9 und O:5,27. Menschliche Erkrankungsfälle gehören den Bioserotypen 4/O:3, 2/O:9, 2/O:5,27, 1B/O:8, 3/O:3 an. Der Bioserotyp 4/O:3 ist vor allem in Europa, Japan, Canada und den USA als Auslöser einer Yersiniose von Bedeutung (BOTTONNE 1999). Nach FUKUSHIMA et al. (1984) ist in Ostasien (China und Japan) der Bioserotyp 3/O:3

weit verbreitet, der Bioserotyp 2/O:3 kommt vor allem in Europa vor, bei 2/O:5,27 wird von einer weltweiten Verbreitung ausgegangen. Bis 1983 war der Bioserotyp 1B/O:8 in den USA vorherrschend. Inzwischen wird er immer mehr von 4/O:3 verdrängt, während 1B/O:8 zunehmend auch in europäischen Ländern isoliert werden konnte (HOOGKAMP-KORSTANJE et al. 1986, BOTTONE 1999). Zu den obligat pathogenen *Y. enterocolitica* mit Virulenzplasmid gehören Biotyp 1B (Serotypen O:8, O:13a, 13b, O:18, O:21), Biotyp 2 (Serotypen O:9, O:5,27), Biotyp 3 (Serotypen O:1,2a,3, O:9, O:5,27), Biotyp 4 (Serotyp O:3) und Biotyp 5 (Serotyp O:2a,2b,3).

Außerdem kann die Spezies *Y. enterocolitica* anhand von Unterschieden im 16S-rRNA-Gen noch in amerikanische und europäische Stämme aufgeteilt werden, was zur Unterteilung in die Subspezies *Y. enterocolitica enterocolitica* ("amerikanische Stämme") und *Y. enterocolitica palearctica* ("europäische Stämme") führte (NEUBAUER et al. 2000c). Amerikanische Stämme gehören dem Biotyp 1B an und beinhalten die Serotypen O:8, O:4,32, O:13a13b, O:18, O:20 und O:21, wogegen Europäische Stämme den Biotypen 2-5 angehören mit den Serotypen O:1,3, O:2a,3, O:3, O:5,27 und O:9 (BOTTONE 1977, CALOS und MILLER 1980, BOLIN et al. 1982, IBRAHIM et al. 1992, 1997).

1.2. Pathogenitätsfaktoren

Die Pathogenitätsfaktoren von *Y. enterocolitica* lassen sich in plasmid- und chromosomal codiert einteilen (HEESEMANN 1990). Alle pathogenen Yersinien besitzen das Virulenz-Plasmid pYV. In Umweltisolaten, nicht-pathogenen *Y. enterocolitica*-Stämmen und in nicht-pathogenen *Yersinia*-Spezies wurde bisher kein Virulenzplasmid gefunden (SCHIEMANN und DEVENISH 1982, HILL et al. 1983). Bei Temperaturen von 37°C und Abwesenheit von Calciumionen, wie es im Inneren der Wirtszelle der Fall ist, wird das Bakterienwachstum eingestellt. Stattdessen erfolgt dann die Expression von plasmidcodierten Proteinen, welche für die Virulenz des Erregers verantwortlich sind (MURIANA 2002). Bei Vorhandensein des pYV kann *Y. enterocolitica* nach dem Eindringen in das lymphatische Gewebe seines Wirtes nicht nur überleben, sondern sich auch dort vermehren. Plasmidfreie *Y. enterocolitica* werden hingegen eliminiert (CORNELIS et al. 1998). Dass es sich bei dem Virulenzplasmid der verschiedenen Serotypen, um das gleiche bzw. ein sehr

ähnliches Plasmid handelt, wird durch Sequenzhomologie von 70-100 % (HEESEMANN et al. 1983, CORNELIS et al. 1987) bestätigt. Während In-vitro-Vermehrung bei Temperaturen von > 30°C und durch häufige Subkultivierung und lange Lagerung kann das Plasmid leicht verloren gehen (BOTTONNE 1997).

Das Virulenzplasmid von *Y. enterocolitica* codiert für das "Yop-Virulon". Das System ermöglicht es den Bakterien, sich an die Oberfläche von Zellen anzuheften und die Effektor-Proteine, die sogenannten "**Yops, *Yersinia* outer proteins**" in die Zelle zu injizieren. Dieses System ist ein Prototyp für das sogenannte "Typ III-Sekretions-System". Die Effektor-Proteine ermöglichen es den Keimen, der Immunantwort des Wirtes zu entkommen. (CORNELIS 2002). Das Plasmid codiert noch für ein integriertes Membranprotein, das **YopA**, für das bisher keine pathogenen Eigenschaften nachgewiesen werden konnten (BOTTONNE 1997).

Die Produktion der Yops wird durch eine 20 kb umfassende Region des pYV reguliert und umfasst 4 Loci, die mit ***virA*, *virB*, *virC*** und ***virG*** bezeichnet werden. ***VirF*** ist ein Regulator-Gen. Es scheint der Schlüsselaktivator für die Yop-Gene zu sein. Das Protein des *virF*-Genes wird nur bei 37°C synthetisiert und es aktiviert viele *Yersinia* outer proteins, und auch die Transkription des *yadA*. Das ***yadA* (*Yersinia* Adhesion)** codiert für ein Außenmembranprotein, das nur bei 37°C exprimierte, 200 kDa große fibrilläre "*Yersinia*-Adhäsion A" (YadA). Im Gegensatz zu den Yops ist die Expression vom Kalziumgehalt des Mediums aber unabhängig (SKURNIK und TOIVANEN 1992). Das YadA ermöglicht die Bindung des Bakteriums an intestinale Zellen, vor allem der Ileocaecal-Region. Es schützt außerdem vor Abtötung durch das Komplementsystem und vor Phagozytose durch neutrophile Granulozyten (HEESEMANN 1990, BOTTONNE 1997). YadA-assoziierte Eigenschaften wie Autoagglutination und Hämagglutination können zum Nachweis des Virulenzplasmids im Labor herangezogen werden (LAIRD und CAVANAUGH 1980, KAPPERUD et al. 1987).

Neben dem Virulenzplasmid sind auch chromosomal determinierte Virulenzfaktoren für die volle Virulenz erforderlich. Dies konnte mit der Übertragung des Virulenzplasmids auf nicht-pathogene Stämme gezeigt werden, weil es nicht immer zur Ausbildung einer vollen Virulenz führte (HEESEMANN und LAUFS 1983).

Zu den chromosomal codierten Pathogenitätsfaktoren gehört zum einen das bei 37°C und nur in der stationären Wachstumsphase transkribierte ***ail* (attachment invasion locus)-Gen**, welches für ein 17 kDa Oberflächenprotein codiert. Das Protein fördert die Anheftung an und Invasion in die eukaryotische Zelle. Außerdem ist es neben dem YadA an der bakteriellen Resistenz gegenüber dem Komplementsystem beteiligt, indem es die Bildung eines aktiven "Membran-Attack-Komplexes" verhindert. Das *ail*-Gen kommt nur bei pathogenen *Y. enterocolitica* vor (CARNIEL 1995, BOTTONE 1997). Aufgrund der maximalen Expression bei 37°C spielt es vor allem in einer späteren Infektionsphase eine Rolle (MILLER und FALKOW 1988, PEPE und MILLER 1993).

Zu den chromosomalen Genen gehört auch das ***inv*-Gen**, das für ein bei 28°C exprimiertes, 92 kDa Protein auf der äußeren Membran, das **Invasin**, codiert, welches ebenfalls an der bakteriellen Invasion beteiligt ist (ISBERG 1989, BOTTONE 1999). PEPE et al. (1994) zeigten, dass bei 37°C und neutralem pH-Wert die Expression stark eingeschränkt ist. Wird der pH-Wert auf 6 gesenkt (entspricht etwa dem Milieu im Dünndarm) wird es wieder maximal exprimiert. Die Expression erfolgt vor allem in der späten stationären Wachstumsphase. Das Invasin spielt im Anfangsstadium der Infektion eine wichtige Rolle bei der Einwanderung von *Y. enterocolitica* in die Epithelialzellen des Ileums (PEPE et al. 1995). Es bindet an β 1-Integrin, ein Zelladhäsionsprotein, wodurch ein phagozytischer Prozess induziert wird. Eine Ausschaltung des *inv*-Gens führt allerdings nicht zur Verminderung der Virulenz (HEESEMAN 1990). *Inv*-homologe DNA kommt auch in apathogenen *Y. enterocolitica*-Stämmen vor. In Umwelt-Isolaten wird das Invasionsprotein nicht exprimiert (PIERSON und FALKOW 1990). Ein homologes *inv*-Gen kommt auch bei *Y. pseudotuberculosis* vor, allerdings handelt es sich bei dem *inv*-Gen von *Y. pseudotuberculosis* um ein nicht funktionstüchtiges Gen (MILLER et al. 1989, BOCKEMÜHL 1999).

Enteropathogene *Y. enterocolitica*-Stämme sezernieren ein hitzestabiles, durch das ***Yst*-Gen** codierte **Enterotoxin (Yst)**, dessen Rolle bei der Pathogenität allerdings noch unklar ist. Vermutlich ist es an einer Primärschädigung des Darmepithels und der Sekretion von Flüssigkeit ins Darmlumen beteiligt. Das Yst kann der Magensäure

und auch den Temperaturen bei der Lebensmittelzubereitung und -lagerung widerstehen, ohne an Aktivität zu verlieren (KAPPERUD 1991). Das chromosomal codierte *yst*-Gen wird in vitro nur bei Temperaturen $< 30^{\circ}\text{C}$ gebildet (BOTTONNE 1999, NEUBAUER et al. 2001). Jedoch konnte durch eine Senkung des pH-Wertes des umgebenden Milieus eine Expression bei 37°C erzielt werden. (CORNELIS 1994).

Ferner ist die **Lipopolysaccharidstruktur (LPS-Struktur)**, die Hauptkomponente der Außenmembran von gramnegativen Bakterien, chromosomal determiniert (HEESEMANN 1990). Sie besteht aus einem inneren Kern, der an das O-Antigen gebunden ist und aus einem äußeren Kern, der mit einer Hexasaccharidseitenkette verbunden ist. Die Lipopolysaccharide können in Abhängigkeit von der Temperatur in unterschiedlicher Struktur vorliegen. Zum einen bei 37°C in rauer, kurzketziger Form welche in die Zellmembran integriert ist, zum anderen bei 25°C in einer glatten, langkettigen Form, die sich von der Membran ablösen kann und als freies Endotoxin wirken kann. Diese O-Antigene sind für die volle Virulenz von *Y. enterocolitica* erforderlich und außerdem neben Ail und YadA an der Resistenz gegenüber dem Komplementsystem des Wirtes beteiligt (KAWAOKA et al. 1982, AL-HENDY et al. 1992, BIEDZKA-SAREK et al. 2005). Die oben aufgeführte Serotypisierung von *Y. enterocolitica* basiert auf der Variabilität der O-Antigene (WAUTERS et al. 1991). Diese Lipopolysaccharide spielen zudem eine wichtige Rolle bei der reaktiven Arthritis, da die Antikörper-Antwort des infizierten Menschen meist gegen die LPS gerichtet ist (BOTTONNE 1997).

Ein ebenfalls chromosomal codierter Faktor ist das **Eisenaufnahmesystem** der Yersinien. Bei FyuA handelt es sich um einen membranständigen Rezeptor für die Aufnahme von Eisen, die sogenannten Siderophorenrezeptoren. Einige Yersinien sind in der Lage ihren Bedarf von ca. 10^{-6} M Eisen auch bei den extrem niedrigen Plasmakonzentrationen von 10^{-15} M zu decken. So besitzen Angehörige des Biotyps 1B und der Serotypen O:8 und O:21 neben den Rezeptoren auch Siderophore. Siderophore sind Eisenkomplexbildner welche sezerniert werden und Eisen binden können, anschließend werden sie von den Siderophorenrezeptoren aufgenommen. Die Fähigkeit das Siderophor Yersiniabactin zu produzieren ist vermutlich einer der wichtigen Virulenzfaktoren zur Versorgung von Stämmen der Biogruppe 1B mit Eisen

welches nötig ist, um eine Infektion hervorzurufen (PELLUDAT et al. 2002). *Y. enterocolitica* der Serotypen O:3, O:9, O:5,27, O:1,2,3 und O:20 besitzen nur die Rezeptoren (HEESEMAN 1990, DEDIE et al. 1993). Wurden die fehlenden Siderophoren der O:3-Stämme von außen durch Siderophoren anderer Bakterien ersetzt, konnte ihre Virulenz gesteigert werden (RKI 1999).

Auch der **Urea-Gen-Komplex (*ure*)** ist chromosomal codiert, *Y. enterocolitica* gehört zu den Urease-positiven Bakterien. Das Enzym Urease katalysiert die Hydrolyse von Harnstoff zu Ammoniumcarbonat. Durch eine weitere Reaktion entsteht nochmals ein Molekül Ammoniak und Carbonsäure. Die resultierende Alkalisierung des Magensaftes erleichtert Yersinien die Passage durch den Magen (DE KONINGWARD et al. 1994).

1.3. Pathogenese

Als erster Schritt der Pathogenese wird die Invasion ins Gewebe angesehen. Die Gene, welche für die Invasion benötigt werden, sind überwiegend auf dem Chromosom lokalisiert. Dies hat sich dadurch gezeigt, dass Stämme welche kein Plasmid besitzen weiterhin invasiv sind (MILLER und FALKOW 1988). Aber auch das auf dem Plasmid lokalisierte *yadA*-Gen trägt zur Invasion ins Gewebe bei, indem es die Bindung an den intestinalen Bürstensaum unterstützt (GRANT et al. 1998, BOTTONE 1999). Allerdings werden Bakterien, welche kein Plasmid besitzen in den Peyerschen Platten eliminiert, während plasmidhaltige dort überleben und sich vermehren können. Somit scheinen die chromosomalen Virulenzfaktoren eine entscheidende Rolle in der Initialphase der Infektion zu spielen. Die durch das Plasmid codierten Virulenzfaktoren sind dagegen essentiell um der Immunabwehr entkommen zu können und nachfolgend eine Krankheit auszulösen (HEESEMAN 1990).

Nachdem das Bakterium mit Hilfe des Urea-Gen-Komplexes den Magen passiert hat, kolonisiert es die Oberfläche der Dünndarmmukosa und löst Durchfall aus, möglicherweise durch Produktion des Enterotoxins Yst (DELOR und CORNELIS 1992). Der Erreger überwindet die Epithelbarriere der Darmschleimhaut über die sogenannten M-Zellen (Microfold-Zellen). Dies sind spezialisierte Epithelzellen, die keinen Bürstensaum aufweisen und zur Phagozytose bzw. Antigenaufnahme aus

dem Lumen befähigt sind und eine rezeptorvermittelte Endocytose ermöglichen. Die Bindung an und Invasion in die M-Zellen wird durch chromosomale Faktoren, Inv und Ail, vermittelt. Auch das plasmidcodierte Oberflächenprotein YadA ist daran beteiligt. Normalerweise werden Bakterien, die in M-Zellen aufgenommen werden, phagocytiert und durch Makrophagen in den Peyerschen Platten abgetötet. Pathogene *Y. enterocolitica*-Stämme haben mehrere plasmidcodierte Oberflächenstrukturen, die es ihnen ermöglichen, der Phagozytose durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen zu widerstehen und dem Komplement-vermittelten Tod zu entkommen. Apathogene *Yersinia*-Spezies, welche kein Virulenzplasmid besitzen, werden nach erfolgreicher Invasion über M-Zellen in die Peyerschen Platten durch eine Invasin-induzierte Phagozytose eliminiert (DEDIE et al. 1993, BOTTONE 1997). Nachdem die Bakterien das Epithel mit Hilfe der M-Zellen penetriert haben, replizieren sie sich auch extrazellulär und heften sich sehr schnell und gezielt an das Follikel-assoziierte Gewebe (FAE) an. Das FAE, eine spezialisierte Epithelzellschicht, ist neben den Lymphfollikeln ein Teil der Peyerschen Platten, welche wiederum zu dem sogenannten darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT) gehören. Pathogene *Y. enterocolitica* induzieren eine Zerstörung der Peyerschen Platten, einschließlich des FAE (PAI et al. 1980, HEESEMANN und GRÜTER 1987, MILLER und FALKOW 1988, HANSKI et al. 1989, AUTENRIETH und FIRSCHING 1996, BOTTONE 1999, HOF und DÖRRIES 2002).

Die Vermehrung der Bakterien führt zu einer Entzündungsreaktion, die zur Bildung von lokalen Mikroabszessen und Ulzeration des Oberflächenepithels führen kann. Außerdem können die Bakterien zu mesenterialen Lymphknoten streuen und in den Blutkreislauf eintreten (ROBINS-BROWNE 2001, SALYERS und WHITT 2002). Dadurch können sie sich in die inneren Organe, besonders Milz, Leber, Niere und Lymphknoten innerhalb weniger Stunden ausbreiten. Diese Ausbreitung ist abhängig von der Resistenzlage des Patienten und vom *Y. enterocolitica*-Stamm. Bei den Stämmen des Biotyps 1B mit den Serotypen O:8 erfolgt nach der rapiden Vermehrung in diesen Organen die Ausbildung von Mikroabszessen, was schließlich zur Zerstörung dieser Organe führt. Bei den Biotypen 2-4 mit den Serotypen O:3, O:9 und O:5,27 kommt es zu keiner Abszessbildung. Diese Yersinien werden in den Organen wieder eliminiert, gefolgt von einer Ausheilung (HEESEMANN 1990, DEDIE et al. 1993).

1.4. Krankheitsbild

Y. enterocolitica wird mit einer Vielzahl von Krankheitsbildern beim Menschen in Verbindung gebracht, wobei Gastroenteritis in Form von selbstlimitierendem Durchfall über ein bis sieben Tage die häufigste Manifestation ist (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Neben der enteralen Verlaufsform kann es zu immunpathologischen Verläufen, Septikämie und extraintestinalen Organmanifestationen kommen (BOTTONNE 1997). Immunpathologische Folgekrankheiten werden häufig beobachtet. Septikämie tritt vor allem bei Patienten mit geschwächter Immunabwehr auf und extraintestinale Verläufe werden nur im Einzelfall beobachtet (HEESEMANN 1990). Bei Kindern unter 3 Jahren tritt vor allem eine akute, komplikationslose Enteritis mit entzündlichem, teilweise blutigem wässrigem Durchfall, sowie kolikartigen Bauchschmerzen und evtl. Fieber auf. Jugendliche (> 5 Jahre) erkranken vor allem an akuter terminaler Ileitis und mesenterialer Lymphadenitis mit Bauchschmerzen im Bereich der rechten Bauchhälfte (Pseudoappendizitis Syndrom). Meist klingen die Symptome nach einigen Tagen bis 2 Wochen ab. Schwere Verlaufsformen sind beim Erwachsenen beschrieben worden, vor allem Infektionen mit dem Bioserotyp 1B/O:8 verursachen nekrotisierende Enterocolitis und hämorrhagische Enteritis mit ulzerierenden Läsionen im Ileum und Colon (CORNELIS et al. 1987, KAPPERUD 1991, ZHANG et al. 1997). Dagegen verlaufen Infektionen mit dem Biotyp 4 Serotyp O:3 in der Regel milder (BOTTONNE 1999). Nach FUKUSHIMA und GOMYODA (1986) und NATTERMANN (1986) beeinflussen Virulenz, Bio- und Serotyp des Erregers, Infektionsdosis sowie Empfänglichkeit, Alter, Kondition und Immunstatus des Wirtes das Haften des Erregers und die Ausbildung von Krankheitserscheinungen. Über die infektiöse Dosis liegen hingegen keine verlässlichen Daten vor. Es wird von einer hohen infektiösen Dosis ausgegangen (> 10^4 KbE), wobei sie bei Kindern, Alten, Immunsupprimierten und Personen mit Eisen-Überschuss vermutlich niedriger liegt. (SZITA et al. 1973, FORBERG et al. 1986). Die Inkubationszeit der Yersiniose ist mit 7-10 Tagen relativ lang, in manchen Fällen kann sie aber auch nur 1 Tag betragen (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990, DEDIE et al. 1993, AUTENRIETH und FIRSCHING 1996).

Die Rolle von *Y. enterocolitica* Biotyp 1A bei Darmerkrankungen ist noch umstritten. Er galt lange Zeit als apathogener Umweltkeim und Opportunist. Sehr häufig wurden

auch Stämme dieses Biotyps aus Lebensmitteln isoliert. In letzter Zeit mehren sich Berichte über eine Bedeutung dieses Biotyps als Ursache von Darmerkrankungen beim Menschen. Die klinischen Symptome gleichen denen einer Infektion mit pathogenen *Y. enterocolitica*-Stämmen mit Diarrhoe, Bauchkrämpfen, Fieber gefolgt von pseudoappendizitischen Symptomen. Das Durchschnittsalter einer Darminfektion mit dem Biotyp 1A liegt bei 28 (\pm 23) Jahren (BURNENS et al. 1996).

Die extraintestinale Form der Yersiniose kann nach einer akuten oder latenten *Y. enterocolitica*-Infektion entstehen. Das metastatische Krankheitsbild zeigt sich in vielen Variationen, wie fokalen Abszessen (Leber, Niere, Milz oder Lunge), generalisierte Lymphadenitis, Manifestationen an der Haut (Cellulitis, Pyomyositis, Pusteln u.a.), Pneumonie, Meningitis, Panophthalmitis, Endocarditis oder Osteomyelitis. Diese Verlaufsform steht oft im Zusammenhang mit einer vorangegangenen Sepsis (DEDIE et al. 1993, BOTTONE 1999). Nur in 10-20 % der Fälle kann der Erreger aus dem Kot isoliert werden, unter Umständen kann es zu einer jahrelangen Persistenz des Erregers in den Lymphknoten und dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe kommen (HEESEMANN und KARCH 1995, HOOBKAMP-KORSTANJE und DE KONING 1990).

Lebensbedrohliche Septikämie tritt vor allem bei Patienten mit Immunschwäche auf, sowie bei Menschen mit zehrenden Grundkrankheiten wie z.B. Neoplasien, Diabetes mellitus, Lebererkrankungen, hämolytischen Erkrankungen (Auflösung der Erythrozyten mit Freisetzung von Bluteisen) oder Patienten mit medikamentösem (Behandlung mit dem Eisenchelator Deferroxamin) oder krankheitsbedingtem (Thalassämie, Sichelzellanämie, aplastische Anämie) erhöhten Eisenblutspiegeln, aber auch bei völlig Gesunden nach Übertragung durch Bluttransfusionen. In diesen Fällen stammte das Blut von Spendern mit asymptomatischer Bakteriämie (Centers for disease control 1991, BOCKEMÜHL 1999, BOTTONE 1999). Die Septikämie äußert sich in Fieber, schwerem Krankheitsgefühl mit Kopf- und Gliederschmerzen, häufig begleitet von Schüttelfrost, Übelkeit und Erbrechen (DEDIE et al. 1993). *Y. enterocolitica* sezerniert ein Endotoxin, welches vermutlich zum Grossteil für die Morbidität und Mortalität verantwortlich ist (BUCHHOLZ et al. 1992).

Als postinfektiöse Komplikationen können, vor allem bei Erwachsenen, reaktive immunbedingte Arthritis, Myocarditis, Glomerulonephritis, Reiters Syndrom (eine Kombination von Arthritis, Urethritis und Konjunktivitis, auch urethro-okulo-synoviales Syndrom [PSCHYREMBL 2002]) und Erythema nodosum (rote, erbsen- bis walnussgroße, unscharf begrenzte, druckschmerzhaftige Knoten vor allem im Bereich der Unterschenkel, Knie- und Fußgelenke) auftreten (BOTTONE und HURVELL 1981, BOTTONE 1999). Immunpathologische Krankheitsbilder treten häufig als Folgeerscheinung nach durchgemachter enteraler Symptomatik auf und können den Charakter eines eigenständigen Krankheitsbildes annehmen. Sie haben in der Regel eine günstige Prognose, können aber über Monate und Jahre andauern (GRANFORS et al. 1980, DEDIE et al. 1993).

1.5. Epidemiologie

Die Epidemiologie der Infektionen mit *Y. enterocolitica* ist komplex und zum größten Teil noch nicht vollständig geklärt. Die meisten Fälle von Yersiniose beim Menschen kommen sporadisch vor, ohne eine erkennbare Ursache (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2006a). Bisher gelang es nur selten, den ursächlichen Zusammenhang zwischen der menschlichen Erkrankung und dem kontaminierten Lebensmittel herzustellen (SCHIEMANN 1989).

1.5.1. Vorkommen beim Menschen

Y. enterocolitica ist ein Zoonose-Erreger, dessen Infektion beim Menschen seit Januar 2001 nach §7 des Infektionsschutzgesetzes meldepflichtig ist. In Tabelle 3 sind die Häufigkeiten von *Y. enterocolitica*-Erkrankungen in Deutschland aufgeführt. Dabei muss beachtet werden, dass dies nur offiziell als Enteritis infectiosa beim Robert Koch Institut (RKI) registrierte Fälle sind. Die Anzahl der nicht gemeldeten Fälle ist vermutlich 10-fach höher. Vorwiegend trat die Erkrankung bei den 1-2-jährigen Kindern unabhängig vom Geschlecht auf (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004, RKI 2002b). Studien, in welchen der Antikörper-Titer gemessen wurde, lassen vermuten, dass die tatsächliche Infektionsrate mit *Y. enterocolitica* höher als die Zahl der gemeldeten Fälle ist. Von 100 gesunden Blutspendern wurde beispielsweise bei 43% ein signifikanter Antikörper-Titer festgestellt. Da häufig trotz Bakteriämie v.a. bei Erwachsenen keine Krankheitserscheinungen auftreten, kann von einer hohen

Dunkelziffer an tatsächlichen Infektionen mit dem Erreger ausgegangen werden (MÄKI-IKOLA et al. 1997).

Tabelle 3: Häufigkeiten und Serotypverteilung gemeldeter *Y. enterocolitica*-Infektionen beim Menschen (RKI 2002a, b, 2003, 2004a, b, 2005)

Jahr	Anzahl Fälle D	Fälle/ 100.000EW	% Serotyp O:3	% Serotyp O:9	% Serotyp O:5,27
2001	7213	8,7	89,9	5,8	0,7
2002	7515	9,1	88,2	5,5	k.A.
2003	6571	8	87,0	5,0	1,0
2004	6184	7,5	k.A.	k.A.	k.A.
2005	5624	6,8	k.A.	k.A.	k.A.

D Deutschland
EW Einwohner
k.A. keine Angabe

Y. enterocolitica ist, nach *Salmonella* und *Campylobacter*, der dritthäufigste bakterielle Enteritiserreger, welcher aus Menschen mit Gastroenteritis isoliert werden konnte (ARNOLD et al. 2004). Die Yersiniose des Menschen, hervorgerufen durch Infektion mit *Y. enterocolitica*, ist fast weltweit verbreitet. Sie kommt in den gemäßigten und subtropischen Klimazonen Europas, Amerikas, Nord- und Ostasien, sowie in Australien und Südafrika vor. Nicht zu finden ist die Erkrankung in tropischen Gebieten Afrikas und Südostasiens (DEDIE et al. 1993). Infektionen des Menschen erfolgen nach Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln, kontaminiertem Wasser oder durch Bluttransfusion. Auch eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch ist möglich (SCHIEMANN 1989, HUNTER 1993, STROBEL et al. 2000).

1.5.2. Vorkommen bei Tieren

Y. enterocolitica kommt bei praktisch allen warmblütigen Wild-, Nutz- und Heimtieren, bei Fischen, Schalentieren, Reptilien und Vögeln, in Erdboden und Oberflächenwasser und in vielen Lebensmitteln vor, jedoch sind die meisten der isolierten Stämme dieser Quellen apathogene Varianten (MOLLARET 1976, MOLLARET et al. 1979, KAPPERUD 1981, 1991, FUKUSHIMA et al. 1985, WEBER 1985, NATTERMANN et al. 1986a, b, STENGEL 1986, BOCKEMÜHL 1999). Die

Übertragung zwischen Tieren erfolgt bei gemeinsamer Aufstallung wahrscheinlich überwiegend durch erregerehaltigen Kot und die damit kontaminierte Umwelt. Bei Karnivoren ist daneben eine Infektion über infizierte Beute- und Futtertiere denkbar (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Die meisten der aus Tieren isolierten Stämme unterscheiden sich sowohl biochemisch als auch serologisch von den Stämmen, welche aus an Yersiniose erkrankten Menschen isoliert wurden.

Wichtigstes Erregerreservoir von *Y. enterocolitica* Serotyp O:3 und O:9 für den Menschen ist das Schwein, welches als einziges lebensmittellieferndes Tier regelmäßig für den Menschen pathogene Stämme beherbergt (BOCKEMÜHL 1999). *Y. enterocolitica* O:3 und O:9 wurde als fäkaler Kommensale und in der Mundhöhle, besonders auf der Zunge und den Tonsillen, klinisch gesunder Schweine nachgewiesen (KAPPERUD 1991). Auch aus Abstrichen des Rektums konnte *Y. enterocolitica* isoliert werden (DE BOER und NOUWS 1991). Nach WAUTERS (1979) ist der Keim Bestandteil der normalen Mundhöhlenflora von Schlachtschweinen. Genotypen von *Y. enterocolitica*-Stämmen, welche in Schweinen und Schweinefleisch gefunden wurden, sind nicht von den in Menschen gefundenen Stämmen unterscheidbar (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2006b). Die Infektion mit *Y. enterocolitica* verläuft in der Regel asymptomatisch, zu einer Erkrankung kommt es erst, wenn ungünstige Umwelt- und Haltungsbedingungen hinzukommen. (NATTERMANN et al. 1985, 1986a). Symptomlose Tiere scheiden den Erreger nach experimentellen Infektionen in hohen Keimzahlen über mehrere Wochen mit dem Faeces aus, eine Besiedlung der Tonsillen bleibt bestehen (NIELSEN et al. 1996, THIBODEAU et al. 1999). Der humanpathogene Serotyp O:8 kommt dagegen selten in Schweinen vor, dieser Stamm besiedelt wahrscheinlich völlig andere Reservoirs (SCHIEMANN 1989).

In der Region München wurden Untersuchungen zum Vorkommen von *Y. enterocolitica* durchgeführt. Es konnte eine Prävalenz des Bioserotyps 4/O:3 von 65 % in Tonsillen und 18 % in Faecesproben festgestellt werden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999a, 2000b). Untersuchungen aus Deutschland, den Niederlanden und Norwegen ergaben pathogene *Y. enterocolitica* (v.a. die Serogruppe O:3) in der Mundhöhle bei 40-80 % gesunder Schlachtschweine (NESBAKKEN 1988, DE BOER und NOUWS 1991, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a). TOMA und DEIDRICK

(1975) untersuchten 544 Kotproben von Schweinen in Kanada und isolierten in 20 Proben *Y. enterocolitica* (3,6 %), 15 dieser Proben wurden als pathogen identifiziert, davon gehörten 10 Isolate dem Serotyp O:3 und 5 Isolate dem Serotyp O:5,27 an. Untersuchungen in den USA über die Anzahl von Schweinen, welche Träger von *Y. enterocolitica* sind, reichen von einer Infektionsrate von 35-70 % bei Herden und 4,5 bis 100 % bei einzelnen Schweinen (FUNK et al. 1998). Auch BHADURI et al. (2005) führten eine Untersuchung zur Prävalenz von pathogenen *Y. enterocolitica* in den USA durch. Dabei wurden Kotproben von Schweinen sowohl anhand von Kultur als auch mit einer Real-Time PCR Methode, basierend auf dem *ail*-Gen, untersucht. 13,1 % der Proben (366 von 2793 getesteten Kotproben) waren entweder bei der kulturellen Untersuchung oder bei der PCR positiv. Die PCR-Methode ergab eine Kontaminationsrate von 12,4 % (345 von 2793) gegenüber 4,1 % (114 von 2793) durch die kulturelle Untersuchung. 53,3 % (41 von 77) der untersuchten Betriebe enthielten mindestens eine Kotprobe, welche ein positives PCR-Ergebnis ergab.

Bei einer Blutuntersuchung auf IgG-Antikörper von 1630 Schweinen aus 326 verschiedenen Herden wurden 53,3 % der Tiere und 63,5 % der Herden als Träger von Antikörpern identifiziert. Dabei waren Betriebe mit reiner Masttierhaltung häufiger betroffen als Aufzuchtbetriebe mit Ferkeln und Masttieren. Der Ankauf aus verschiedenen Aufzuchtbetrieben und die damit verbundene Durchmischung von Tieren spielt wahrscheinlich bei der Verbreitung des Erregers zwischen den Betrieben eine große Rolle (SKJERVE et al. 1998).

Weniger häufig wurde *Y. enterocolitica* im Kot von Rindern nachgewiesen (HAWARI et al. 1981, KRAUSS et al. 1997). Nach BUCHER et al. (2002b) ist ein Nachweis von Yersinien aus Tonsillen oder Kot von Rindern extrem selten. Doch auch Rinder können Träger von pathogenen *Y. enterocolitica* sein und diese mit dem Stuhl ausscheiden, wobei es sich dabei vorwiegend um den Serotyp O:9, Biotyp 2 oder 3 handelt (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1996). LUDS und WEISS (1984) gelang 1984 bei Schafen die Isolierung von pathogenen *Y. enterocolitica* des Serotyps O:3 aus dem Kot, nicht jedoch aus den Tonsillen. Bei diesen Untersuchungen ergab sich eine Befallshäufigkeit von 3 % (9 positive bei 293 Gesamtproben), wobei 2 der 9 positiven Proben eindeutig humanpathogenen Stämmen des Serotyps O:3 zugeordnet werden konnten.

Auch Puten stellen nach BUCHER et al. (2002a) kein wichtiges Reservoir pathogener *Y. enterocolitica* dar. In Deutschland konnten nur in 2 von 80 Proben (Kot-, Gaumen-, Zungenproben) *Y. enterocolitica* Biotyp 1A nachgewiesen werden.

Unter den Klein- und Heimtieren müssen Hunde, Katzen und Ratten berücksichtigt werden, da sie *Y. enterocolitica* der Serotypen O:3 und O:9 bei einer Infektion mit dem Kot ausscheiden können. Hunde und Katzen können das Bakterium auch ohne Symptome über Wochen oder nach Abklingen der Symptome noch wochenlang ausscheiden. Diese Trägertiere können aufgrund des engen Kontaktes eine Quelle für Infektionen des Menschen sein, vor allem bei Kindern. Hunde und Katzen können somit eine Verbindung zwischen Schwein und Mensch darstellen (ALEKSIK und BOCKEMÜHL 1990, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001d). Da aus Hunden und Katzen *Y. enterocolitica* des Bioserotyps 4/O:3 isoliert werden konnte, erscheint ein solcher Übertragungsweg als sehr wahrscheinlich (YANAGAWA et al. 1978, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a, b). Weltweit wurden pathogene *Y. enterocolitica* im Kot von Hunden in 0-1 % der Fälle und bei 0-2,2 % der untersuchten Katzen nachgewiesen (WEBER 1985). Klinische Fälle treten überwiegend bei Welpen auf. Die Erkrankung zeigt sich in schlechtem Allgemeinbefinden, blutig schleimigem Durchfall, abdominalen Zysten, Infektion der Analdrüsen und mesenterialer Adenitis (FUKUSHIMA et al. 1984, FANTASIA et al. 1993, FENWICK et al. 1994, HAYASHIDANI et al. 1995).

Die tierpathogenen Stämme, die bei Hasen, Ziegen und Chinchillas septische Erkrankungen hervorrufen, gehören stets den Biotypen 3 oder 5 an (ALEKSIK und BOCKEMÜHL 1990). In Hasen wird meist der Bioserotyp 5/O:2, in Chinchillas der Bioserotyp 3/O:1 gefunden. Keiner dieser beiden Bioserotypen wurde bisher aus Menschen isoliert. Auch der Serotyp O:2,3 ist pathogen für Hasen (TOMA und DEIDRICK 1975, CORNELIS et al. 1987). Der Serotyp O:1,2,3 kann ebenfalls eine Krankheit bei Chinchillas auslösen und wurde auch bei Infektionen des Menschen isoliert (RILEY und TOMA 1989). Chinchillas und Hasen zeigen bei akut-septikämischem Verlauf unspezifische Symptome und sie sterben nach 1-2 Tagen, gelegentlich verläuft die Infektion auch subakut und die Tiere verenden nach 10-30

Tagen, wobei vereinzelt Abszesse in cervikalen oder thorakalen Lymphknoten gefunden werden.

1.5.3. Vorkommen in Lebensmitteln

Bisher konnten aus Fleischproben mittels kultureller Verfahren nur selten pathogene *Y. enterocolitica* isoliert werden (THISTED LAMBERTZ 2005). Untersuchungen von LOGUE et al. (1996) in Irland ergaben eine Häufigkeit von 45 % *Y. enterocolitica*-positiven Fleischproben (Schwein, Rind, Lamm, Geflügel), davon gehörten aber die meisten (79 %) dem vermutlich apathogenen Biotyp 1A an. Aus 7,1 % der Proben konnten pathogene *Y. enterocolitica* isoliert werden, in rohen Produkten wurde neben dem Biotyp 1A der Bioserotyp 2/O:5,27 gefunden, aber auch der Serotyp O:9 und der Bioserotyp 4/O:3. In erhitzten Fleischprodukten war 4/O:3 der am häufigsten isolierte pathogene Bioserotyp. Bei diesen Proben kann in der Regel von einer Kreuzkontamination zwischen rohen und gekochten Produkten ausgegangen werden. Auch der Keimnachweis bei Geflügel und Lamm ist wahrscheinlich auf eine Kreuzkontamination mit Schweinefleisch auf Einzelhandelsebene zurückzuführen (LOGUE et al. 1996). Untersuchungen von JOHANNESSEN et al. (2000) in Norwegen wiesen mit der kulturellen Methode nach NMKL (Nordic Committee on Food Analysis, NCFA 1996) in 6 von 300 (2 %) rohen Schweinefleischproben *Y. enterocolitica* O:3 nach, wogegen mit einer PCR-Methode nach KAPPERUD et al. (1993) 50 positive Proben (17 %) ermittelt werden konnten. Eine Übersicht über die in Fleischprodukten nachgewiesenen *Y. enterocolitica* gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* in verschiedenen Fleischprodukten

Probenart	Anzahl	patho- gene	%	PCR	%	Quelle
Rohe Produkte						
Zunge	37	11	30	N.U.	N.U.	SCHIEMANN 1980
Zunge	29	28	97	N.U.	N.U.	WAUTERS et al. 1988
Zunge	40	8	20	N.U.	N.U.	DE BOER und NOUWS 1991
Zunge	50	11	22	N.U.	N.U.	SHIOZAWA et al. 1991
Zunge	52	14	27	N.U.	N.U.	KARIB und STEEGER 1994
Zunge	99	79	80	N.U.	N.U.	FREDRIKSSON-AHOMAA 2001c
Zunge	20	15	75	N.U.	N.U.	BUCHER 2001
Innereien	34	17	50	N.U.	N.U.	FREDRIKSSON-AHOMAA 2000a

Probenart	Anzahl	patho- gene	%	PCR	%	Quelle
Innereien	100	48	46	N.U.	N.U.	BUCHER 2001
Hackfleisch	12	1	8	N.U.	N.U.	NESBAKKEN et al. 1985
Hackfleisch	195	0	0	N.U.	N.U.	STEFANOV und BOZHKOVA 1998
Hackfleisch	50	12	24	N.U.	N.U.	WAUTERS et al. 1988
Hackfleisch	400	4	1	N.U.	N.U.	DE BOER und NOUWS 1991
Hackfleisch	125	5	4	N.U.	N.U.	FUKUSHIMA et al. 1985
Hackfleisch	178	16	9	N.U.	N.U.	HANK 2003
Hackfleisch	198	0	0	N.U.	N.U.	ARNOLD et al. 2004
Schweinefleisch	91	2	2	N.U.	N.U.	SCHIEMANN 1980
Schweinefleisch	110	0	0	N.U.	N.U.	NESBAKKEN et al. 1985
Schweinefleisch	267	6	2	N.U.	N.U.	CHRISTENSEN 1987
Schweinefleisch	50	0	0	N.U.	N.U.	IBRAHIM und REA 1991
Schweinefleisch	48	2	4	N.U.	N.U.	KARIB und STEEGER 1994
Schweinefleisch	263	0	0	N.U.	N.U.	DE BOER 1995
Schweinefleisch	90	0	0	N.U.	N.U.	DE GUISTI et al. 1995
Schweinefleisch	1278	37	3	N.U.	N.U.	FUKUSHIMA et al. 1997
Schweinefleisch	22	0	0	N.U.	N.U.	DURISIN et al. 1997
Schweinefleisch	27	2	7	N.U.	N.U.	HANK 2003
Schweinefleisch	95	9	10	N.U.	N.U.	KOCH 2003
Mettwurst	150	0	0	N.U.	N.U.	VELAZQUEZ et al. 1993
Mettwurst	51	0	0	N.U.	N.U.	NORTJE et al. 1999
Salami	8	0	0	N.U.	N.U.	HANK 2003
Zunge	51	40	78	47	92	FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999a
Zunge	15	7	47	10	67	VISHNUBHATLA et al. 2000
Hackfleisch	255	4	2	63	25	FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999a
Hackfleisch	100	32	32	47	47	VISHNUBHATLA et al. 2000
Hackfleisch	350	0	0	133	38	BOYAPALLE et al. 2001
Hackfleisch	100	0	0	35	35	THISTED LAMBERTZ et al. 2006
Schweinefleisch	300	6	2	50	17	JOHANNESSEN et al. 2000
Fleisch, Hackfleisch	91	6	7	9	10	THISTED LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM 2005
Erhitzte Produkte						
Schweinefleisch	25	0	0	N.U.	N.U.	NESBAKKEN et al. 1985
Wurst	33	4	12	N.U.	N.U.	NESBAKKEN et al. 1991
Schinken	100	0	0	N.U.	N.U.	VELAZQUEZ et al. 1993
Schinken	51	0	0	N.U.	N.U.	NORTJE et al. 1999
Schinken	17	0	0	N.U.	N.U.	HANK 2003
Leberkäse	5	0	0	N.U.	N.U.	HANK 2003
Wurst	200	0	0	N.U.	N.U.	VELAZQUEZ et al. 1993
Wurst	51	0	0	N.U.	N.U.	NORTJE et al. 1999
Wurst	61	0	0	N.U.	N.U.	HANK 2003
Wurst	97	0	0	10	11	THISTED LAMBERTZ et al. 2006

YE *Y. enterocolitica*

K.A. keine Angabe

N.U. nicht untersucht

Die Psychrotoleranz erlaubt eine Vermehrung in kühl gelagerten Lebensmitteln bei > 0°C (NESBAKKEN 1985). Die Bakterien können sich auch in vakuumverpacktem Fleisch und bei Verpackung unter modifizierter Atmosphäre (CO₂) im Kühlschrank

vermehrten (HANNA et al. 1976, HARTUNG und GERIGK 1991). Während einer Lagerung bei -18°C erfolgt keine Abtötung, auch nicht nach wiederholtem Auftauen und Einfrieren, und auch die Pathogenität bleibt mehrere Wochen erhalten (SCHIEMANN 1989, TOORA et al. 1992). Nach STOLL (1988) erfolgt die Mehrzahl der Infektionen wahrscheinlich durch kontaminierte, gekühlte oder gefrorene Lebensmittel. Die Hitzeresistenz, Salztoleranz und pH-Toleranz von *Y. enterocolitica* ist vergleichbar mit anderen Enterobacteriaceae (LEE et al 1981). Ein Wachstum ist bei pH-Werten von 4,0-10,0, optimal bei 7,2-7,4, möglich (BERCOVIER und MOLLARET 1984), der minimale a_w -Wert beträgt 0,95 (FEHLHABER und JANETSCHKE 1992). Der Keim überlebt die Pasteurisierung nicht (HANNA et al. 1977). HEIM et al. (1984) zeigten, dass eine 15-minütige Erhitzung auf 57°C bzw. 5 min auf 60°C zur Inaktivierung des Keimes führten. Nach ROBINS-BROWNE (1997) hemmen auch Natriumnitrat und Nitrit, die Nahrungsmitteln zugegeben werden, das Wachstum der Bakterien. Jedoch kann *Y. enterocolitica* bei Kochsalzkonzentrationen bis zu 5 % bestehen.

1.5.4. Übertragungsmöglichkeiten

Während des Schlachtvorganges kontaminiertes Schweinefleisch ist als Hauptinfektionsquelle der Yersiniose des Menschen anzusehen. Die Kontamination erfolgt durch den *Y. enterocolitica*-haltigen Kot infizierter Schweine und durch kontaminierte Böden während des Verweilens in den Wartebuchten (FUKUSHIMA et al. 1990), oder ausgehend von der Tonsillenregion während des Schlachtprozesses (DE BOER und NOUWS 1991, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a). Die Technik des Schlachtprozesses spielt bei der Kontamination von Fleischprodukten durch *Y. enterocolitica* eine entscheidende Rolle. Durch das gemeinsame Herauslösen von kontaminierten Tonsillen zusammen mit der Zunge kann es zur Kontamination der Zunge mit dem Erreger kommen. Kreuzkontaminationen von Zunge zu Zunge erfolgen im Schlachthaus und später im Einzelhandel (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999a, 2000b). Solange das Schwein ein symptomloser Träger von *Y. enterocolitica* ist, kann es während der vorgeschriebenen Fleischuntersuchung praktisch nicht als solches erkannt werden (NESBAKKEN und SKJERVE 1996). Die Infektion des Menschen erfolgt vor allem über nicht oder unzureichend erhitztes Schweinefleisch (KAPPERUD 1991), vor allem Hackfleisch ist möglicherweise ein wichtige Quelle für pathogene *Y. enterocolitica* (FREDRIKSSON-AHOMAA et al.

2001a). In den USA sind mehrere Ausbrüche auf den Verzehr von "chitterlings" zurückzuführen, einem Traditionsgericht von Afroamerikanern, das aus rohen Schweinedärmen hergestellt wird (LEE et al. 1991). In Belgien und den USA wurde ein direkter Zusammenhang zwischen unzureichend erhitztem Schweinefleisch und Ausbrüchen von Yersiniose bei Menschen nachgewiesen (TAUXE et al. 1987, Centers for disease control 1990, LEE et al. 1991, N.N. 1996). In Ländern, in denen kein Schweinefleisch verzehrt wird, ist die Infektionsrate beim Menschen deutlich geringer (SAMADI et al. 1982).

Auch wird Milch (roh oder pasteurisiert, z.B. Schokoladen- oder Trockenmilch) wiederholt als Infektionsquelle für Krankheitsausbrüche mit *Y. enterocolitica* erwähnt. In allen Fällen konnte jedoch keine originäre Besiedlung der Milch festgestellt werden, sondern es war immer eine Sekundärkontamination erfolgt. Milch diente somit nur als Vehikel, dessen Milieu die Überlebensfähigkeit von *Y. enterocolitica* positiv beeinflusst (BLACK et al. 1978, BARRETT 1986, ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990).

Als Infektionsquelle für den Serotyp O:8 gelten kontaminiertes Wasser oder Lebensmittel, welche mit kontaminiertem Wasser gewaschen wurden (Bohnensprossen, Tofu), ebenso wie Milchprodukte (SCHIEMANN 1989, ROBINS-BROWNE 1997). Auch Tofu, Sojabohnenquark und Sojabohnensprossen wurden in den USA als Ursache von Ausbrüchen ermittelt. Die Ursache war eine Sekundärkontamination bei der Herstellung (COVER und ABER 1989). FALCAO et al. (2004) konnten aus Wasser unterschiedlichen Ursprungs pathogene Yersinien isolieren. Untersuchungen mittels PCR von SANDERY et al. (1996) wiesen in 12 % Umwelt-Wasserproben aus Australien pathogene, *ail*-positive, *Y. enterocolitica* nach.

Die resultierende Sepsis nach Infektion über kontaminierte Blutkonserven verläuft weitaus gefährlicher als die alimentäre Form. Die Psychrotoleranz, und damit die Möglichkeit sich auch im gekühlten Blut zu vermehren, spielt hierbei eine entscheidende Rolle (JACOBS et al. 1989, ABER 1990, NESBAKKEN 1992).

1.6. Nachweis

Den Nachweis der Keime kann gegenwärtig in konventionelle Methoden mit mikrobiologischer Keimanzüchtung und in immunologische/molekularbiologische Methoden eingeteilt werden. Traditionelle kulturelle Methoden führen aufgrund der verhältnismäßig geringeren Nachweishäufigkeit zu einer deutlichen Unterschätzung der Prävalenz (OLSEN et al. 1995). Eines der größten Probleme ist die reiche Hintergrundflora, welche in der Regel bei normalen Bebrütungstemperaturen *Yersinien* überwuchert. Die klassischen kulturellen Verfahren sind zudem vergleichsweise zeitaufwendig. Nur die Kombination mehrerer kultureller Isolierungsverfahren kann in der Routinediagnostik eine ausreichende Sensitivität gewährleisten (AULISIO et al. 1980, ALDOVA et al. 1990).

1.6.1. Klassische Nachweisverfahren

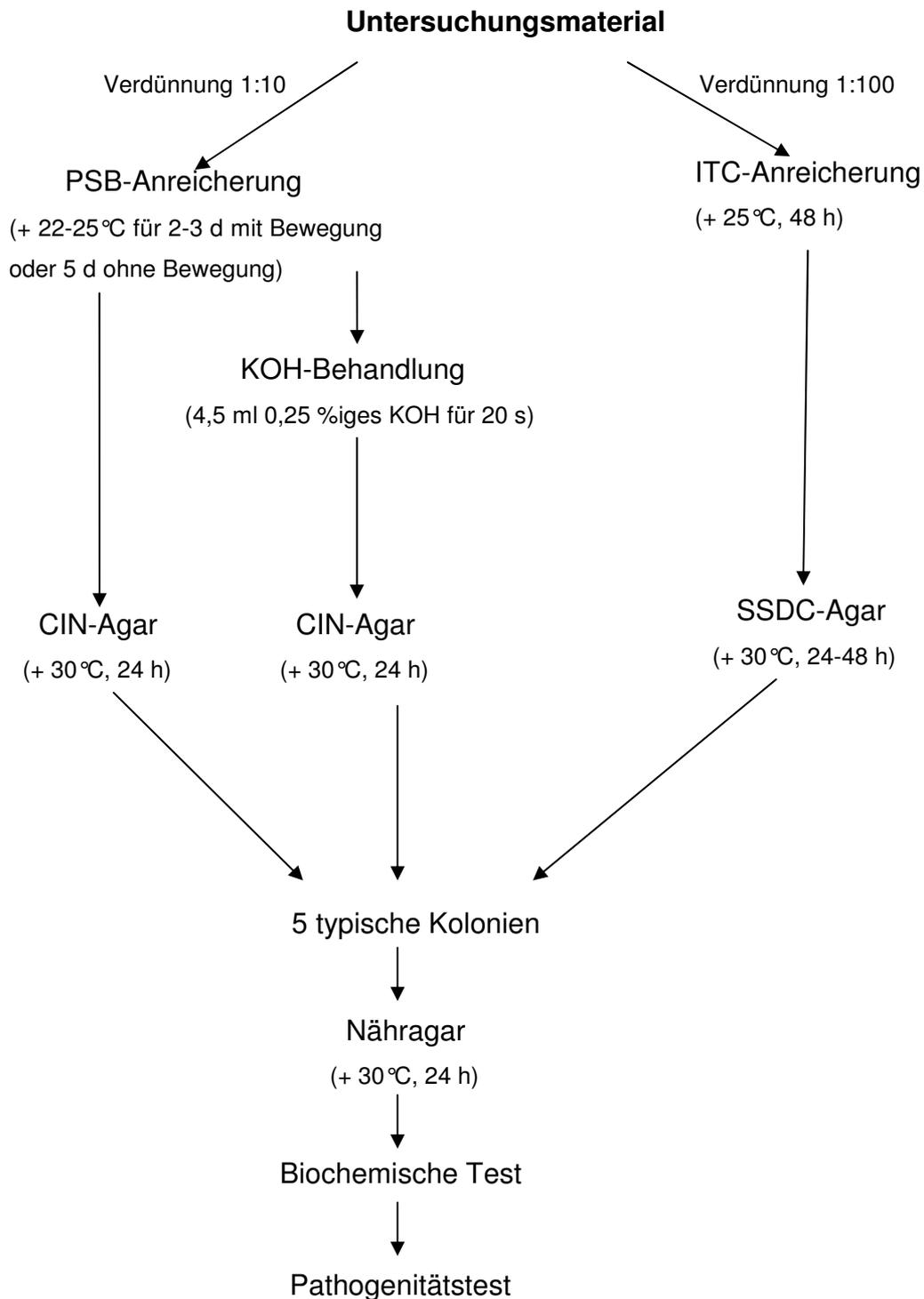
Eine Anzucht und Isolierung ist auf den meisten zum Nachweis von Enterobacteriaceae gebräuchlichen Nährböden möglich (Plate Count (PC)-, MacConkey-, Salmonella-Shigella-Agar). Jedoch sind über die selektiven Anreicherungsverfahren und Indikatornährböden *Y. enterocolitica* effizienter und besser zu beurteilen (BOCKEMÜHL 1999). Zum Nachweis von *Y. enterocolitica* aus Lebensmittelproben hat sich, aufgrund der geringen Keimzahlen in den Proben, die Direktkultivierung auf festen Selektivmedien, ohne vorherige Anreicherung, nicht bewährt (STENGEL 1983).

Die DIN EN ISO 10273 stellt das Grundprinzip des Nachweises von pathogenen *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln dar. Die Methoden nach § 64 LFGB und des Nordic Comitee on Food Analysis (NCFA 2003) orientieren sich daran. Dabei erfolgt der Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* durch unspezifische Anreicherung im Verhältnis 1:10 in Pepton-Sorbit-Gallensalz-Bouillon (PSB) über 2-5 Tage, sowie selektive Anreicherung in Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat (ITC)-Bouillon im Verhältnis 1:100 über 48 h bei 25°C. Anschließend werden die Keime auf Selektivmedien ausgestrichen, zum einen aus der PSB-Anreicherung auf Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN)-Agar, mit und ohne vorheriger Kaliumhydroxidbehandlung, zum anderen aus der ITC-Anreicherung auf Salmonella-Shigella-Agar mit Natriumdesoxycholat und Calciumchlorit (SSDC-Agar). Die Platten werden jeweils für

24-48 h bei 30°C bebrütet. Fünf charakteristische Kolonien werden dann in Reinkultur auf einen Nähragar ausgestrichen und 24h bei 30°C bebrütet, um anschließend biochemisch untersucht zu werden (Vorprüfung, Bestätigung und Untersuchung auf Pathogenität). Die Untersuchung auf präsumptive Pathogenität erfolgt durch Prüfung der Äskulinvergärung (bei pathogenen *Y. enterocolitica* negativ), durch Pyrazinamidasenachweis (negativ) und Prüfung der Calciumabhängigkeit bei 37°C (positiv, durch Virulenzplasmid codiert). Eine Übersicht gibt Abbildung 1.

Neben den in den amtlichen Methoden verwendeten Anreicherungsmedien PSB und ITC besteht auch die Möglichkeit der Anreicherung in Typtose Soya Bouillon (TSB) bzw. Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (CASO). Eine weitere, aber sehr zeitaufwendige Methode ist die Kälteanreicherung in phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS) bei 4°C für 14 Tage (mindestens 7 d, optimal 21 d) (SCHIEMANN 1989, DE BOER und NOUWS 1991).

Die nachfolgende Alkalibehandlung mit verdünnter KOH-Lösung (0,25-0,5 %) führt nach AULISIO et al. (1980) oft zu einer höheren Isolationsrate, da sie hemmend auf die Begleitflora wirkt. Bei diesem Verfahren wird die relative Unempfindlichkeit von *Y. enterocolitica* gegenüber Alkalien ausgenutzt (DOYLE et al. 1981, DOYLE und HUGDAHL 1983, DELMAS und VIDON 1985, HAHN 1989, PICHHARDT 1989). Der Erfolg der Alkalibehandlung wird kontrovers diskutiert, da manche Stämme Alkalisensitiv sind. Deshalb sollten die Proben vor und nach KOH-Behandlung ausgestrichen werden (SCHIEMANN 1989, LONGUE et al. 1996). Nach § 64 LFGB und NCFA werden 0,5 ml der inkubierten Anreicherungskultur mit 4,5 ml 0,25 %iger KOH-Lösung (0,25 % KOH in 0,5 % NaCl) für 20 s gemischt und dann auf Selektivagar ausgestrichen.

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Untersuchung nach DIN EN ISO 10273

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

Zu den Selektivmedien zählt der SSDC-Agar, welcher sich für den Nachweis von *Y. enterocolitica* des Serotyps O:3 nach ITC-Anreicherung am besten eignet. Für andere pathogene und nicht-pathogene Stämme eignet sich SSDC jedoch weniger (WAUTERS 1973, WAUTERS et al. 1988). Nach DE BOER (1995) wachsen einige Spezies von *Morganella*, *Proteus*, *Serratia* und *Aeromonas* ebenfalls auf SSDC-Agar und sind evtl. schwer von Yersinien zu unterscheiden. SCHIEMANN (1979) entwickelte als weiteren Selektivnährboden den CIN-Agar (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar, *Yersinia*-Selektiv-Agar nach SCHIEMANN). Das Antibiotikum Irgasan hemmt gram-negative Keime (z.B. *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. mirabilis*), Cefsulodin hemmt *Pseudomonas aeruginosa*. Yersinien fermentieren das zugesetzte Mannit zu Säure, der Indikator Neutralrot färbt nach Bebrütung bei 28 °C für 24-48 h das Zentrum der kleiner als 1 mm großen, glatten und glänzenden Kolonien rot. Diese besitzen dann ein rotes (dunkelviolettes) Zentrum mit klarem, farblosen Rand, das so genannte "Kuhauge" (NEUBAUER et al. 2001). Bei Bakterien, die ein ähnliches Erscheinungsbild wie Yersinien auf dem CIN-Agar zeigen, handelt es sich meist ebenfalls um *Enterobacteriaceae*. Eine Unterscheidung ist nicht immer möglich (BUCHER et al. 2002b). Keime mit ähnlichen Erscheinungsbild gehören vor allem folgenden Gruppen an: *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Morganella spp.*, *Pantoea spp.*, *Proteus spp.* und *Providencia spp.*, welche auch häufig in Hackfleisch vorkommen (KLEEBERGER und BUSSE 1975, DE BOER und SELDAM 1987, BUCHER et al. 2002b). Vor allem die Abgrenzung zwischen apathogenen Yersinien und Yersinien welche das Virulenz-Plasmid während der Kultur verloren haben bzw. anderen Keimen ist schwierig, während das Wachstum plasmidtragender pathogener Yersinien für den erfahrenen Untersucher charakteristisch und gut differenzierbar ist (BUCHER et al. 2002b). Nach FUKUSHIMA und GOMYODA (1986) zeigen *Y. enterocolitica* Biotyp 2 Serotyp O:5,27 und O:9, sowie Biotyp 1 Serotyp O:8 ein ähnliches Aussehen wie Yersinien die in der Umwelt vorkommen, vor allem *Y. intermedia*. Außerdem soll das Wachstum des Biotyps 3B Serotyp O:3 gehemmt werden.

1.6.1.1. Identifizierung

Für eine erste Orientierung eignet sich in erster Linie der Urease-Nachweis (SCHIEMANN 1989). KERBER (1997) empfiehlt zusätzlich die Prüfung von Lysin-Decarboxylase, Oxidase und Beweglichkeit. Die Identifizierung von *Y. enterocolitica*-verdächtigen Kolonien erfolgt durch biochemische Differenzierung. Hier

sind einfache kommerzielle Systeme verfügbar, z.B. das API 20E-System, welches bis heute als "Gold-Standard" gilt (IZARD et al. 1984, OVERMAN 1985). Verdächtige Kolonien auf CIN-Agar (24 h bei 30°C) werden dazu auf Nähragar subkultiviert und wiederum 24 h bei 30°C bebrütet und dann anhand der biochemischen Reaktionen identifiziert (ARNOLD et al. 2004). Das API 20E-System hat eine positive Identifizierungsrate von 93 % für *Y. enterocolitica* nach Inkubation bei 28°C anstatt 37°C (ARCHER et al. 1987).

1.6.1.2. Bio- und Serotypisierung

Durch Bio- und Serotypisierung kann eine weitere Unterscheidung innerhalb der *Y. enterocolitica*-Spezies vorgenommen werden. Auf die biochemische Differenzierung der Biotypen wird in Kap. 1.1.1., Tabelle 2 eingegangen. Die amtlichen Methoden verwenden folgende Nachweise: Lysin, Ornithin, Saccharose, Rhamnose, Trehalose, Xylose, Citrat und Tween-Esterase. Der Serotyp kann durch Objektträger-Agglutination mit spezifischen Antisera bestimmt werden (NEUBAUER et al. 2000b).

1.6.1.3. Pathogenitätsnachweis

Wie bereits erwähnt beruht die Pathogenität sowohl auf chromosomal- als auch plasmidcodierten Faktoren. Folgende Verfahren ermöglichen einen einfachen Nachweis der plasmidcodierten Eigenschaften mit wenig Aufwand: Autoagglutination, Serumresistenz, calciumabhängiges Wachstum bei 37°C und Kongorot-Bindungsfähigkeit bei 37°C (BOTTONNE 1997). Zur Untersuchung auf Autoagglutination werden Röhrchen mit Voges-Proskauer-Bouillon beimpft. Eine Agglutination bei 37°C wird als positive Reaktion gewertet (LAIRD und CAVANAUGH 1980, FARMER et al. 1992, BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Die Serumresistenz kann z.B. mit Hilfe von Pferdeserum nachgewiesen werden, durch Vergleich des Wachstums einer verdächtigen Bakterienkolonie auf inaktiviertem und nicht inaktiviertem Serum. Wenn die Keime auch auf dem nicht inaktiviertem Serum wachsen, spricht das für eine Serumresistenz (KERBER 1997). Das calciumabhängige Wachstum bei 37°C und die Absorption von Kongorot können gemeinsam mit Hilfe des Kongorot-Magnesium-Oxalat-Agars (CRMOX-Agar) von RILEY und TOMA (1989) bei 37°C innerhalb von 24 h durchgeführt werden.

Die chromosomal codierten pathogenen Eigenschaften können mit Hilfe der Reaktion von Pyrazinamidase nach KONDOLO und WAUTERS (1985), Salicin und Aesculin

beurteilt werden. Pathogene Stämme zeigen keine Pyrazinamidase-Aktivität, keine Salicinfermentation und keine Äskulinhydrolyse.

Eine Kombination von CRMOX, Salicin, Äskulin und Pyrazinamidase-Tests liefert eine verlässliche Methode um zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Stämmen zu unterscheiden (RILEY und TOMA 1989, FARMER et al. 1992, BUCHER et al. 2002a). Nach § 64 LFGB sind folgende Tests anzuwenden: Äskulinnachweis, Pyrazinamidasenachweis und Überprüfung der Calciumabhängigkeit bei 37 °C.

1.6.2. Molekularbiologische Nachweismethoden

Da im Lebensmittel sowohl apathogene als auch pathogene *Y. enterocolitica* vorkommen können, ist ein Hauptziel der molekularbiologischen Methoden die Detektion von pathogenen Keimen (OLSEN et al. 1995). Die molekularbiologischen Nachweismethoden auf pathogene Yersinien konzentrieren sich in der Literatur auf die PCR. Daneben wird jedoch auch auf andere Verfahren verwiesen, wie die DNA-Hybridisierung (GOVERDE et al. 1993, DURISIN et al. 1997).

Bei der Nukleinsäure-Hybridisierung werden die Bakterien auf einem selektiven Medium, auf das ein Filter gelegt wurde, angezüchtet. Nach einer chemischen Behandlung des Filters, wodurch die DNA aus dem Zellkern herausgelöst wird, wird eine spezielle Sonde für *Y. enterocolitica* aufgebracht. In der anschließenden Hybridisierung bindet die DNA-Sonde an ihr komplementäres Gegenstück, die bakterielle DNA. Somit wird es möglich *Y. enterocolitica* selektiv zwischen anderer Bakterien-DNA zu identifizieren (HILL und KEASLER 1991).

Die PCR-Methoden zum Nachweis von *Y. enterocolitica* können in konventionelle PCR-Methoden mit Gelelektrophorese und in Real-Time PCR-Methoden, bei welchen das Amplifikationsprodukt in "Echt-Zeit" mittels fluoreszierender Farbstoffe detektiert wird, aufgeteilt werden. In der Regel erfolgt vor der PCR-Analyse eine Anreicherung. Dadurch werden inhibitorische Substanzen der Probenmatrix verdünnt. Die Bakterien können sich vermehren und detektierbare Konzentrationen erreichen und tote Mikroorganismen werden verdünnt (KNUTSSON et al. 2002a). Um möglichst eine geringe Ausgangskonzentration von *Y. enterocolitica* in den Proben zu detektieren, erfolgt die Anreicherung meist in selektiven

Anreicherungsmedien wie ITC (JOURDAN et al. 2000, BOYAPALLE et al. 2001), TSB (WOLFFS et al. 2004) oder PSBB (VISHNUBHATLA et al. 2000). Die PCR kann auch zur Bestätigung von verdächtigen Kolonien nach mikrobiologischer Untersuchung durchgeführt werden.

Inzwischen gibt es zahlreiche PCR-Nachweismethoden für *Y. enterocolitica* auf der Grundlage verschiedener Gene. Bei dem Nachweis spezifischer Gene ist zugleich die Prüfung der Pathogenität möglich. Diese sind entweder plasmid- oder chromosomal codiert. In Tabelle 5 sind PCR-Methoden, basierend auf unterschiedlichen Genen, zum Nachweis von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln oder nach kultureller Anzucht, aufgeführt.

Zu den **chromosomalen Zielgenen** gehört zum einen das *ail*-Gen, welches nur in pathogenen Stämmen vorkommt, und zum anderen das *inv*-Gen. Das *inv*-Gen kommt in allen Yersinien vor, es eignet sich somit zur Bestätigung der Gattung *Yersinia* (FALCAO et al. 2004). Ein weiteres chromosomales Zielgen ist das *yst*, welches Sequenzunterschiede zwischen den amerikanischen und europäischen Stämmen zeigt (IBRAHIM et al. 1992) und nur in pathogenen *Y. enterocolitica*-Stämmen nachweisbar ist (DELOR et al. 1990, BOTTONE 1999). Allerdings wurde ein homologes *yst*-Gen in einigen Isolaten von *Y. kristensenii* gefunden (DELOR et al. 1990, IBRAHIM et al. 1997). IBRAHIM et al. (1992) beschreibt eine PCR-Methode, mit welcher anhand des *yst*-Genes zwischen *Y. enterocolitica* der amerikanischen und europäischen Stämme unterschieden werden kann. *Y. enterocolitica* der Serotypen O:1,3, O:2a,3, O:3, O:5,27 und O:9, welche den europäischen Stämmen angehören, produzieren dabei wie erwartet ein 200 bp großes Fragment, während *Y. enterocolitica* der amerikanischen Stämme (Serotypen O:4,32, O:8, O:13a,13b, O:20, O:21) eine starke 1,6 kb- und eine schwächere 1,4 kb-Bande erzeugen, aber die 200 bp-Bande fehlt. NAKAJIMA et al. (1992) beschrieben ein PCR-Verfahren, durch welches *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* gleichzeitig detektiert und identifiziert werden kann. Sie kombinierten die Primer für das *inv*-Gen von *Y. pseudotuberculosis*, das *ail*-Gen und das plasmidcodierte *virF*-Gen von *Y. enterocolitica* miteinander in einer Multiplex-PCR. PCR-Methoden zur Detektion der 16S rRNA werden allgemein häufig verwendet, um die Verwandtschaft

von Bakterien zu untersuchen. Anhand der PCR-Methode nach NEUBAUER et al. (2000a) können amerikanische und europäischen Stämme unterschieden werden.

Zu den **plasmidcodierten Zielgenen** gehören das *virF*-Gen und das *yadA*-Gen. Diese Gene ermöglichen die Erkennung von pathogenen Keimen (NEUBAUER et al. 2000a, 2001). Zu beachten ist, dass PCR-Methoden, welche das *virF*-Gen als Zielgen verwenden, auch für plasmidtragende *Y. pseudotuberculosis*-Stämme positive Ergebnisse liefern (HARNETT et al. 1996). Zudem besteht bei PCR-Methoden, die ein plasmidcodiertes Gen nachweisen, die Gefahr von falsch-negativen Ergebnissen, da unter bestimmten Bedingungen das pYV verloren gehen kann, z.B. durch Inkubation bei 37°C und häufige Subkultivierung, aber auch durch zu lange Lagerung (BLAIS und PHILLIPPE 1995, THOERNER et al. 2003). Einige Autoren beschreiben deshalb PCR-Programme zum gleichzeitigen Nachweis von chromosomalen und plasmidcodierten Genen (NAKAJIMA et al. 1992, NILSSON et al. 1998).

Das Nordic Committee on Food Analysis (NCFA 1998) beschreibt zwei alternative Methoden zum PCR-Nachweis von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln: Methode A basiert auf einer einfachen PCR mit *ail* als Zielgen, die Sensitivität wird mit 1-10 KbE/g Probe angegeben. Dabei werden die Proben über Nacht in TSB angereichert und im Bact-Xtractor™-Dichtegradient zentrifugiert. Nach der Zellyse mittels NaOH und Erhitzung wird eine PCR durchgeführt. Zusätzlich werden die Proben nach der Anreicherung auf CIN-Agar ausgestrichen und verdächtigen Kolonien ebenfalls mit der PCR untersucht. Dieselbe PCR-Methode, nur mit anderen Primern kann auch auf das *virF*-Gen angewendet werden. Die Methode B ist eine sogenannte nested-PCR, welche das auf dem Plasmid lokalisierte *yadA*-Gen detektiert. Die Proben werden zur Erhöhung der Sensitivität über Nacht in TSB angereichert. Vor der PCR werden die Proben zentrifugiert und mit Proteinase K und Erhitzung behandelt. Alternativ kann auch eine Immunomagnetische Separation (IMS) durchgeführt werden. Die Detektion erfolgt bei beiden Methoden mittels Gelelektrophorese.

Tabelle 5: PCR-Methoden zum Nachweis von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln oder Kultur

Gen	Referenz
<i>ail</i>	KWAGA et al. 1992, NCFA 1998, THISTED LAMBERTZ et al. 2000, RAMESH et al. 2002
<i>yadA</i>	KAPPERUD et al. 1993
<i>virF</i>	NCFA 1998, WREN und TABAQCHALI 1990, THISTED LAMBERTZ et al. 2000
<i>yst</i>	IBRAHIM et al. 1992, 1997, WANG et al. 1997, ÖZBAS et al. 2000
16S rRNA	NEUBAUER et al. 2002a
<i>ail, virF*</i>	BHADURI und PICKARD 1992, NAKAJIMA et al. 1992, KANEKO et al. 1995, BHADURI und COTTRELL 1998, NILSSON et al. 1998
<i>ail, yadA*</i>	BLAIS und PHILIPPE 1995, DICKINSON et al. 1995, BOYAPALLE et al. 2001
<i>ail, 16S rRNA*</i>	WANNET et al. 2001
<i>ail, yst, virF*</i>	HARNETT et al. 1996
<i>ail, ystA, inv, yadA, virF*</i>	THOERNER et al. 2003

* Multiplex PCR

Inzwischen existieren auch einige Real-Time PCR-Methoden. Diese ermöglichen einen schnellen Nachweis von *Y. enterocolitica*, basierend auf unterschiedlichen Genen, in verschiedenen Matrices. Eine Übersicht über bisher beschriebene Real-Time PCR-Methoden gibt Tabelle 6.

Eine Real-Time PCR-Methode, zum spezifischen Nachweis von *Y. enterocolitica* des Serotyps O:9 wurde von JACOBSEN et al. (2005) entwickelt. Dabei wird ein Fragment des *per*-(perosamine synthetase) Genes nachgewiesen. FUKUSHIMA et al. (2003) entwickelten eine Real-Time PCR mit SYBR-Green zur gemeinsamen Detektion von 17 Lebensmittel- und Wasserpathogenen in Stuhlproben mit 20 Primer-Paaren. Die Primer zur Detektion von *Y. enterocolitica* weisen dabei ein Fragment des *yadA*-Genes nach. Die Identifikation der Amplifikationsprodukte erfolgt über die Schmelzkurvenanalyse.

Tabelle 6: Real-Time PCR-Methoden zum Nachweis von *Y. enterocolitica*

Gen	Referenz
<i>ail</i>	JOURDAN et al. 2000, BOYAPALLE et al. 2001
<i>yadA</i>	FUKUSHIMA et al. 2003, WOLFFS et al. 2005
<i>yst</i>	VISHNUBHATLA et al. 2000, 2001
16S rRNA	KNUTSSON et al. 2002a, WOLFFS et al. 2004, 2005
<i>per</i>	JACOBSEN et al. 2005

2000 startete ein EU-Forschungsprojekt (FOOD-PCR) mit dem Ziel, die Anwendung der diagnostischen PCR für die Detektion von Lebensmittelpathogenen zu harmonisieren, validieren und standardisieren. Die Forschung bezieht sich auf nicht-kommerzielle und unpatentierte, standardisierte PCR-basierende Detektionsmethoden von fünf wichtigen Pathogenen, *Salmonella spp.*, thermophile *Campylobacter spp.*, enterohämorrhagische *E.coli* (EHEC), *L. monocytogenes* und *Y. enterocolitica*. Dabei konzentriert sie sich auf vier Probenarten der primären Lebensmittelproduktion: Geflügelschlachtkörper-Spülwasser, Tupfer vom Schweineschlachtkörper, Rindertupfer und Milch. Die PCR-Methoden einschließlich Probenvorbereitung sollen nach der Entwicklung und Vorprüfung in einem Forschungslabor in mehreren Laboratorien in Ringversuchen getestet werden. Dazu existiert eine online-Datenbank: www.pcr.dk (MALORNY et al. 2003).

2. Polymerase Chain Reaction

Bei der Polymerase Chain Reaction (PCR) handelt es sich um eine In-vitro-Technik, welche gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigt. Sie zählt zu den wichtigsten molekularbiologischen Nachweismethoden. Im Laufe der letzten 20 Jahre hat die Methode Einzug in sehr viele Bereiche der biochemischen Grundlagenforschung und der angewandten Forschung gehalten. Die PCR arbeitet hochspezifisch, das heißt es ist bereits der Nachweis eines einzigen bakteriellen oder viralen Genoms möglich (STREYER 1996).

Konventionelle Methoden zum Nachweis von Bakterien in Lebensmitteln, wie Mikroskopie, Kultur, Antigennachweis und Serologie, sind zwar kostengünstig und

können sowohl qualitative als auch quantitative Informationen über die Art und Anzahl der Mikroorganismen liefern. Allerdings sind sie auch arbeits- und zeitaufwendig, da das Ergebnis erst nach einigen Tagen vorliegt. Zudem ist die Detektion von lebensfähigen, aber nicht kulturfähigen Zellen unmöglich. Auch die Sensitivität ist häufig gering. Das Nachweifenster ist in der Regel eng und die Interpretation ist oft komplex. Außerdem kann das Ergebnis durch Immunsuppression, Antibiotikatherapie, reiche Hintergrundflora und unspezifische Kreuzreaktionen verfälscht werden (WHELAN und PERSING 1996, CARMAN et al. 2000, MACKAY 2004). Vor allem in der Nahrungsmittelindustrie herrscht die Nachfrage nach schnelleren Methoden, um angemessene Informationen über die Anwesenheit von Pathogenen in rohen und fertigen Lebensmittelprodukten, beim Herstellungsprozess und zur Überwachung von Reinigungs- und Hygienepraktiken zu erhalten. Eine PCR liefert nach einer eventuellen Anreicherung innerhalb von wenigen Stunden ein Ergebnis (DE BOER und BEUMER 1999). Hier werden sowohl tote, lebensfähige aber nicht kultivierbare und kultivierbare Mikroorganismen detektiert. Durch vorherige Anreicherung oder Kombination von Kultur und PCR kann man auf vermehrungsfähige Mikroorganismen schließen (KAPPERUD et al. 1993).

In der Lebensmittelanalytik wird die PCR derzeit vorwiegend in folgenden Bereichen eingesetzt:

1. Nachweis und Identifikation von Keimen
2. Tierartendifferenzierung bzw. Artendifferenzierung bei pflanzlichen Lebensmitteln zum Nachweis von Verfälschungen
3. Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen

2.1. Prinzip der PCR

Die PCR ermöglicht die Amplifikation einer bestimmten DNA-Region in vitro durch Imitation der in vivo DNA-Replikation in der Zelle (ROLFS et al. 1992, KRONBERG 1998). Eine DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend von Startermolekülen einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize, der Template-DNA. Als Startermoleküle werden zwei synthetische DNA-Oligonukleotide = Primer verwendet, welche gegenläufig orientiert sind. Es erfolgt eine gezielte Vervielfältigung der DNA-Sequenz zwischen diesen zwei Primern. Durch zyklische

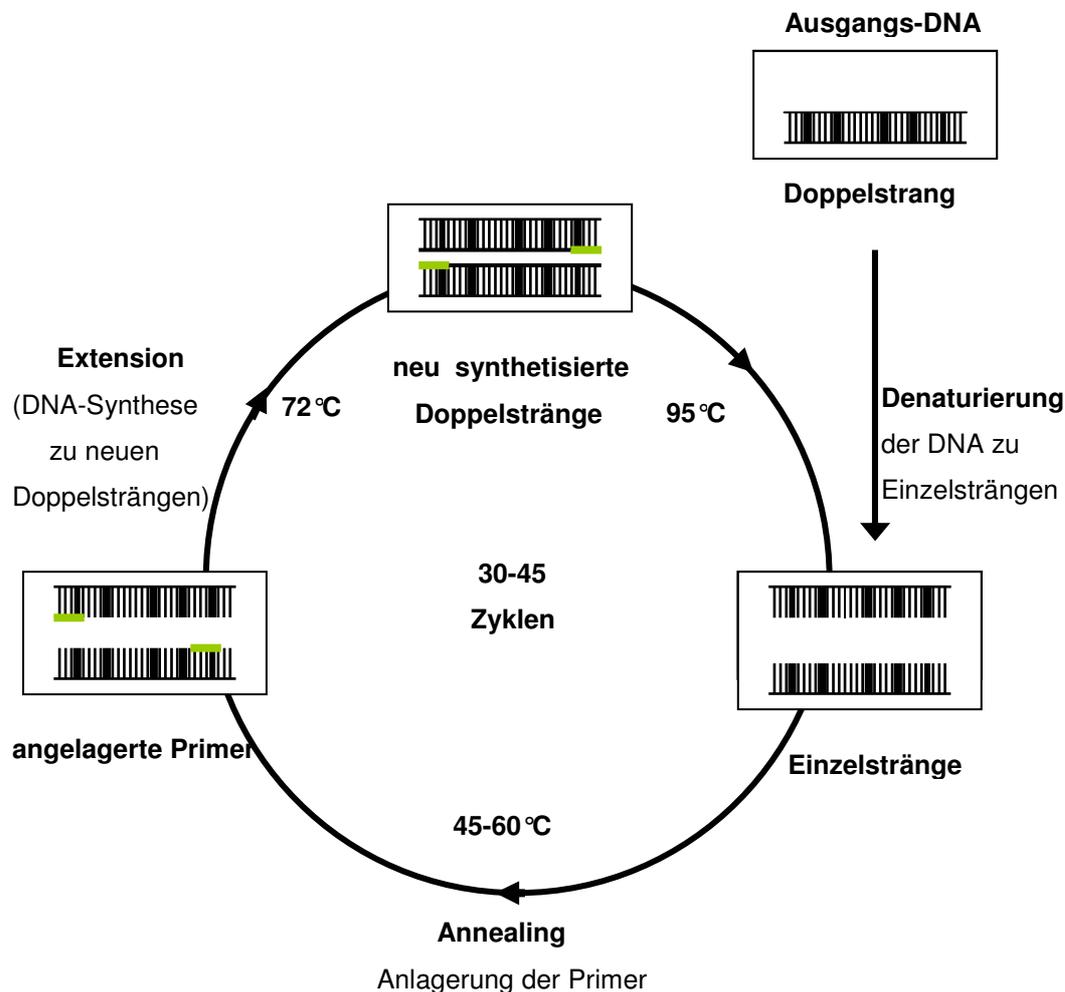
Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte wird die Matrize exponentiell amplifiziert (BANGSOW et al. 2002).

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten, wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt: Er beginnt mit der thermischen Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 90-95°C. Dadurch entstehen einzelsträngige DNA-Templatemoleküle. Dieser Schritt dauert bei konventionellen PCR-Methoden in der Regel 30 s. Bei einer Real-Time PCR dauert diese Denaturierung oft nur 0,1 s (WOLFFS et al. 2004, 2005) oder 15 s (JOURDAN et al. 2000, BOYAPALLE et al. 2001, JACOBSEN et al. 2005). Als zweiter Schritt erfolgt die Hybridisierung der Primer an komplementäre Sequenzen des einzelsträngigen DNA-Stranges bei 45-60°C (Temperatur abhängig von den eingesetzten Primern) für ca. 30-60 s (Annealing). Auch dieser Schritt benötigt bei einigen Real-Time PCR-Protokollen nur 5–10 s (WOLFFS et al. 2004, 2005). Im dritten Schritt wird die Synthese des dazwischen gelegenen Sequenzabschnittes eingeleitet, welche bei 72°C durch die Taq-Polymerase erfolgt (Extension, Elongation) (OLSEN et al. 1995, BANGSOW et al. 2002). Bei einer konventionellen PCR dauert dieser Elongationsschritt in der Regel 30-90 s, bei einer Real-Time PCR sind meist 15–30 s ausreichend (VISHNUBHATLA et al. 2000, WOLFFS et al. 2004, 2005). Zudem werden bei der Real-Time PCR häufig der Annealing- und Elongationsschritt zu einem ca. 1-minütigen Schritt bei der Annealing-Temperatur zusammengefasst (JOURDAN et al. 2000, BOYAPALLE et al. 2001).

Die Zyklen finden in einem Thermocycler mit einem temperierbaren Reaktionsraum, in den die PCR-Probengefäße gestellt werden, statt. Die Temperatur und Zeit pro Reaktionsschritt und die Zyklenzahl sind individuell programmierbar. Bei neueren Geräten können die angegebenen Zeiten durch schnellere Aufheiz- und Abkühlphasen auch wesentlich verkürzt werden.

Im Gegensatz zur konventionellen PCR mit Gelelektrophorese zur Detektion erlaubt die Real-Time PCR die Messung der entstehenden PCR-Produkte bereits während des PCR-Laufs mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden (SAGNER et al. 1999).

Abbildung 2: Schematische Darstellung einer PCR (nach VON HAESLER und LIEBERS 2003)



Es werden i.d.R. 30-35 Zyklen, max. 45, durchgeführt, die Anzahl ist abhängig von der Menge an Template-DNA, d.h. bei einer geringen Menge an DNA sollte die Zyklenanzahl erhöht werden (BANGSOW et al. 2002). Mit steigender Anzahl der Zyklen nimmt allerdings auch die Anzahl der unerwünschten Artefakte zu, ohne dass sich die Menge der Ziel-DNA entscheidend erhöht. So werden selten mehr als 45 Zyklen verwendet (NEWTON und GRAHAM 1997).

Der erste Denaturierungsschritt dauert normalerweise mit 2-5 min etwas länger, damit die gesamte DNA einzelsträngig vorliegt. Auch der letzte Extensionsschritt dauert mit 5-10 min länger, damit die Polymerase Zeit hat, alle restlichen DNA-Stränge zu vervollständigen und sich noch einzelsträngig vorliegende komplementäre Produkte zusammenlagern können (ROLFS et al. 1992).

Die Vermehrung der DNA während des PCR-Laufes geht nach exponentieller Vermehrung gegen Ende allmählich in eine Plateauphase über. Als Ursache kommen dafür in Frage, dass zum einem die Verfügbarkeit an Substraten (dNTPs oder Primer) abnimmt, es zur Enzymdenaturierung kommt, die Denaturierungseffizienz abnimmt, unspezifische Produkte um die Reagenzien konkurrieren, die spezifischen Produkte sich ab einer Konzentration von über 10^{-8} M wieder zusammenlagern und die entstehenden Pyrophosphate und doppelsträngige DNA die Polymerase hemmen (Endproduktinhibition) (INNIS und GELFAND 1990). Die exponentielle Phase ist zur Quantifizierung im Vergleich zur Plateauphase, in welcher die Reaktionsbedingungen suboptimal sind und die Bandenintensität trotz anfänglich unterschiedlicher Templatekonzentrationen gleich bleibt, besser geeignet (MC KILLIP und DRAKE 2004).

Für eine PCR werden folgende Komponenten benötigt: die zu kopierende DNA-Matrize, eine DNA-Polymerase, Desoxynukleotide, zwei verschiedene Oligonukleotid-Primer und ein geeignetes Puffersystem, das die Verhältnisse in der lebenden Zelle nachahmt (SCHWÄGELE 1999).

2.1.1. Template

Das Template ist die DNA-Vorlage, welche die Ziel-DNA in möglichst reiner Form enthalten soll. Als Template wird DNA benötigt. 100-500 ng Ausgangs-DNA sind für den PCR-Nachweis ausreichend (ROLFS et al.1992, SCHWÄGELE 1999). Je PCR-Ansatz werden 2-5 μ l Template eingesetzt.

Auch RNA kann als Template dienen. Allerdings muss diese zuerst mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in cDNA umgeschrieben werden (BANGSOW et al. 2002).

2.1.2. Primer

Die Primer sind einzelsträngige, synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die zu einem definierten Bereich der Template-DNA komplementär sind. Sie lagern sich beim Annealing an die entsprechenden Bereiche an und dienen als Ansatzpunkt für die Polymerase. Die Auswahl dieser "Startermoleküle" bestimmt in hohem Maße die Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit der PCR. Oft ist es die Sequenz und

die Kombination der Primer, die den Erfolg der PCR bestimmen. Je nach gewünschter Spezifität (Gattungs-, Art- oder Stammspezifisch) können unterschiedliche Regionen des Genoms als Zielregion gewählt werden (SCHEU et al. 1998). Die Länge der Primer sollte ca. 18-30 Nukleotide betragen, der Guanosin (G) und Cytosin (C)-Gehalt bei 40-60 % liegen. Auch sollten Wiederholungen von drei oder mehr G's oder C's oder ein Thymin (T) am 3'-Ende vermieden werden. Primer mit endständigem T sind anfälliger für Basenfehlpaarungen. Am Besten beginnt und endet die Primersequenz mit 1-2 GC-Paaren. Ein weiterer wichtiger Parameter sind die Primer/Primer-Wechselwirkungen. Ein Primer sollte weder stabile Sekundärstrukturen noch Dimere bilden können. Daher sollten Komplementaritäten innerhalb eines Primers und zwischen den Primern vermieden werden. Besonders am 3'-Ende der Primerpaare sollten keine Komplementaritäten von zwei oder drei Basen vorhanden sein, da sonst eine erhöhte Wahrscheinlichkeit von Primer-Dimerbildung vorliegt. Zur Überprüfung dieser Kriterien stehen verschiedene Computerprogramme zur Verfügung (RAPPOLEE 1990, ROLFS et al. 1992, BANGSOW et al. 2002).

Die Schmelztemperatur (die Temperatur bei der 50 % der DNA-Moleküle denaturiert sind, also einzelsträngig vorliegen) sollte bei beiden Primern gleich sein. Die Berechnung der Schmelztemperatur ermöglicht eine vereinfachte Formel (sog. "Wallace-temperature"):

$$T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C}).$$

Der Ausgangswert für die Annealing-Temperatur liegt bei 5°C unter der Schmelztemperatur T_m . Die optimale Temperatur muss in der Regel empirisch ermittelt werden. Bei dieser Temperatur bindet der Primer nur an seine vollständig komplementäre Sequenz. Bei zu niedrigen Temperaturen, aber auch bei einer Annealing-Zeit länger als 60 s, kann es zu unspezifischen Hybridisierungen mit anderen, ähnlichen Sequenzbereichen der Template-DNA kommen und damit zu unspezifischer Produktbildung. Bei zu hoher Temperatur ist die Hybridisierung mit der Zielsequenz nicht effizient genug und die Ausbeute an PCR-Produkten wird sehr gering, wohingegen die Anzahl an falsch positiven Ergebnissen abnimmt. Die optimale Primer-Konzentration liegt zwischen 0,1-0,5 μM (INNIS und GELFAND 1990, SAIKI 1990, ROLFS et al. 1992, GREINER 2004).

In einer nested PCR werden zwei PCR miteinander kombiniert. Im ersten Durchgang wird ein Primerpaar verwendet, welches ein DNA-Fragment der Ziel-DNA der Probe vervielfältigt. Beim zweiten Durchgang werden Primer eingesetzt, die komplementär zu einer internen Sequenz des korrekten PCR-Produktes der ersten Runde sind. Bei einer semi-nested PCR ist einer der Primer bei beiden Reaktionen identisch. Durch eine nested PCR liefert die zweite PCR nur ein positives Signal, wenn in der ersten PCR das richtige DNA-Fragment vervielfältigt wurde, während falsche Produkte ignoriert werden. Die nested-PCR besitzt somit eine höhere Sensitivität, allerdings ist das Kontaminationsrisiko erhöht (OLSEN et al. 1995).

Bei einer Multiplex-PCR wird mehr als ein Primerpaar eingesetzt, um zwei oder mehrere Gene eines Pathogens oder verschiedene Pathogene während einem PCR-Durchgang zu vervielfältigen und nachzuweisen (CHAMBERLAIN et al. 1988, WEYNANTS et al. 1996, ELNIFRO et al. 2000).

2.1.3. Polymerase

Das Enzym DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend von den Primern einen neuen DNA-Strang an der Template-DNA. Die Einführung einer hitzestabilen Polymerase, welche die Denaturierung unbeschadet übersteht, machte die Automatisierung möglich, da nicht nach jedem Zyklus neues Enzym zugegeben werden muss. (BROCK und FREEZE 1969, MULLIS et al. 1986, SAIKI et al. 1988, TINDALL und KUNKEL 1988). Als Polymerase wird am häufigsten die Taq-Polymerase aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus* eingesetzt, welches in heißen Quellen lebt. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 75 °C, bei 100 °C hat sie eine HWZ von 5 min. Inzwischen gibt es auch die Möglichkeit, die Taq-Polymerase durch Expression des verantwortlichen Gens in *E. coli* gentechnisch herzustellen. Diese gentechnische Variante trägt die Bezeichnung Amplitaq® und kann wesentlich leichter in hochreiner Form gewonnen werden als die Taq-Polymerase. Sie ist somit für die meisten PCR-Ansätze heute die Polymerase der Wahl (TINDALL und KUNKEL 1988, NEWTON und GRAHAM 1997, SCHWÄGELE 1999).

Weitere Polymerasen sind die Tth-Polymerase aus dem Eubakterium *Thermus thermophilus* HB8, welche eine Reverse-Transkriptase-Aktivität in Anwesenheit von Mangan-Ionen besitzt und deshalb Reverse-Transkriptase PCR mit nur einem Enzym

ermöglicht. Die Pfu-Polymerase aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* besitzt eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität (auch Proofreading-Aktivität genannt). Dadurch werden während der Synthese des neuen Stranges falsch eingebaute Nukleotide erkannt und entfernt. Somit erfolgt die DNA-Amplifikation mit einer deutlich niedrigeren Fehlerrate als bei Verwendung der Taq-Polymerase (~10fach). Auch die Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* besitzt eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität mit ähnlich niedriger Fehlerrate, deshalb werden die Pfu- und Pwo-Polymerase vor allem dann eingesetzt, wenn eine besonders niedrige Fehlerrate wichtig ist (BANGSOW et al. 2002).

Da die Taq-Polymerase bereits bei Raumtemperatur und während der initialen Aufheizphase des Thermocyclers aktiv ist, kann es zur Verlängerung von nicht spezifisch angelagerten Primern oder von Primer-Dimeren kommen. Bei einer Hot-Start PCR wird die enzymatische Aktivität der Polymerase erst dann verfügbar, wenn der Reaktionsansatz eine erhöhte Temperatur erreicht hat (D'AQUILA et al. 1991, BANGSOW et al. 2002). Bei modernen Hot-Start-Techniken wird die Polymerase an eine Substanz, beispielsweise einen Antikörper gebunden und dadurch inaktiviert. Bei einer 3-minütigen initialen Erhitzung bei 95°C dissoziiert der Antikörper von der Polymerase und diese wird somit aktiviert, z.B. iTaq™ DNA Polymerase, Biorad (DANG und JAYASENA 1996). Eine weitere Hot-Start-Technik basiert auf chemisch modifizierten Enzymen, z.B. HotStarTaq™-DNA-Polymerase, Qiagen oder AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, Applied Biosystems. Diese sind bei Raumtemperatur und während der initialen Aufheizphase inaktiv. Der automatische Hot-Start kann durch eine initiale 10-15-minütige Inkubation bei 95°C in das Thermocycler-Programm integriert werden (BANGSOW et al. 2002).

2.1.4. Weitere Reagenzien

Für die Durchführung einer PCR wird zudem ein Gemisch aller Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs = dATP, dTTP, dCTP und dGTP), alle in gleicher Konzentration, sowie eine Pufferlösung benötigt (BANGSOW et al. 2002). Die optimale dNTP-Konzentration ist abhängig von der Länge der Amplifikationsprodukte, der MgCl₂-Konzentration und der Primer-Konzentration (ROLFS et al. 1992). In der Regel liegen der Puffer, die dNTPs und die Polymerase

als fertige Lösung vor. Zu diesem Mastermix (ggf. mit weiteren PCR-Additiven) werden dann die beiden Primer und die Template-DNA hinzugegeben.

Das Magnesium ($MgCl_2$) ist wichtig für die Stabilisierung der Primer-Bindung an die DNA, die Bindung der Polymerase an die Primer und es fungiert als Cofaktor für die Polymerase. Außerdem erhöht Mg^{2+} die Schmelztemperatur von doppelsträngiger DNA. Wenn die Anzahl an dNTPs erhöht wird, sollte auch die Menge an Magnesium erhöht werden, da dNTPs die Mg^{2+} -Ionen komplexieren. Calciumionen interferieren mit Magnesium und können die Amplifikation inhibieren. Generell wird davon ausgegangen, dass eine zu geringe $MgCl_2$ -Konzentration die PCR-Ausbeute verringert, eine zu hohe Konzentration dagegen die Bildung unspezifischer Produkte fördert (HUNG et al. 1990, INNIS und GEFLAND 1990, ROLFS et al. 1992, POWELL et al. 1994, BICKLEY et al. 1996, NEWTON und GRAHAM 1997, WILSON 1997).

2.2. Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung hat mehrere Ziele: Entfernung von PCR-Inhibitoren, Konzentrierung der Ziel-Nukleinsäure/Zielzellen (bei Proben mit nur geringer Keimzahl), die heterogene Probe in eine homogene PCR-kompatible Probe zu verwandeln und ggf. nur vermehrungsfähige Keime nachzuweisen (HOORFAR et al. 2004). Die PCR-Technik ist bei der Verwendung von reinen Bakterienkulturen als Probenmaterial extrem sensitiv, die Sensitivität wird aber reduziert, wenn sie direkt auf natürliches Probenmaterial angewendet wird. Ein wichtiger Grund hierfür ist die komplexe Zusammensetzung solcher Proben wie Kot, Blut, Lebensmittel und Erde, welche die PCR inhibieren kann. Verschiedene Schritte der Probenvorbereitung werden deshalb für die verschiedenen Probenmaterialien empfohlen (ROSSEN et al. 1992, LANTZ et al. 1994).

Allgemein folgt die Probenvorbereitung diesen Schritten:

- Konzentrierung der Zielorganismen
- Entfernung störender/inhibitorischer Substanzen
- Lyse der Zellen
- Gewinnung der DNA

Eine klare Trennung ist aber in den wenigsten Fällen möglich, vor allem bei den modernen Extraktionsverfahren.

2.2.1. Konzentrierung der Zielorganismen

Eine einfache Methode zur Konzentrierung der Zielorganismen ist die **Zentrifugation** der Probe bei hoher Geschwindigkeit. Dabei werden die löslichen Substanzen abgetrennt, allerdings werden andere inhibitorische Partikel zusammen mit dem Zielorganismus konzentriert. Deshalb muss das verbleibende Pellet noch gewaschen werden (LANTZ 1998).

Auch die **Immuno-Magnetic-Separation (IMS, Magnetische Separation)** führt zu einer Konzentrierung der Zielorganismen. Mit paramagnetischen Partikeln, die mit entsprechenden Antikörpern, z.B. gegen das Bakterium, beschichtet sind, können die gesuchten Keime aus einem flüssigen Substrat durch Antigen-Antikörper-Reaktionen abgetrennt werden. Mit Hilfe eines Magnetfeldes werden diese Partikel dann aus der Probe herausgefiltert und können, nachdem sie von den Antikörpern getrennt wurden, untersucht werden. Mit diesem Verfahren wird auch Fremd-DNA größtenteils entfernt. Die Spezifität ist zu einem großen Teil abhängig von der Wahl der Antikörper (NESBAKKEN 1992, OLSVIK et al. 1994, JOHANNESSEN et al. 2000).

2.2.2. Entfernung von Inhibitoren

Methoden, wie Verdünnung, Anreicherung, Zentrifugation, Filtration basieren auf physikalischen Eigenschaften der Mikroorganismen und der PCR-Inhibitoren, wie Größe, Gestalt, Dichte, Hydrophobie und Wachstumsansprüche (LANTZ 1998).

Der Nachweis von Bakterien in Lebensmitteln erfolgt in der Regel nach vorheriger **Anreicherung**. Dadurch werden nicht-vermehrungsfähige Zellen und Störfaktoren verdünnt und die Isolierung der gewünschten Organismen aus dem Substrat wird erleichtert, indem sie sich vermehren können und detektierbare Konzentrationen erreichen. Durch selektive Anreicherungsmedien kann zudem das Wachstum der Konkurrenzflora gehemmt werden. Außerdem werden nicht-vermehrungsfähige Zellen oder vorhandenen exogene Ziel-DNA verdünnt (LANTZ et al. 1998, LÜCKE und TEN BOSCH 1998, WAAGE et al. 1999, KNUTSSON et al. 2002a).

Bei der '**Buoyant density centrifugation**' (**BDC**) wird die Probe zusammen mit Lösungen zentrifugiert, welche eine unterschiedliche Dichte besitzen. Je nach Dichte

reichern sich die verschiedenen Bestandteile der Probe in einer bestimmten Phase des Gemisches an. Dadurch werden die Zielorganismen konzentriert und Inhibitoren entfernt. Als Gradient-Medien werden Percoll® (Amersham Biotech Pharmacia, Uppsala, Sweden) oder BactXtractor™ (QRAB, Balsta, Sweden) verwendet (THISTED LAMBERTZ 2005, WOLFFS et al. 2005). Diese Methode ist vor allem für Proben geeignet, die hohe Konzentrationen an PCR-Inhibitoren enthalten, da die meisten dieser Substanzen während des Zentrifugationsschrittes vom Ziel-Organismus getrennt werden (LINDQVIST 1997). Die Methode ist auch für eine quantitative PCR geeignet, wo eine vorherige Anreicherung und die damit verbundene unkontrollierte Vermehrung der Bakterien ungeeignet erscheint. Die Detektion von toten Zellen soll ausgeschlossen sein, da sich in der entsprechenden Dichte-Phase nur lebende Bakterien anreichern. Durch den Erhalt von lebensfähigen Zellen können die Mikroorganismen anschließend noch isoliert und analysiert werden. Die Vorteile dieser Methode sind die Separation biologischer Matrixpartikel und Mikroorganismen mit unterschiedlichen Dichten, die Schnelligkeit und einfache Handhabung (WOLFFS et al. 2004).

"Aqueous two-phase systems" werden für die Separation von Makromolekülen, Membranen, Zellorganellen und Zellen verwendet. Meist wird Polyethylen-Glykol (PEG), Dextran und Wasser verwendet. Faktoren wie Größe, Hydrophobie und Oberflächenladung bestimmen die Verteilung der Substanzen zwischen den verschiedenen Phasen (ALBERTSSON 1986, TJERNELD 1992).

2.2.3. Lyse der Zellen

Hitze und Mikrowellen führen zu einer Denaturierung der Zellwandproteine von Mikroorganismen und inaktivieren auch hitzelabile PCR-Inhibitoren. Nukleinsäuren sind gleichzeitig weniger hitzeempfindlich als Proteine. Nach anschließender Zentrifugation befindet sich die DNA im Überstand. Die DNA von gramnegativen Bakterien aus Kulturen lässt sich meist durch einfaches Aufkochen für 10 min und anschließende Zentrifugation isolieren (HIGUCHI 1989). Die Erhitzung als Hilfsmittel zur Lyse der Zellen beinhaltet einige Schwachstellen, die bei der Anwendung berücksichtigt werden müssen. Falls die DNA nicht ausreichend von Struktur- und DNA-bindenden Proteinen separiert wird, kann es zu einer Inhibition der PCR kommen. Die reine DNA-Freisetzung durch Kochen kann somit zu einer reduzierten

Sensitivität führen (WILSON 1997). Auch führt die einfache Anwendung von Hitze zur Lyse der Zellen oft zum Abbau der Produkte durch Nukleasen, welche nicht durch Hitze zerstört werden (RASMUSSEN et al. 1994). Bei der Untersuchung von natürlichen Proben ist die Hitzebehandlung allein in der Regel nicht ausreichend (BOLLET et al. 1991, CHEYROU et al. 1991, GOODWIN und LEE 1993, LANTZ et al. 1994, LIEDTKE et al. 1994, OHHARA et al. 1994).

Durch den Einsatz von **Enzymen** wie Proteinase K, Lysozym oder Protease werden die in der Zellwand enthaltenen Proteine verdaut. Proteinase K inaktiviert auch störende Enzyme wie DNasen, welche PCR-Produkte abbauen (EBELING et al. 1974, MERCIER et al. 1990, HIGUCHI 1992, MAAS und DAHLHOFF 1994, AUSUBEL et al. 1998). Der Effekt von Proteinase K kann durch Zusatz von Natrium Dodecylsulfat (SDS) verstärkt werden (GROSS-BELLARD et al. 1973).

Detergentien lysieren die Doppellipidschicht der Zellmembran. Anwendung finden sowohl ionische (SDS) als auch nichtionische (Triton X-100®, Tween®, Cetyltrimethylammoniumbromid [CTAB]) Detergentien (KAY et al. 1952, TRAVAGLINI 1973, JOHNS und PAULUS-THOMAS 1989, IBELGAUFTS 1993). SDS zerstört die Zellmembran und denaturiert außerdem auch PCR-inhibitorische Proteine und Enzyme (GAMBOA et al. 1997). CTAB kann auch, in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration, für die Präzipitation von Proteinen eingesetzt werden. Bei niedriger NaCl-Konzentration bilden Nukleinsäuren mit CTAB einen unlöslichen Komplex, der sedimentiert werden kann (MÜLLER und BRUCHHAUS 1997).

2.2.4. Gewinnung der DNA

Präzipitation mit Alkohol:

Nach der Lyse der Zellen wird der DNA durch Zugabe von Ethanol oder Isopropanol Wasser entzogen. Dadurch kommt es zu einer Aggregation mit nachfolgender Präzipitation der Nukleinsäuremoleküle. Die DNA wird durch Zentrifugieren sedimentiert, anschließend gewaschen und in einem Puffer gelöst (TRAVAGLINI 1973, EICKBUSH und MOUDRIANAKIS 1978, WALLACE 1987, IBELGAUFTS 1993).

Silikagelbasierende Verfahren:

Diese Methoden basieren auf der Bindung von Nukleinsäuren nach Lyse der Zellen an Silikaoberflächen (z.B. Silikagelmembranen, Silikagelsuspensionen oder silikabeschichtete Magnetpartikel) in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotropher Salze wie Natriumiodid, Perchlorate oder Guanidiniumsalze. Durch einen Waschschrift mit alkoholhaltigen Puffern werden Proteine und Salzverunreinigungen entfernt und dann die DNA unter Niedrigsalzbedingungen (z.B. destilliertes Wasser oder TE-Puffer) vom Trägermaterial eluiert. Diese Verfahren ergeben eine DNA hoher Reinheit (SCHEU et al. 1998, GRIEB et al. 2002). Diese Matrix wird kommerziell entweder in Form von Säulen oder als Suspension angeboten. Bei den Säulen wird die Probe zusammen mit einer Bindungslösung, welche die chaotrophe Substanz enthält, durch die Matrix zentrifugiert. Dabei wird die DNA reversibel an die Säule gebunden und kann nach Waschschriften durch Zentrifugieren mit Elutionslösung gelöst werden. Liegt die Matrix als Suspension vor, wird sie nach Binden der DNA durch Zentrifugieren sedimentiert und mit Ethanol gewaschen, anschließend der Überstand verworfen. Die DNA wird nachfolgend in Aqua bidest oder Pufferlösung aufgenommen (MERK 2000).

Anionenaustauscher-Chromatographie:

Dieses Verfahren basiert auf der sehr effektiven Bindung negativ geladener Phosphatgruppen der Nukleinsäure an positiv geladene Oberflächenmoleküle des Trägermaterials. Durch stringente Pufferbedingungen können Verunreinigungen besonders effizient entfernt werden und durch Variieren der Salzkonzentrationen und des pH-Wertes können verschiedene Nukleinsäure-Arten voneinander getrennt werden. Abschließend wird eine Alkoholfällung zur Entsalzung und Konzentrierung der DNA durchgeführt. Die Vorteile dieser Methode liegen in der deutlichen Zeitersparnis gegenüber der klassischen Verfahren und sie ergibt eine DNA extrem hoher Reinheit (GRIEB et al. 2002).

2.2.5. DNA Isolierung

Klassische Methode:

Die klassische Methode der DNA-Isolierung stellt die Extraktion mit einem Gemisch aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol dar. Dabei dient Phenol zur Lyse der Zellen durch Denaturierung der Zellwandproteine. Die Proben werden mit Phenol

ausgeschüttelt, die DNA befindet sich in der oberen wässrigen Phase, die Lipide befinden sich in der organischen unteren Phase und die Proteine verbleiben in der Interphase (WALLACE 1987, BORST und MILLER 1990). Die obere DNA-haltige Phase wird vorsichtig abgenommen. Chloroform wird als zweites organisches Lösungsmittel eingesetzt. Zugabe von Isoamylalkohol verhindert übermäßige Schaumbildung, außerdem stabilisiert er die Trennung der Phasen (MARMUR 1961). Die DNA im Überstand wird mit Hilfe von Alkohol gefällt, gewaschen und in Puffer oder Aqua bidest aufgenommen.

Dieses Verfahren ergibt nur eine geringe DNA-Konzentration mittlerer Qualität, wobei sehr viel DNA während der Prozedur verloren geht. Sie ist zudem sehr arbeits- und zeitaufwendig (WERNARS et al. 1991, LANTZ et al 1998).

Kommerziell erhältliche Extraktions-Kits:

Inzwischen sind zahlreiche kommerzielle Kits erhältlich, welche die DNA-Isolierung einfacher und schneller machen. Aber es ist unwahrscheinlich, dass es eine einzige Methode zur Nukleinsäure-Extraktion geben wird, welche für alle Arten von Proben geeignet ist (WILSON 1997). In Tabelle 7 sind einige kommerziell erhältliche Extraktionskits aufgeführt.

Tabelle 7: Übersicht über kommerziell erhältliche Kits zur Extraktion von DNA aus Lebensmitteln

Hersteller	Produktname	Prinzip	Probenart
Promega	Wizard® Genomic DNA Purification System	Salzpräzipitation	Gewebe, Kultur
	Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food	Magnetkügelchen	LM
	Wizard®SV Genomic DNA Purification System	Säulen	Gewebe, Kultur
Applied Biosystems	NucPrep System	unbekannt	Gewebe
	TransPrep System		Gewebe, LM
Biorad	InstaGene™ Matrix	Ionenaustauscher	Gewebe, Kultur
	AquaPure Genomic Tissue Kit Chelex 100 Molecular Biology Grade resin	Salzpräzipitation Säulen	Gewebe Gewebe
Qiagen	DNeasy Tissue Kit	Silicasäulen	Gewebe
Peglab	E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini	Silicasäulen	Gewebe

LM Lebensmittel

Die Anreicherungsmedien enthalten meist PCR-inhibitorische Komponenten (ROSSEN et al. 1992, LANTZ et al. 1998). LANTZ et al. (1998) untersuchte die Hemmwirkung verschiedener Anreicherungsverfahren für *Y. enterocolitica* (TSB, YSE, ITC, PSB, MRB) und deren Inhaltsstoffe auf die PCR. Die Anreicherungsmedien kombinierte er mit vier verschiedenen Aufreinigungsmethoden. 'Percoll buoyant density centrifugation' stellte sich dabei als die am besten geeignete Aufreinigungsmethode heraus. Dabei konnte mit dem ITC-Medium die beste Sensitivität erreicht werden. KNUTSSON et al. (2002b) entwickelten ein PCR-kompatibles Anreicherungsmedium (*Yersinia* PCR-compatible enrichment (YPCE) Medium), vor allem für Tupferproben, kombiniert mit einem Real-Time PCR, bei welchem die Notwendigkeit der Probenvorbereitung entfällt. In Tabelle 8 sind die Methoden zur Probenvorbereitung von PCR-Methoden zum Nachweis von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln aufgeführt.

Tabelle 8: Methoden der Probenvorbereitung einiger PCR-Methoden zum Nachweis von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln

Probenart	Anreicherung	Probenvorbereitung	Referenz
Fleisch, Wasser	TSB	IMS + Proteinase K	KAPPERUD et al. 1993
Fleisch	Kälteanreicherung	Silika	KANEKO et al. 1995
Käse, Fisch	Voranreicherung	Triton X-100	WANG et al. 1997
Fleisch	TSB, YSE, ITC, PSB, MRB	Buoyant density centrifugation Aqueous two-phase system XTRAX	LANTZ et al. 1998
Fleisch	TSB	1% Triton X-100	DICKINSON et al. 1995
Fleisch	TSB	Buoyant density centrifugation + NaOH	NCFA 1998
Tupfer von Fleisch, Käse, Zunge, Gemüse	MTSB, Irgasan	Hitze, Proteinase K	BHADURI/COTTRELL 1998
Hackfleisch	-	CTAB	NILSSON et al. 1998
Fleisch	TSB	Buoyant density centrifugation + NaOH	THISTED LAMBERTZ et al. 2000
Milch	-	Digestionspuffer, NaOH, Pronase, Lysozym + Hitze	ÖZBAS et al. 2000
S-Hackfleisch	PSB	Prepman reagent	VISHNUBHATLA et al. 2000
S-Hackfleisch, Faeces	ITC	Prepman reagent	JOURDAN et al. 2000
S-Hackfleisch, Faeces, Gewebe	ITC	Guanidine-Silica-Extraktion bzw. Prepman reagent	BOYAPALLE et al. 2001

TSB	Tryptic-Soja-Bouillon
IMS	Immuno-Magnetic-Separation
YSE	<i>Yersinia</i> -Selective-Enrichment
ITC	Irgasan-Ticarcilin-Cefsoludin
PSB	Pepton-Sorbitol-Bile
MRB	modifizierte Rappaport Bouillon
MTSB	modifizierte Tryptic-Soja-Bouillon
CTAB	Cetylmethylammoniumbromid
S	Schwein

2.3. Detektion

Die Detektion der PCR-Produkte erfolgt in klassischer Weise mit Elektrophorese-Systemen oder mittels moderner Real-Time-Verfahren.

2.3.1. Gelelektrophorese

Bei der klassischen PCR mit Polyacrylamid- und Agarosegelen werden die PCR-Produkte nach Ablauf aller PCR-Zyklen detektiert (so genannte "Endpunktdetektion") (MC KILLIP und DRAKE 2004). Die Produkte werden nach Anlegen einer Spannung anhand ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode zur Anode, die Wanderungsrate der Moleküle verhält sich umgekehrt zur Anzahl der Basenpaare. Parallel zum

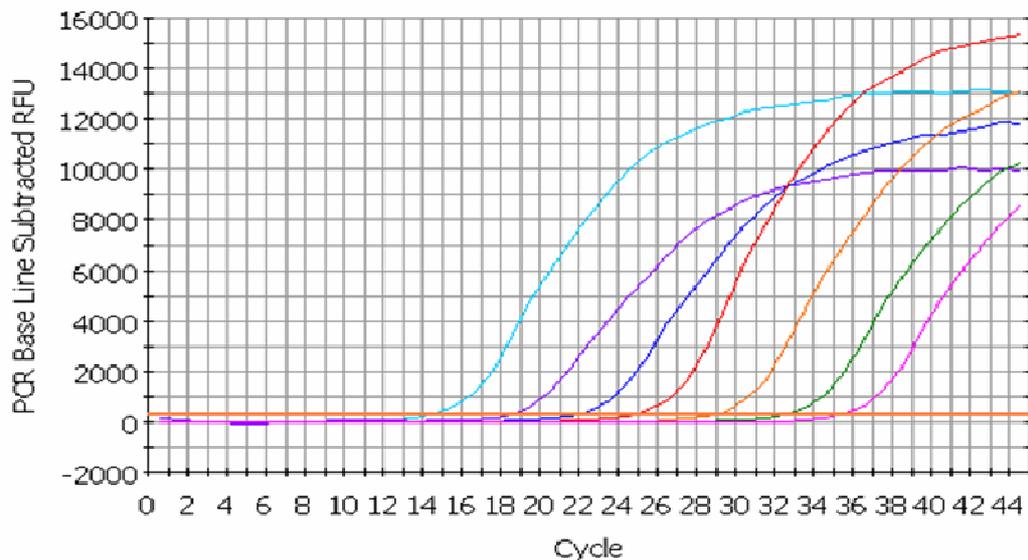
analysierten DNA-Amplifikat wird ein Längenstandard mit bekannten DNA-Fragmenten aufgetragen, anhand dessen die Größe von PCR-Produkten abgeschätzt werden kann. Die Größe allein ist häufig aussagekräftig genug zur Interpretation der aufgetrennten Sequenzen. Das zugegebene Ethidiumbromid lagert sich an jede doppelsträngige DNA an. Die angefärbten Produkte sind dann unter UV-Licht sichtbar und können abgelichtet werden. Diese Systeme sind kostengünstig, aber arbeits- und zeitaufwendig. Zusätzlich werden gesundheitsgefährdende Substanzen verwendet, da Ethidiumbromid als mutagen gilt. (OGDEN und ADAMS 1987, IBELGAUFTS 1993, MARTIN und TIMMERS 1997, NEWTON und GRAHAM 1997, BANGSOW et al. 2002). Um die Spezifität zu erhöhen und um das Amplifikationsprodukt zu identifizieren, kann noch ein Southern blotting oder eine Hybridisierung mit spezifischen Sonden folgen (SCHEU et al. 1998).

2.3.2. Real-Time PCR

Eine Möglichkeit zum direkten Nachweis bieten die Real-Time PCR-Systeme, welche auch eine quantitative Auswertung ermöglichen (BANGSOW et al. 2002). Im Gegensatz zur konventionellen PCR mit Gelelektrophorese erfolgt hier die Detektion während der Amplifikation und nicht erst nach Abschluss der gesamten PCR. Das Kontaminationsrisiko ist geringer, da Amplifikation und Detektion in einem geschlossenen System stattfinden. Die Probe muss zur Detektion nicht mehr bearbeitet werden (Vermeidung von "carry-over"). Daraus ergibt sich auch ein deutliches Zeitersparnis (LANTZ et al. 2000, FENOLLAR und RAOULT 2004).

Es existieren zwei Ansätze für die Detektion: die Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen, die sich unspezifisch an jede doppelsträngige DNA während der Amplifikation anlagern oder der Einsatz von sequenzspezifischen Fluorophormarkierten DNA-Strängen. Bei letzteren handelt es sich um Oligonukleotide, welche spezifisch an eine Region innerhalb des Zielgenes binden. Unabhängig vom verwendeten System emittiert die Probe innerhalb des Zyklus ein Fluoreszenz-Signal nur bei Anwesenheit der Zielsequenz. Die Intensität ist proportional zur Menge des gebildeten amplifizierten Produktes. Die relativen Fluoreszenz-Einheiten werden an der y-Achse gegenüber der Zyklenzahl auf der x-Achse, in einem typischen Diagramm aufgetragen (Abbildung 3) (FENOLLAR und RAOULT 2004, MACKAY 2004).

Abbildung 3: Darstellung der Fluoreszenzzunahme einer Real-Time PCR. Auf der x-Achse ist die Zyklenzahl angegeben, auf der y-Achse die Fluoreszenzeinheiten.



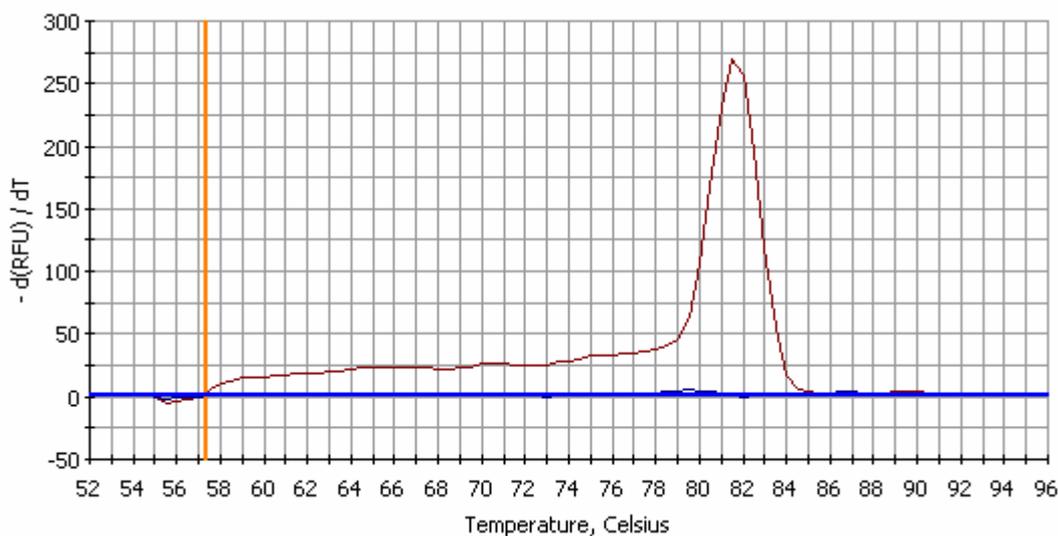
2.3.2.1. DNA-bindende Farbstoffe:

Unspezifische DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe, z.B. SYBR Green oder Ethidiumbromid, lagern sich mit hoher Spezifität in die kleine Furche doppelsträngiger DNA ein. Das in der kleinen Furche gebundene SYBR Green fluoresziert nach Anregung etwa 1000mal stärker als der nicht gebundene Farbstoff. Die Fluoreszenz wird am Ende jedes Elongationsschrittes, nach Anlagerung des Farbstoffes an die doppelsträngige DNA, gemessen.

Bei dieser Methode entfällt einerseits die kostenintensive Synthese und Markierung von sequenzspezifischen Sonden und sie ist universell einsetzbar. Andererseits lagern sich die Farbstoffe an alle doppelsträngige DNA-Moleküle an, also auch an Primer-Dimere oder nicht-spezifische PCR-Produkte, und weisen deshalb nur eine geringe Spezifität auf (BANGSOW et al. 2002, JOTHIKUMARD und GRIFFITHS 2002, FENOLLAR und RAOULT 2004, MC KILLIP und DRAKE 2004). Da jedoch jedes PCR-Produkt aufgrund der Länge und des GC-Gehaltes bei einer charakteristischen Temperatur schmilzt (denaturiert), kann anhand einer Schmelzkurve zwischen verschiedenen PCR-Produkten differenziert werden (MC PHERSON und MOLLER 2000, WITTEWER et al. 2001). Dazu wird am Ende des PCR-Laufs die Temperatur langsam schrittweise bis auf ca. 95°C erhöht, so dass die DNA-Stränge wieder denaturieren und als Einzelstränge vorliegen. Diese

Denaturierung hat den Abfall des Fluoreszenzsignals beim Schmelzpunkt zur Folge (Abbildung 4). Durch die Messung dieses Schmelzpunktes kann auf das vervielfältigte Produkt geschlossen werden, da Amplifikationsartefakte in der Regel bei einer niedrigeren Temperatur denaturieren (BUSTIN 2000).

Abbildung 4: Darstellung einer Schmelzkurve, die Temperatur ist auf der x-Achse gegenüber der relativen Fluoreszenzabnahme auf der y-Achse aufgetragen. Bei der Temperatur, bei der die Fluoreszenz den stärksten Abfall hat, entsteht ein deutlicher "Peak".



In der Real-Time PCR wird hauptsächlich SYBR Green verwendet, wohingegen sich Ethidiumbromid nicht durchsetzen konnte. SYBR Green bindet mit einer ca. 100mal höheren Affinität an die DNA als Ethidiumbromid. Die Wellenlänge zur Anregung von Ethidiumbromid liegt bei 254-366 nm (UV-Licht), das Emissionsmaximum bei 590 nm, SYBR Green lässt sich bei 480 nm (Blauviolet) anregen. Das Emissionsmaximum liegt bei 537 nm (WITTEWERT et al. 1997, MORRISON et al. 1998).

2.3.2.2. Sequenzspezifische Hybridisierungssonden:

Bei diesen Sonden handelt es sich um fluorophormarkierte Oligonukleotide, die auf der Zielsequenz hybridisieren. Da sie nur an eine bestimmte Sequenz innerhalb des gewünschten PCR-Produkts binden, sind sie hochspezifisch und sehr sensitiv. Die Detektion erfolgt, je nach eingesetzter Sondenart, während der Annealing- oder Extensionsphase. Entsprechend der Amplifikation des spezifischen PCR-Fragmentes

steigt das Fluoreszenzsignal an. Dabei ist die Fluoreszenzzunahme dem Zuwachs an PCR-Amplifikat direkt proportional (MC KILLIP und DRAKE 2004). Die meisten der gewöhnlich verwendeten fluorogenen Oligonukleotide basieren auf dem Prinzip des Förster- oder Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (fluorescent resonance energy transfer, FRET) zwischen zwei fluorogenen Molekülen oder zwischen einem Fluorophor und einem dunklen, nicht fluoreszierenden Quencher, welcher Energie in Form von Wärme anstatt Licht verstreut (DIDENKO 2001). "FRET" ist ein spektroskopischer Prozess zwischen Molekülen, welche 10-100 Å voneinander entfernt sind und überlappende Emissions- und Absorptionsspektren besitzen. Dabei wird ein Donor-Fluorochrom (Reporter) durch eine Lichtquelle angeregt und gibt einen Teil seiner Energie an ein in ausreichender Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) ab. Bei zunehmendem Abstand der Fluorochrome nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das Signal des Donors zunimmt (FÖRSTER 1948, STRYER und HAUGLAND 1967, HELLER und MORRISON 1985, CLEGG 1992, SELVIN 1995).

Es existieren mehrere Sonden-Systeme:

a) TaqMan Sonde (Hydrolysesonde):

Bei der Verwendung des TaqMan-Assays kommt eine doppelt fluoreszenzmarkierte Sonde zum Einsatz (Abbildung 6). Bei dieser TaqMan Sonde unterdrückt ein Quencher (Akzeptor-Fluorochrom) am 3'-Ende die Fluoreszenz des Reporters (Donor-Fluorochrom) am 5'-Ende, welches durch Licht angeregt wird. Der Quencher kann sich auch intern befinden. Die Energie des Donor-Fluorochroms wird bei räumlicher Nähe zum Quencher von diesem "geschluckt", so dass keine Fluoreszenz detektierbar ist. Während der PCR-Reaktion wird die hybridisierte DNA-Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase während der Amplifikation zerschnitten. Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen, und die nach Anregung des Reporters nun emittierte Fluoreszenz einer definierten Wellenlänge kann detektiert werden (Abbildung 5 und 6). Eine Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität kann nur dann erfolgen, wenn es zu einer sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Zielsequenz kommt (LIVAC et al. 1995, VISHNUBHATLA et al. 2000, FENOLLAR und RAOULT 2004, MC KILLIP und DRAKE 2004). Der Schmelzpunkt von TaqMan

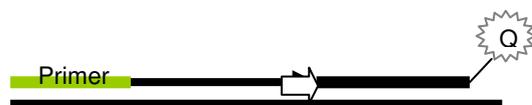
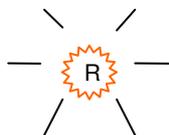
Sonden sollte ca. 10°C höher liegen als der Schmelzpunkt der verwendeten Primer. Die Gesamtlänge liegt idealerweise bei 20-30 bp. Zudem sollten kein G am 5'-Ende liegen, da Guanin einen Quenching-Effekt hat (DORAK 2006).

Abbildung 5: Markierte Hybridisierungssonde. Die Fluoreszenz des Reporters wird durch die räumliche Nähe des Quenchers unterdrückt.



R Reporter
Q Quencher

Abbildung 6: Die Polymerase hydrolysiert die Sonde. Der freie Reporterfarbstoff emittiert Fluoreszenzlicht.



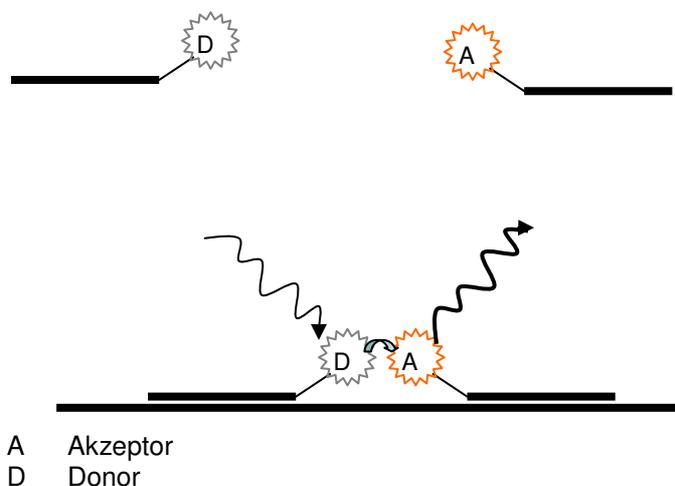
⇒ DNA-Polymerase
Q Quencher
R Reporter

b) sonstige:

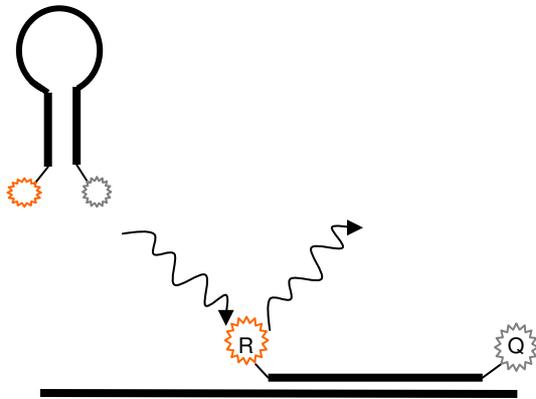
Die **FRET-Sonde/Hybridisierungssonde** (Abbildung 7) besteht aus zwei sequenzspezifischen Nukleotiden die in kurzem Abstand zueinander während des Annealing-Schrittes an die Zielsequenz binden. Eine der Sonden trägt einen Fluoreszenz-Farbstoff (Donor) am 3'-Ende, die andere einen anderen Farbstoff

(Akzeptor) am 5'-Ende (Schwanz-Kopf-Position). Die Anregungsenergie des Farbstoffes der ersten Sonde wird auf den Farbstoff der zweiten Sonde übertragen und verstärkt, so dass die Emission detektierbar wird. Die Energieübertragung findet nur bei räumlicher Nähe der zwei Sonden zueinander statt, so dass ungebundene Sonden kein messbares Signal aussenden. Die Messung erfolgt einmal pro Zyklus während des Annealing-Schrittes (WITTEWER et al. 1997, DE SILVA et al. 1998, SAGNER et al. 1999, BANGSOW et al. 2002).

Abbildung 7: Hybridisierungssonde (nach WILHELM und PINGOUD 2003)

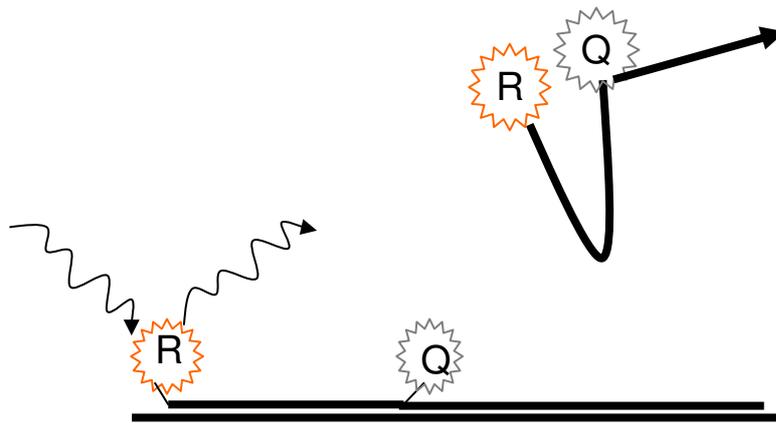


Molecular Beacons (Abbildung 8) sind doppelt-markierte Nukleotide mit haarnadelartiger Molekülstruktur. Der Schleifenanteil wird von einer "Stiel-Region" mit einer Länge von ca. 4-6 Basen, welche an den gegenüberliegenden Seiten zueinander komplementär sind, flankiert. Auch hier befindet sich am 3'-Ende ein Quencher und am 5'-Ende ein Reporterfarbstoff. Bei der aufgrund der komplementären Sequenz geschlossenen Haarnadel-Struktur unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporters. Der Schleifenanteil der Sonde besitzt eine für die Ziel-DNA spezifische Sequenz, so dass die Haarnadel-Struktur sich bei Hybridisierung der Sonde an die Zielsequenz öffnet. Dabei kommt es zur räumlichen Trennung des Quenchers von dem Reporter und zur Aussendung eines Fluoreszenzsignals (TYAGI und KRAMER 1996, TYAGI et al. 1998, BUSTIN 2000, FANG et al. 2000, MC KILLIP und DRAKE 2004).

Abbildung 8: Molecular Beacon (nach WILHELM und PINGOUD 2003)

R Reporter
Q Quencher

Bei den **Sunrise Primer** (Abbildung 9) handelt es sich um Primer mit selbstkomplementären Sequenzabschnitten am 5'-Terminus, der in Lösung eine Haarnadel-Struktur aufweist. Sie werden, ähnlich den Molecular Beacons, mit einem Reporter- und Quencher-Fluorophor markiert und durch die Haarnadelstruktur in enger räumlicher Nachbarschaft zueinander gehalten. Das 3'-Ende ist komplementär zur Zielsequenz und dient als Primer. Nach dem Annealing wird dieser Primer verlängert und die Sonde in das PCR-Produkt eingebaut. Im nächsten Amplifikationszyklus dient dieses Produkt als Matrize für die Verlängerung des Gegenprimers. Im gebildeten doppelsträngigen PCR-Produkt liegt die Haarnadel-Struktur geöffnet vor, durch die Trennung des Reporters vom Quencher-Molekül kann dieser fluoreszieren. Ein Nachteil dieses Prinzips ist, dass auch Primer-Dimere ein Signal ergeben. (NAZARENKO et al. 1997, WHITCOMBE et al. 1998, 1999).

Abbildung 9: Sunrise Primer (nach WILHELM und PINGOUD 2003)

R Reporter
Q Quencher

Um die Erzeugung eines Fluoreszenzsignals durch Primer-Dimere zu verhindern, wurden die so genannten "**Scorpion Primer**" als Variante der Sunrise Primer entwickelt. Hierbei wird die Verlängerung des Gegenstranges in den Primer hinein durch eine Hexaethylglykol-Gruppe verhindert. Der Schleifenteil ist, ähnlich wie bei den Molecular Beacons komplementär zu einer Sequenz des amplifizierten Produkts (MC KILLIP und DRAKE 2004, THELWELL et al. 2000)

LUX (light upon extension)-Primer sind "self-quenching hairpin primer" und sie verwenden ein einzelnes Fluorophor (Thiazolorange) an einem der beiden Primer, die Fluoreszenzintensität hängt von ihrer jeweiligen chemischen Umgebung ab. Das Fluorophor wird intrinsisch durch die natürliche Quenching-Fähigkeit von sorgfältig platzierten Guanosin-Nukleotiden gequenchet. Der natürliche Quencher wird durch eine Strecke von 5' und 3' komplementären Sequenzen in die Nähe des Fluorophors gebracht. Bei Anwesenheit seiner spezifischen Zielsequenz hybridisiert der Primer an diese, und die Haarnadel-Struktur öffnet sich, was zur Emission eines Fluoreszenz-Signals führt. Diese kommerziell erhältliche Technologie (Invitrogen, Carlsbad, California) ist weniger kostenintensiv als andere Real-Time Sondensysteme (KNEMEYER et al. 2000, NAZARENKO et al. 2002, MACKAY 2004).

Auch die **DzyNA-Primer** bestehen aus einem Reporter und Quencher, welche durch die spezifische Durchtrennung der Oligonukleotide, die sie nahe zusammenhalten, voneinander getrennt werden. Diese Abtrennung erfolgt durch ein DNAzyme,

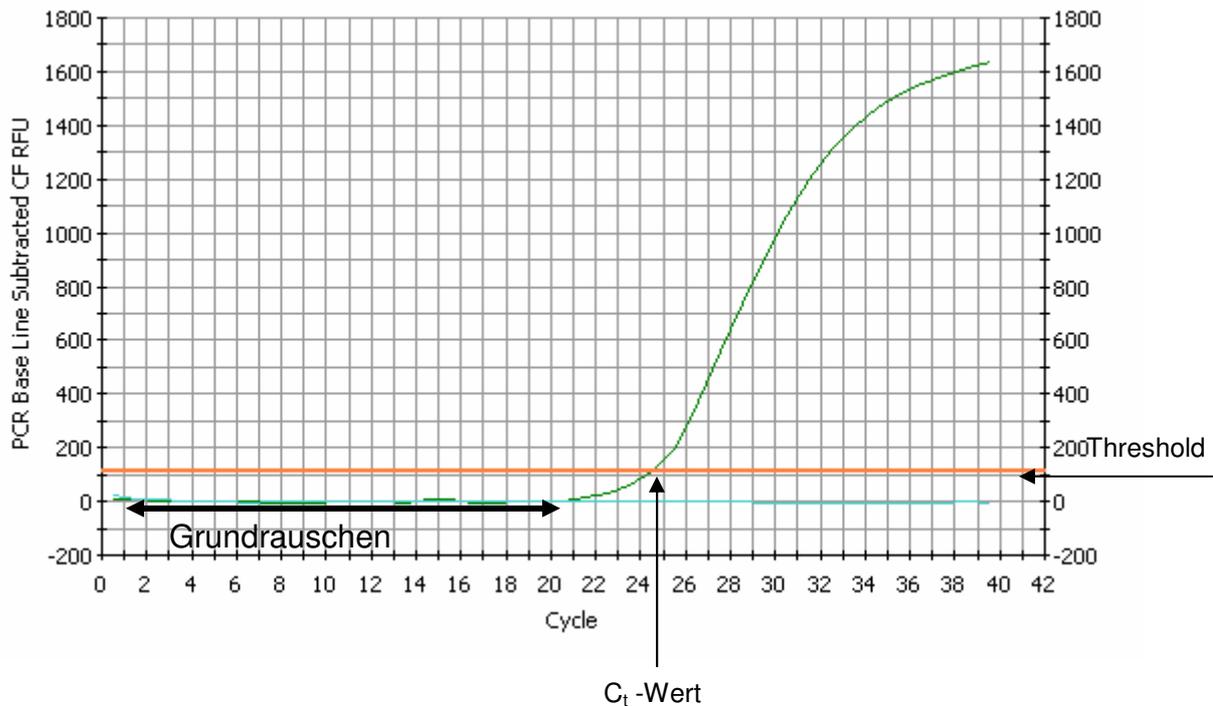
welches während der PCR als das Gegenstück einer DNAzyme-Antisense-Sequenz produziert wird. Diese DNAzyme-Antisense-Sequenz befindet sich am 5'-Ende einer der beiden Primer. Nach der Durchtrennung wird das Fluorophor freigelassen und die emittierte Fluoreszenz kann, ähnlich zum TaqMan-System, detektiert werden (TODD et al. 2000).

2.4. Auswertung der Ergebnisse

Zur Auswertung sollte eine Positivkontrolle, mit Referenzmaterial, und Negativkontrollen mitgeführt werden. Die Negativkontrollen sind die Mastermixkontrolle, welche nur die für den Vorgang der Amplifikation benötigten Reagenzien enthält. Bei einer weiteren Negativkontrolle als Aufarbeitungskontrolle werden alle Reagenzien, außer positives Probenmaterial, beim gesamten Prozess der Probenvorbereitung mitbearbeitet (Extraktionskontrolle).

Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgt über die Fluoreszenzdaten. Diese werden üblicherweise von den PCR-Zyklen der linearen Amplifikationsphase gefasst, wenn die Reaktionsbedingungen optimal sind und die Fluoreszenz proportional zum Amplikon ansteigt. Damit steht sie der Endpunktdetektion gegenüber, in welcher oft kein Zusammenhang mehr mit der initialen Menge des Templates und der Menge des Amplikons am Ende der Reaktion besteht (MACKAY et al. 2002, MACKAY 2004). Die Auswertung der Analyse erfolgt über den sogenannten C_t -Wert ("threshold cycle"). Der C_t -Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über das Grundrauschen (auch Hintergrundrauschen genannt) ermittelt wird (Abbildung 10). Für das Hintergrundrauschen werden die Fluoreszenzdaten des 3.-15. Zyklus verwendet. Die Fluoreszenz des Hintergrundrauschen wird mit dem Threshold angezeigt. Je mehr Template zu Beginn der Reaktion vorhanden ist, desto geringer ist die Anzahl an Zyklen die erforderlich ist, um den Punkt zu erreichen, an dem das Fluoreszenzsignal das Grundrauschen deutlich übersteigt (GIBSON et al. 1996).

Abbildung 10: Ermittlung des C_t -Wertes. Der C_t -Werte ist der Zyklus, an dem die Fluoreszenzzunahme den Threshold schneidet. Dort, wo die Zunahme der Fluoreszenz das Hintergrundrauschen übersteigt, wird der Threshold angesetzt.



2.4.1. Falsch positive Ergebnisse

Zur Kontamination mit Fremd-DNA kann es z.B. durch Haut- und Haarzellen des Menschen kommen, aber auch durch schmutzige Arbeitsflächen und Arbeitsgeräte (Pipetten) oder durch Aerosole. Auch Reagenzien, die gemeinhin für die PCR oder DNA-Extraktion und Präparation der Proben benutzt werden, können mit Fremd-DNA kontaminiert sein (NEWTON und GRAHAM 1997). Durch die hohe Sensitivität der PCR genügen bereits äußerst geringe Mengen (im Prinzip ein DNA-Molekül) an Fremd-DNA, um ein Ergebnis falsch-positiv werden zu lassen. Daher sind Positiv- und Negativ-Kontrollen für jede PCR unerlässlich (KWOK und HIGUCHI 1989, ROTH et al. 2001). Zur Vermeidung von Kontaminationen sollten die Arbeiten weitgehend steril durchgeführt werden und grundsätzlich die Arbeitsbereiche getrennt werden: Die Probenaufbereitung und DNA-Extraktion muss räumlich getrennt vom Ansatz des Mastermixes durchgeführt werden. Das Pipettieren erfolgt im Idealfall an einer Werkbank. Auch die Detektion sollte isoliert stattfinden. Zusätzlich sind separate Pipettensätze und Pipetten mit Filtern empfehlenswert. Dekontamination der Arbeitsflächen durch Bestrahlen mit UV-Licht, Sterilisation der Arbeitsgeräte,

Verwendung von Handschuhen und konsequenter Wechsel der Arbeitskleidung ermöglichen ein weitgehend steriles Arbeiten (SAIKI et al. 1988, SCHOCHETMAN et al. 1988, KWOK und HIGUCHI 1989, WRIGHT und WYNFORD-THOMAS 1990, ERLICH et al. 1991).

2.4.2. Falsch negative Ergebnisse

Der Abbau von Ziel- oder Primer-DNA kann die Ursache einer fehlgeschlagenen PCR sein. Unter Umständen ist die DNA aus hochprozessierten tierischen und pflanzlichen Rohstoffen mit DNA-Fragmenten < 200 bp so stark fragmentiert, dass sie für die PCR nicht mehr verwendbar ist (SCHWÄGELE 1999). Wenn die schon amplifizierte DNA abgebaut wird, sind schmierige Banden im Gel die Folgen. Der Abbau kann durch physikalische, chemische oder enzymatische Prozesse erfolgen. Vor allem die Amplifikation von langen DNA-Sequenzen kann zu Schwierigkeiten führen, da DNA-Stränge nach dem Zelltod fragmentieren. Nukleasen (RNasen, DNasen) können durch unvorsichtiges Handling, durch das Probenmaterial, von verschiedenen Bakterien in der Probe und in manchen Fällen durch den Zielorganismus selbst in die Reaktion gelangen. Nach der Amplifikation sollte entweder sofort die Gelelektrophorese durchgeführt werden oder das Produkt bei -20°C aufbewahrt werden, da die Aufbewahrung bei Zimmertemperatur zu einem Abbau des amplifizierten Produktes durch Nukleasen führen kann (WILSON et al. 1991, 1993, 1994, ALONSO et al. 1993, GIBSON et al. 1994). Der Abbau der DNA kann durch physiochemische Separation der Ziel-DNA von den destruktiven Bestandteilen so früh wie möglich nach der Zell-Lysis verhindert werden. Hitze und Proteasen helfen, die Nukleasen zu zerstören. Proteasen selbst müssen allerdings vor Zugabe der Polymerase wieder eliminiert werden um einen Abbau der Polymerase zu verhindern (MC HALE et al. 1991, ROSSEN et al. 1992, WILSON 1997).

Auch Temperatur-Inkonstanzen über den Block des Thermocycler können für schwache Amplifikationen in der PCR verantwortlich sein. Dieser Effekt kann durch Zugabe von Formamid vermindert werden, da Formamid die Schmelztemperatur der DNA herabsetzt. Allerdings kann dadurch die Spezifität der Reaktion beeinträchtigt werden. Deshalb sollte die Reproduktivität der Zykluszeit und der Temperatur

kontrolliert werden, vor allem wenn ein anderes Gerät verwendet wird (COMEY et al. 1991, TYLER et al. 1997, WILSON 1997).

Eine Inhibition der Amplifikation kann seinen Ursprung in vielen Faktoren haben: in schlecht kontrollierten Reaktionsbedingungen, der Probe selbst, Kontaminationen in den Reagenzien, Behältnissen oder Einwegmaterial, oder Kontamination während der Präparation. Der Einsatz der PCR in der Routinediagnostik ist prinzipiell durch das Vorhandensein von inhibitorischen Substanzen in komplexen biologischen Proben, wie Blut, Faeces, Organen, Fleisch und anderen Lebensmitteln limitiert. Der Mechanismus der inhibitorischen Wirkung ist bei den meisten Substanzen nicht bekannt. Die Inhibition kann vollständig oder nur partiell sein und somit zu einem völligen Fehlschlagen oder einer verminderten Sensitivität führen. Als Inhibitoren wirken vor allem große Mengen an Protein und Fett, Calcium im Überschuss (> 3 mM, z.B. aus Milch), Alkohole, Phenolverbindungen, Schwermetalle, Nukleasen und Proteasen, pflanzliche Polysaccharide, Hämoglobin, Bilirubin und Gallensäuren in Kot, Harnstoff in Urin, Heparin. Auch einige Komponenten, welche zur Extraktion der DNA verwendet werden, z.B. nicht-ionische und ionische Detergentien wie CTAB, Tween®, Triton X-100® und SDS, sowie Proteinase K (wird durch Hitzedenaturierung inaktiviert), Lysozym, NaOH, Alkohole, EDGA und EGTA haben einen inhibitorischen Effekt. Auch der Puder von gepuderten Handschuhen kann die Amplifikation durch unspezifische DNA-Bindungen hemmen. Ebenso können Cellulose und Nitrocellulosefilter und das Plastik der verwendeten Materialien, wie der Mikrozentrifugen-Röhrchen oder der Reaktionsgefäße, eine PCR beeinflussen (DE FRANCHIS et al. 1988, BEUTLER et al. 1990, GOLSTEYN-THOMAS et al. 1991, DE LOMAS et al. 1992, ROLFS et al. 1992, ROSSEN et al. 1992, FLUIT et al. 1993, LANTZ et al. 1994, 1997, 1998, SATSANGI et al. 1994, BICKLEY et al. 1996, NEWTON und GRAHAM 1997, WILSON 1997, MAHONY et al. 1998, SCHEU et al. 1998, AL-SOUD und RADSTRÖM 2000, GREINER 2004). Eine zu große Anzahl der Ziel-Bakterien, sowie hohe Konzentrationen an unspezifischer DNA, haben ebenfalls einen inhibitorischen Effekt (WANG et al. 1992).

Da die Oberfläche von Lebensmitteln der Hauptort einer bakteriellen Kontamination darstellt, reduzieren nicht-destruktive Abstriche bzw. Tupferproben die Menge an unspezifischer, lebensmitteleigener DNA und an möglichen inhibitorischen Faktoren

aus der Lebensmittelmatrix. Diese Abstrich-Tupfer können dann zur Anreicherung verwendet werden (BHADURI und COTTRELL 1997). Anhand einer Studie verglich BHADURI (2003) die Sensitivität einer Multiplex PCR-Methode zum Nachweis von *Y. enterocolitica*, nachdem beimpftes Schweinehackfleisch zum einen selektiv in MTSB (modifiziertes TSB) angereichert und dann mit Hilfe eines kommerziellen Extraktionskits aufgereinigt wurde. Des Weiteren wurde die Oberfläche der Fleischproben mit einem Tupfer abgestrichen, anschließend die Tupfer ebenfalls in MTSB angereichert und dann mit Hitze und Proteinase K behandelt. Dabei zeigte sich dass die direkte Anreicherung der Fleischproben die PCR stark inhibierten und die Proben vor dem Einsatz bei der PCR verdünnt werden mussten, während die Tupferproben direkt eingesetzt werden konnten und wesentlich weniger zeitaufwendig waren.

2.4.3. Quantifizierung

Die Real-Time PCR als quantitative PCR hat das Ziel, aus der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt auf die Menge an eingesetztem DNA-Template zu schließen (BANGSOW et al. 2002, FENOLLAR und RAOULT 2004). Ein großes Problem dieser Quantifizierung ist aber, dass auch tote, nicht mehr vermehrungsfähige Bakterien detektiert werden und somit unter Umständen falsch-positive Ergebnisse liefern. Eine Anreicherung, und dadurch Vermehrung der lebenden Keime, kann vor einer quantitativen PCR nicht eingesetzt werden, da dadurch die initiale Anzahl der Zielorganismen in unkontrollierter Weise beeinflusst wird (WOLFFS et al. 2005). Bei der Quantifizierung muss zwischen relativer und absoluter Quantifizierung unterschieden werden: die relative Quantifizierung ist der einfachere Weg und beschreibt Änderungen in der Menge der Zielsequenz im Vergleich zu einer Kontrolle. Bei klinischen Proben kann auch die Menge eines Pathogens vor und nach einer Behandlung verglichen werden. Absolute Quantifizierung ist aufwendiger, liefert aber exakte Aussagen darüber, wie viel Ziel-DNA in einer Probe vorhanden ist in Relation zu einer spezifischen Einheit. Dadurch können Daten aus verschiedenen Versuchen und Laboratorien verglichen werden (FREEMAN et al. 1999, PFAFFL et al. 2002).

Auch bei der konventionellen PCR ist eine absolute Quantifizierung möglich. Diese vergleicht die kompetitive Coamplifikation von einer internen Kontrolle mit bekannter

Konzentration mit einer wild-typ Ziel-DNA unbekannter Konzentration (BECKER-ANDRE und HAHNBROCK 1989, GILLILAND et al. 1990, SIEBERT und LARRICK 1992, CLEMENTI et al. 1995). Allerdings ist die Quantifizierung mittels konventioneller PCR technisch aufwendiger. Die Entwicklung und erforderliche Optimierung ist im Vergleich zu einer quantitativen Real-Time PCR wesentlich schwieriger (LOCATELLI et al. 2000, WALL und EDWARDS 2002). Eine Quantifizierung wird bisher vor allem bei Infektionskrankheiten und in der Mikrobiologie eingesetzt, zum Beispiel um die virale Belastung zu ermitteln. Außerdem sind quantitative Messungen auch wichtig um Therapiemaßnahmen zu überwachen. So kann bei Bakterien beispielsweise das Ansprechen auf Antibiotika ermittelt werden (JUNG et al. 2000).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Allgemeiner Versuchsaufbau

Der erste Teil der Arbeit galt der Optimierung der PCR. Dabei wurden die Mastermix- und Primer-Konzentration der konventionellen PCR, sowie die Annealing-Temperatur der Real-Time PCR variiert. Mit der konventionellen PCR sollte ermittelt werden, bei welcher Mastermix- bzw. Primer-Konzentration eine möglichst deutliche Bande zu sehen war. Die Versuche zur Annealing-Temperatur dienten dazu, diejenige Temperatur für die *ail*- bzw. *virF*-Primer zu ermitteln, bei welcher der Kurvenanstieg der Real-Time PCR möglichst früh erfolgte. Bei der SYBR Green Real-Time PCR-Methode wurde zusätzlich die Schmelzkurve berücksichtigt, um Primer-Dimere zu verhindern.

Im zweiten Teil wurde anhand von artifiziell beimpften Rinderhackfleischproben die Eignung verschiedener Extraktions-Kits zur Aufreinigung der DNA getestet und die allgemeine Sensitivität drei verschiedener PCR-Methoden, welche im ersten Teil optimiert wurden, ermittelt. Zugleich wurden die Ergebnisse der PCR mit kulturellen Nachweisverfahren verglichen. Dazu wurden die Rinderhackfleischproben mit einem *Y. enterocolitica*-Stamm des Bioserotyps 4/O:3 beimpft und zum einen kulturell untersucht und dieselben Proben mit sechs verschiedenen DNA-Aufreinigungsmethoden, darunter fünf Extraktionskits verschiedener Anbieter, aufgereinigt. Die Untersuchung dieser Proben erfolgte anschließend mit einer konventionellen PCR mit Gelelektrophorese, einer Real-Time PCR-Methode mit SYBR Green als Fluoreszenzfarbstoff und eine Real-Time PCR-Methode mit einer TaqMan-Sonde als Detektionssystem.

Im dritten Teil der Arbeit wurden Schweinefleischproben aus dem Handel kulturell und mittels der drei PCR-Methoden auf Vorhandensein von *Y. enterocolitica* untersucht. Die DNA-Extraktion erfolgte mit den drei Extraktionskits, welche sich im zweiten Teil der Arbeit optimal erwiesen.

In Tabelle 9 ist ein Überblick über den Ablauf dargestellt.

Tabelle 9: Gliederung der verschiedenen Arbeitsteile mit Zielsetzung

Arbeitsteil	Durchführung	Ziel
1. Teil	Variation der - Mastermix-Konzentration, - Primer-Konzentration - Annealing-Temperatur	Optimierung der PCR-Bedingungen für <i>Y. enterocolitica</i>
2. Teil	Untersuchung von beimpftem Hackfleisch - Aufreinigung mittels sechs verschiedener Methoden - Anwendung von drei optimierten PCR-Methoden aus Teil 1 - Untersuchung mit kulturellen Verfahren	Ermittlung der optimalen Aufreinigungsmethode; zusätzlich Ermittlung der Nachweisgrenze von PCR und Kultur
3. Teil	Untersuchung von Schweinefleischproben aus dem Handel - Aufreinigung mittels drei ausgewählten Methoden aus Teil 2 - Anwendung von drei optimierten PCR-Methoden - Untersuchung mit kulturellen Verfahren	Erprobung der optimierten Real-Time PCR-Methoden an Routineproben

2. Material

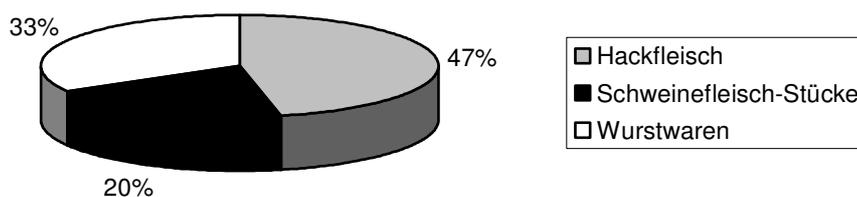
2.1. Probenmaterial und Bakterien

Für die Vorversuche im ersten Teil wurden die in der Mikrobank bei -70°C des "Institutes für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs, LMHYG" der LMU München gelagerten *Y. enterocolitica*-Stämme A160 und P182 verwendet. Dabei handelt es sich um bei vorausgegangenen Forschungsprojekten aus Schweinefleisch isolierte Stämme. Beide gehören den beim Menschen häufigsten pathogenen Bioserotyp 4/O:3 an. Der Stamm A160 ist Plasmid-negativ, der Stamm P182 Plasmid-positiv.

Für den zweiten Teil dieser Arbeit wurden Rinderhackfleischproben verwendet, welche in der LMHYG bei -20°C gelagert wurden. Die Beimpfung dieser Hackfleischproben erfolgte mit dem in der Mikrobank gelagerten *Y. enterocolitica*-Stamm MYT 13.1D. Dabei handelt es sich um einen 2004 aus Schweinetsillen isolierten Stamm des Bioserotyps 4/O:3, bei welchem das Virulenzplasmid pVY nachweisbar ist. Für die Positivkontrolle der PCR-Analyse fand ebenfalls dieser Stamm Verwendung.

Im dritten Teil der Arbeit wurden insgesamt 150 Schweinefleischproben untersucht. Davon entfielen 100 auf rohe Produkte und 50 auf verzehrfertige Wurstwaren. Von den 100 rohen Proben waren 70 Hackfleisch (Schwein oder Schwein und Rind gemischt) und 30 Schweinefleischstücke für die Verarbeitung (Abbildung 11). Diese Proben stammten aus Routineproben, welche im Institut zur mikrobiologischen Untersuchung angeliefert wurden. Die Untersuchung dieser Proben erfolgte entweder direkt nach der Anlieferung oder nach sofortigem Tiefgefrieren bei -20°C und späterem Auftauen bei Zimmertemperatur.

Abbildung 11: Aufteilung der Probenarten



2.2. Untersuchungsmaterial

Die verwendeten Untersuchungsmaterialien sind im Anhang aufgeführt.

3. Methoden

3.1. Erster Teil: Vorversuche PCR

3.1.1. Ermittlung der idealen Mastermix- und Primer-Konzentration

Die *Y. enterocolitica*-Stämme A160 und P182 wurden aus der Mikrobank entnommen und unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitsbank auf Plate-Count (PC) Agar und CIN-Agar ausgestrichen (3-Ösenausstrich) und bei +30 °C für 24-48 h bebrütet. Die Entnahme erfolgte im dicht bewachsenen Bereich durch Antippen mit einer Pipettenspitze. Diese wurden in 100 µl Nuclease-freiem Wasser in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gelöst und für 10 min bei +99 °C erhitzt. Nach Zentrifugation bei 13.200 rpm für 3 min wurde der Überstand in ein neues 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die freie DNA diente als Template für die PCR.

In einer konventionellen PCR wurden verschiedene Konzentrationen (1x, 1,25x, 1,5x) des 2,5x Eppendorf-Mastermix eingesetzt, um die ideale Konzentration an MgCl₂ festzustellen. Die Untersuchung erfolgte mit *Y. enterocolitica*-Koloniematerial nach Bebrütung für 24 h bei 30 °C auf PC bzw. CIN-Agar. Der Mastermix setzte sich wie in den folgenden Pipettierschematas (Tabelle 10-12) zusammen.

Tabelle 10: Pipettierschema für 1x-Mastermix

Substanz	Konzentration	Menge	Endkonzentration
H ₂ O		8 µl	
2,5x Eppendorf-Mastermix	2,5x	10 µl	1x
Magnesium	3,75 mM		1,5 mM
dNTPs	je 500 µM		je 200 µM
Taq-Polymerase	62,5 U/ml		0,625 U
Primer <i>ail</i> 1+2	2 µM	2,5 µl	0,2 µM
Primer <i>virF</i> 1+2	2 µM	2,5 µl	0,2 µM
Summe:		23 µl	

Tabelle 11: Pipettierschema für 1,25x-Mastermix

Substanz	Konzentration	Menge	Endkonzentration
H ₂ O		5,5 µl	
2,5x Eppendorf-Mastermix	2,5x	12,5 µl	1,25x
Magnesium	3,75 mM		1,875 mM
dNTPs	je 500 µM		je 250 µM
Taq-Polymerase	62,5 U/ml		0,8 U
Primer <i>ail</i> 1+2	2 µM	2,5 µl	0,2 µM
Primer <i>virF</i> 1+2	2 µM	2,5 µl	0,2 µM
Summe:		23 µl	

Tabelle 12: Pipettierschema für 1,5x-Mastermix

Substanz	Konzentration	Menge	Endkonzentration
H ₂ O		3 µl	
2,5x Eppendorf-Mastermix	2,5x	15 µl	1,5x
Magnesium	3,75 mM		2,25 mM
dNTPs	je 500 µM		je 300 µM
Taq-Polymerase	62,5 U/ml		0,95 U
Primer <i>ail</i> 1+2,	2 µM	2,5 µl	0,2 µM
Primer <i>virF</i> 1+2	2 µM	2,5 µl	0,2 µM
Summe:		23 µl	

Zu diesem Ansatz wurden jeweils 2 µl Template hinzupipettiert

In einem weiteren Versuch variierte die Primer-Menge um eine Endkonzentration von 0,1 µM, 0,2 µM bzw. 0,3 µM zu erreichen. Verwendet wurde Koloniematerial nach Bebrütung auf PC- und CIN-Agar für jeweils 24 und 48 h bei 30 °C.

3.1.2. Gradient zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur

Während einem Real-Time PCR-Lauf (SYBR Green) wurde in acht verschiedenen Reaktionsgefäßen unterschiedliche Annealing-Temperaturen eingesetzt. Die Durchführung dieses Versuches erfolgte sowohl für die *ail*- als auch die *virF*-Primer. Ebenso wurde ein Gradient mit der TaqMan Real-Time PCR zum Nachweis des *ail*-Genes durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand des Kurvenverlaufes und der C_t-Werte.

Gradient (Annealing-Temp.) für *ail*:

- | | | | | |
|--------|-------|-------|-------------------------|--------------|
| 1. | 3 min | 95 °C | | |
| 2. 40x | 15 s | 95 °C | | |
| | 20 s | 50 °C | Range 10 °C (bis 60 °C) | → Gradient |
| | 10 s | 72 °C | | |
| 3. | 1 min | 95 °C | | |
| 4. | 1 min | 50 °C | | |
| 5. 91x | 10 s | 50 °C | 0,5 °C Schritte | → Melt Curve |

Gradient (Annealing-Temp.) für *virF*:

- | | | | | |
|--------|-------|-------|------------------------|--------------|
| 1. | 3 min | 95 °C | | |
| 2. 40x | 15 s | 95 °C | | |
| | 40 s | 55 °C | Range 5 °C (bis 60 °C) | → Gradient |
| | 10 s | 72 °C | | |
| 3. | 1 min | 95 °C | | |
| 4. | 1 min | 50 °C | | |
| 5. 91x | 10 s | 50 °C | 0,5 °C Schritte | → Melt Curve |

Gradient (Annealing-Temp.) für die Sonde:

- | | | | | |
|--------|-------|-------|------------------------|------------|
| 1. | 3 min | 95 °C | | |
| 2. 40x | 10 s | 95 °C | | |
| | 30 s | 50 °C | Range 5 °C (bis 60 °C) | → Gradient |

3.1.3. Real-Time PCR mit SYBR-Green

In einer ersten Real-Time PCR wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green als Detektionssystem verwendet. Die Spezifitätsprüfung erfolgte über die Schmelzkurvenanalyse.

Primer

Die verwendeten Primer *ail1* und *ail2* amplifizieren ein 170 bp großes Fragment des *ail*-Genes:

ail1: 5'-ACTCGATGATAACTGGGGAG-3'

ail2: 5'-CCCCAGTAATCCATAAAGG-3'.

Die Primer *virF1* und *virF2* amplifizieren ein 591 bp großes Fragment des auf dem Plasmid lokalisierten *virF*-Genes:

virF1: 5'-TCATGGCAGAACAGCAGTCAG-3'

virF2: 5'-ACTCATCTTACCATTAAGAAG-3'

Es wurden für alle Proben im zweiten Teil der Arbeit zwei PCR-Läufe durchgeführt. Zum einen basierend auf der Amplifikation *ail*-Fragmentes, zum anderen zur Amplifikation *virF*-Genes. Im dritten Teil der Arbeit entfiel die Untersuchung auf das *virF*-Gen, es wurde nur das *ail*-Gen detektiert.

PCR-Bedingungen

Die Ansetzung des PCR-Ansatzes erfolgte unter einer Sterilbank. Der im zweiten und dritten Teil der Arbeit verwendete Mastermix hatte ein Volumen von 23 μ l und setzte sich wie in Tabelle 13 angegeben zusammen:

Tabelle 13: Pipettierschema für die SYBR Green Real-Time PCR

Substanz	Konzentration	Menge	Endkonzentration
H ₂ O		8 μ l	
2x IQ SYBR Green Supermix	2x	12,5 μ l	1x
Magnesium	6 mM		3 mM
dNTPs	je 400 μ M		je 200 μ M
Taq-Polymerase	50 U/ml		0,625 U
Primer <i>ail</i> 1+2 bzw. <i>virF</i> 1+2	2 μ M	2,5 μ l	0,2 μ M
Summe:		23 μ l	
Template:		2 μ l	
Gesamtvolumen:		25 μ l	

Bei jedem PCR-Lauf wurde eine Positiv-, sowie eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. In der Positiv-Kontrolle wurde als Template DNA des *Y. enterocolitica*-Stammes MYT 13.1D des Bioserotyps 4/O:3, welche das Plasmid enthielt, eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz welcher nur die Reagenzien des Master-Mixes ohne Template enthielt. Für den Impfversuch im zweiten Teil der Arbeit stellte die nicht-beimpfte Fleischprobe eine weitere Negativ-Kontrolle dar.

Das Programm des Thermocyclers setzte sich für *ail*-Gen, nach Optimierung in den Vorversuchen, folgendermaßen zusammen:

Zyklus 1:	Denaturierung
Step 1:	95°C 3 min
Zyklus 2: (40x)	Amplifikation (Denaturierung/Annealing/Extension)
Step 1:	95°C 10 s
Step 2:	52°C 20 s
Step 3:	72°C 10 s
Zyklus 3:	Denaturierung
Step 1:	95°C 1 min
Zyklus 4: (1x)	Annealing/Extension
Step 1:	52°C 1 min
Zyklus 5: (90x)	
Step 1:	50°C Schmelzkurve in 0,5°C-Schritten

Für das *virF*-Gen wurde folgendes Programm verwendet:

Zyklus 1:	Denaturierung
Step 1:	95.0°C 3 min
Zyklus 2: (40x)	Amplifikation (Denaturierung/Annealing/Extension)
Step 1:	95°C 15 s
Step 2:	56°C 40 s
Step 3:	72°C 10 s
Zyklus 3:	Denaturierung
Step 1:	95°C 1 min
Zyklus 4: (1x)	Annealing/Extension
Step 1:	56°C 1 min
Zyklus 5: (80x)	
Step 1:	55°C Schmelzkurve in 0,5°C-Schritten

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines PC-Programmes anhand der C_t -Werte und Kontrolle der Schmelzkurve. Das 170 bp große Fragment des *ail*-Genes hatte eine Schmelzkurve bei 81,5-82°C, während für das 591 bp große Fragment des *virF*-Genes eine Schmelzkurve bei 85–85,5°C typisch war.

3.1.4. Real-Time PCR mit einer TaqMan-Sonde (5' Nuclease PCR-Assay)

Zur Bestätigung kam eine weitere Real-Time PCR-Nachweismethode für pathogene *Y. enterocolitica* zum Einsatz. Als Detektionssystem wurde eine für *Y. enterocolitica* spezifische TaqMan-Sonde eingesetzt.

Primer

Das Zielgen stellte wieder das *ail*-Gen dar. Zum Einsatz kamen dieselben Primer wie bei der SYBR Green Real-Time PCR, somit wurde wieder das 170 bp-große Fragment amplifiziert.

Sonde

Als Sondensystem wurde eine TaqMan-Sonde verwendet. Diese Sonde, *ailP*, wurde mit Hilfe des Programms Beacon Designer eines iCycler Detection Systems (Biorad) von SCHEU (Biorad) hergestellt. Sie ist am 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff FAM und am 3'-Ende mit dem Quencher TAMRA markiert. Das 24 bp-lange Fragment hatte folgende Sequenz:

ailP: 5'-TCGTTTGCTTATACTCATCAGGGA-3'.

PCR-Bedingungen

Der Mastermix hatte wieder ein Volumen von 23 µl und setzte sich folgendermaßen zusammen (Tabelle 14):

Tabelle 14: Pipettierschema für die TaqMan Real-Time PCR

Substanz	Konzentration	Menge	Endkonzentration
H ₂ O		6,75 µl	
2x IQ-Supermix	2x	12,5 µl	1x
Magnesium	6 mM		3 mM
dNTPs	je 400 µM		je 200 µM
Taq-Polymerase	50 U/ml		0,625 U
Primer <i>ail</i> 1+2	2 µM	2,5 µl	0,2 µM
TaqMan-Sonde <i>ailP</i>	2 µM	1,25 µl	0,1 µM
Summe:		23 µl	
Template:		2 µl	
Gesamtvolumen:		25 µl	

Wiederum wurde bei jedem Lauf wurde eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle mit einem Keim des Plasmidtragenden Bioserotyps 4/O:3 als Template mitgeführt.

Der Thermocycler wurde nach Optimierung in den Vorversuchen folgendermaßen programmiert:

Zyklus 1: (1x) Denaturierung

Step 1: 95°C 3 min

Zyklus 2: (40x) Amplifikation

Step 1: 95°C 10 s

Step 2: 52°C 30 s

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines PC-Programmes anhand der ermittelten C_T -Werte.

3.1.5. Konventionelle PCR

Die PCR-Methode basiert auf der von NAKAJIMA et al. (1992) entwickelten Multiplex-PCR. Dabei wird in einem PCR-Lauf gleichzeitig das *ail*-Gen und das auf dem Virulenzplasmid lokalisierte *virF*-Gen detektiert.

Primer

Zum Einsatz kamen dieselben Primer wie für die SYBR Green Real-Time PCR (Kap. 3.1.3.)

PCR-Bedingungen

Verwendet wurde ein Mastermix mit einem Volumen von 23 μ l und folgender Zusammensetzung (Tabelle 15):

Tabelle 15: Pipettierschema für die konventionelle Multiplex-PCR

Substanz	Konzentration	Menge	Endkonzentration
H ₂ O		8 µl	
2,5x Eppendorf-Mastermix	2,5x	10 µl	1x
Magnesium	3,75 mM		1,5 mM
dNTPs	je 500 µM		je 200 µM
Taq-Polymerase	62,5 U/ml		0,625 U
Primer <i>ail</i> 1+2	2 µM	2,5 µl	0,2 µM
Primer <i>virF</i> 1+2	2 µM	2,5 µl	0,2 µM
Summe:		23 µl	
Template:		2 µl	
Gesamtvolumen:		25 µl	

Es wurde wieder bei jedem Lauf eine Negativkontrolle, welche nur den Mastermix ohne Template enthielt, für den Impfversuch auch eine Negativkontrolle mit nicht beimpften Fleischproben, und eine Positivkontrolle mit einem Keim des Plasmidtragenden Bioserotyps 4/O:3 als Template mitgeführt.

Das Programm des Thermocyclers setzte sich folgendermaßen zusammen:

Zyklus 1: Denaturierung

Step 1: 94°C 1 min

Zyklus 2: (30x) Amplifikation (Denaturierung/Annealing/Extension)

Step 1: 94°C 30 s

Step 2: 55°C 1 min

Step 3: 72°C 2 min

Zyklus 3: (1x) Annealing/Extension

Step 1: 72°C 5 min

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1%igem Agarose-Gel. Dazu wurden 1 g Agarose mit 100 ml 0,5x Tris-Borsäure-EDTA-(TBE)Puffer (95 ml Aqua bidest + 5 ml TBE 10x) im Mikrowellenherd gelöst und in die Gelkammer mit den bereits eingesetzten Kämmen gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde es in die Laufkammer, welche 1800 ml 0,5x TBE-Puffer enthielt, überführt.

Zum Auftragen der PCR-Produkte wurden 2 µl Sample Acid Loading Buffer pro PCR-Probe auf ein Stück Parafilm pipettiert und anschließend mit 10 µl des Amplifikates vermischt. 10 µl der Proben und jeweils 4 µl 100 bp-Längenstandard wurden in die Taschen des Gels überführt und bei 140 V in 45 min aufgetrennt. Nach Färbung des Agarosegels im Ethidiumbromid-Bad (25 µg Ethidiumbromid (10mg/ml) pro 500 ml Aqua bidest) für 30 min und anschließendem Wässern in Aqua bidest für 10 min wurden die DNA-Fragmente mit UV-Licht in einem Geldokumentationssystem sichtbar gemacht und dokumentiert. Durch Vergleich mit dem 100 bp-Längenstandard konnte für jedes Gel die Länge der DNA-Fragmente bestimmt werden.

3.2. Zweiter Teil: Nachweis von *Y. enterocolitica* aus beimpftem Fleisch

Für den Impfversuch im zweiten Teil der Arbeit wurde folgendes Ablaufschema verwendet (Abbildung 13):

Tag 1:

Der *Y. enterocolitica*-Stamm MYT 13.1D wurde aus der Mikrobank entnommen und unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitsbank auf CIN-Agar ausgestrichen (3-Ösenausstrich) und bei +30°C 24 h bebrütet.

Tag 2:

Fünf Kolonien wurden in BHI-Lösung (Brain-Heart-Infusion) überführt und bei +30°C 24 h bebrütet.

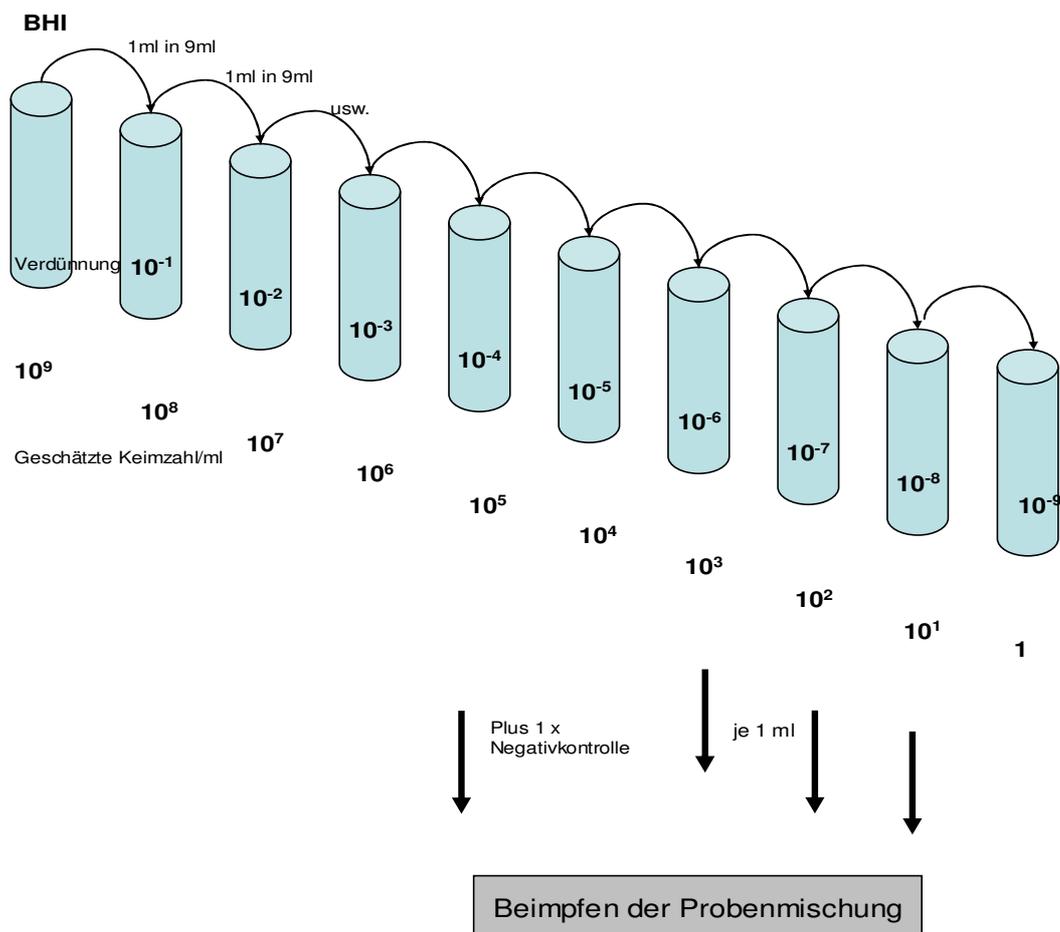
Tag 3:

Zur Herstellung einer Verdünnungsreihe aus der Keimsuspension in BHI wurde 1 ml der BHI-Lösung in 9 ml Verdünnungslösung gegeben und durchmischt. Von dieser Verdünnung wurde wiederum 1 ml in 9 ml Verdünnungslösung gegeben und vermischt. So wurde bis zu einer Verdünnung von 10^{-9} fortgefahren (Abbildung 12).

Zur Ermittlung der Keimzahl wurden die 6 höchsten Verdünnungen (10^{-9} bis 10^{-4}) im Tropfplattenverfahren (Doppelansatz) auf PC-Agar und CIN-Agar ausgestrichen und bei +30°C 24 h bebrütet.

Bei -20°C gelagertes, reines Rinderhackfleisch wurde aufgetaut. Je $4 \times 10 \text{ g}$ wurden in einem Stomacherbeutel zu 90 ml TSB-Bouillon gegeben und im Stomacher 30 s durchmischt. Die Beimpfung dieser Hackfleischproben erfolgte mit 1 ml der Bakteriensuspension von den Verdünnungen 10^{-8} , 10^{-7} und 10^{-6} , bzw. der Verdünnungen 10^{-7} , 10^{-6} und 10^{-5} beim 1. Durchgang. Eine nicht-beimpfte Probe diente als Negativkontrolle. Nach 1-2 Stunden Bebrütung bei Raumtemperatur wurden $100 \mu\text{l}$ der beimpften Proben im 3-Ösenausstrich auf CIN-Agar ausgestrichen und 1 ml wurden in 9 ml ITC-Bouillon pipettiert und durchmischt. Die Bebrütung der CIN-Agarplatten erfolgte bei $+30^{\circ}\text{C}$ für 24 h , die ITC-Bouillon wurde bei $+25^{\circ}\text{C}$ 48 h bebrütet.

Abbildung 12: Herstellung der Verdünnungsreihe



BHI Brain Heart Infusion

4.Tag:

Durch Auszählung der Tropfplatten wurde die Keimzahl mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$\text{GKZ (Gesamtkeimzahl)} = \frac{\sum c}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1} \times d$$

c = Anzahl der Kolonien

n₁ = Anzahl der Platten der niedrigsten Verdünnungsstufe

n₂ = Anzahl der Platten der nächsthöheren Verdünnungsstufe

d = Faktor der niedrigsten Verdünnungsstufe

Anhand der berechneten Keimzahl konnte die Keimzahl in den beimpften Hackfleischproben ermittelt werden.

Die Auswertung des Direktausstriches auf CIN-Platte vom Vortag erfolgte durch Beurteilung der Koloniegröße und -farbe.

0,5 ml der Übernachtenreicherung in TSB wurden in 4,5 ml KOH-Lösung überführt, durchmischt und 20 s inkubiert. Anschließend wurde eine Impföse im 3-Ösenausstrich auf CIN-Agar überführt und bei +30 °C 24 h bebrütet.

Die Übernachtenreicherung in TSB diente auch als Template für die PCR. Dazu wurden 100 µl entnommen und wie in Kapitel 3.2.1. aufgeführt weiterbehandelt.

5.Tag:

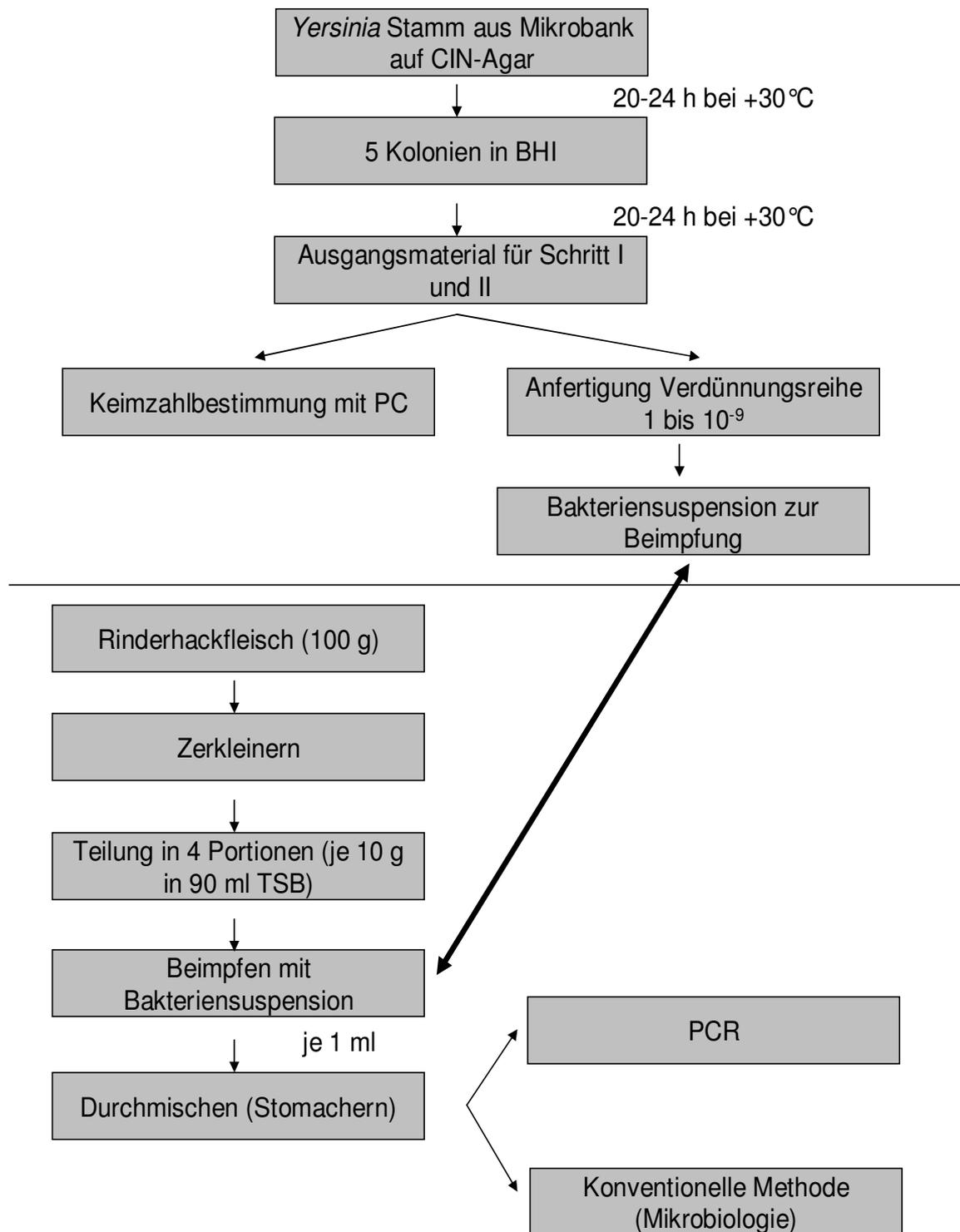
Die Auswertung des CIN-Ausstriches nach KOH-Behandlung erfolgte nach demselben Schema wie beim Direktausstrich auf CIN-Agar.

Von der ITC-Anreicherung wurde mit 100 µl ein 3-Ösenausstrich auf einer CIN-Platte durchgeführt und für 24h bei +30 °C bebrütet.

6.Tag:

Die CIN-Platten der ITC-Anreicherung wurden nach dem bekannten Muster beurteilt.

Abbildung 13: Fließschema zur Vorbereitung



PC Plate Count
BHI Brain Heart Infusion
TSB Typtic Soya Broth

3.2.1. PCR-Nachweis

Als Material für die PCR-Analyse diente die Übernachtenreicherung in TSB. Dazu wurden jeweils 100 µl in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 13.200 rpm für 3 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes konnte das verbleibende Pellet je nach verwendeter Aufreinigungsmethode weiterverwendet werden.

Folgende Methoden kamen zum Einsatz:

- a) Pronase-Behandlung (Methode A)
- b) Biorad InstaGene™ Matrix (Methode B)
- c) Biorad Genomic Tissue Kit (Methode C)
- d) Qiagen DNeasy Tissue Kit (Methode D)
- e) Peqlab® E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini (Methode E)
- f) Wizard® Magnetic DNA Purification System for food; Promega (Methode F)

Die Untersuchung der aufgereinigten DNA der Proben erfolgte mittels drei verschiedener PCR-Methoden. Zum Einsatz kam ein Real-Time PCR-Programm mit SYBR Green als Detektionsfarbstoff, eine Real-Time PCR-Methode mit einer *ail*-spezifischen TaqMan-Sonde und eine konventionelle PCR-Methode mit Detektion durch Gelelektrophorese. Anhand der errechneten Keimzahl konnte die ungefähre Nachweisgrenze ermittelt werden.

3.2.1.1. DNA-Extraktion

a) Pronase-Behandlung

Prinzip

Durch das Enzym Pronase werden die in der Zellwand enthaltenen Proteine verdaut. Die anschließende Hitzebehandlung führt zur Lyse der Zellen.

Methode

Zu dem Pellet wurden 50 µl einer Pronase-Lösung (1 mg/ml) gegeben, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und bei +55°C für 30 min inkubiert. Nach gründlichem mixen im Vortexer folgte eine Inkubation der Proben bei +99°C für 10 min. Nach

erneutem Mischen wurden die Proben für 3 min bei 13.200 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für die PCR verwendet.

b) Biorad InstaGene™ Matrix

Prinzip

Das Prinzip beruht auf einem Anionenaustauscherharz, der Chelex®-Matrix, mit anschließender Zellyse durch Hitze (100 °C).

Methode

Die InstaGene™-Matrix wurde durch Schütteln in Suspension gebracht. Zu dem Pellet wurde 100 µl der InstaGene™-Matrix pipettiert und 15 min bei +56 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 s gevortext und 8 min bei +99 °C inkubiert. Nach erneutem Mischen für 10 s wurden die Proben bei 13.200 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in der PCR verwendet.

c) Biorad Genomic Tissue Kit

Prinzip

Die Zellen werden mit einem anionischen Detergenz lysiert und anschließend die Proteine durch Salzpräzipitation entfernt. Die DNA wird mit Ethanol gefällt, gewaschen und in einer geeigneten Pufferlösung aufgenommen.

Methode

Zu dem Pellet wurden 150 µl Genomic DNA Lysis Solution und 0,8 µl Proteinase K (20 mg/ml) gegeben und durch auf- und abpipettieren gelöst. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben bei +56 °C für 1 h. Nach Zugabe von 100 µl Protein Precipitation Solution und gründlichem Schütteln wurden die Proben bei 13.200 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 150 µl 100%igem Isopropanol überführt und 50-mal gedreht. Anschließend wurden die Proben 1 min bei 13.200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und 150 µl 70 %iges Ethanol zugegeben und einige Male gedreht. Nach

erneuter Zentrifugation bei 13.200 rpm für 1 min konnte der Überstand vorsichtig verworfen und die Reaktionsgefäße mit der Öffnung nach unten zum Trocknen 15 min auf saugfähiges Papier gestellt werden. Zur Hydrierung der DNA wurden 50 µl DNA Hydration Solution zugegeben und für 30 min bei +65 °C inkubiert.

d) Qiagen DNeasy Tissue Kit

Prinzip

Die Lyse der Zellen erfolgt mit Hilfe des mitgelieferten ATL-Puffers und Proteinase K, anschließend wird die DNA an eine Silikamembran adsorbiert und Verunreinigungen durch zwei Waschschrte entfernt. Die Elution der DNA erfolgt mit einem speziellen, im Kit mitgelieferten Puffer.

Methode

Das Pellet wurde in 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K-Lösung (im Kit enthalten) durch auf- und abpipettieren gelöst und bei +55 °C 1 h unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer und Mischen folgte eine Inkubation für 10 min bei +70 °C. Nach Zugabe von 200 µl 100 %igem Ethanol wurden die Proben gemischt und auf die vorbereiteten Säulen, welche in ein Auffanggefäß eingesetzt wurden, überführt. Der Durchfluss konnte nach Zentrifugation (8.000 rpm, 1 min) verworfen und die Säulen in frische Auffanggefäße gesetzt werden. Nach Zugabe von 500 µl AW1-Puffer wurden die Säulen wieder zentrifugiert (8.000 rpm, 1 min), der Durchlauf verworfen und die Säulen in frische Auffanggefäße gesetzt. Anschließend wurden 500 µl AW2-Puffer zugegeben und bei 13.600 rpm 3 min zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säulen in frische 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gesetzt. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 200 µl AE-Puffer auf die Säule, 1-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und nach Zentrifugation bei 8.000 rpm für 1 min. Das Eluat wurde für die PCR verwendet.

d) Peglab® E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini

Prinzip

Das Prinzip entspricht dem oben beschriebenen Qiagen DNeasy Tissue Kit.

Methode

Das Pellet wurde in 200 µl TL-Puffer und 25 µl OB™Protease (im Kit enthalten) durch auf- und abpipettieren gelöst und bei +55 °C 1 h unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 220 µl BL-Puffer zugegeben und die Proben nach Mischen 10 min bei +70°C inkubiert. Nach Zugabe von 220 µl 100 %igem Ethanol wurden die Proben gemischt und auf die vorbereiteten Säulen, welche in ein Auffanggefäß eingesetzt wurden, überführt. Nach Zentrifugation (8.000 rpm, 1 min) konnte der Durchfluss verworfen und die Säulen in frische Auffanggefäße gesetzt werden. Nach Zugabe von 750 µl DNA-Waschpuffer wurden die Säulen wieder zentrifugiert (8.000 rpm, 1 min), der Durchlauf verworfen und die Säulen in frische Auffanggefäße gesetzt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend erfolgte die Elution durch Zugabe von 200 µl Elutionspuffer auf die Säule, 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 8.000 rpm für 1 min. Das Eluat wurde für die PCR verwendet.

e) Wizard® Magnetic DNA Purification System for food (Promega)

Prinzip

Diese Methode beruht auf einem ähnlichen Prinzip, wie die Silika-Säulen. Durch die Lysis-Puffer werden die Zellen lysiert. Anschließend bindet die DNA an die Oberfläche von winzigen magnetischen Kügelchen. Die in der flüssigen Phase vorhandenen Partikel werden abgetrennt.

Methode

Zu dem Pellet wurden 500 µl Lysis Buffer A pipettiert und gut gemischt, es folgte die Zugabe von 250 µl Lysis Buffer B und nach erneutem Mischen eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Zu den Proben wurden 750 µl Precipitation Solution gegeben, gemischt und bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 50 µl MagneSil™PMP ("Paramagnetische Partikel"), nach gutem Mischen, zugegeben und gemischt. Anschließend wurde 0,8 ml Isopropanol zugegeben, die Reaktionsgefäße 10-15-mal gedreht und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dabei hin und wieder geschüttelt. Im MagneSphere®Magnetic Separation Stand, welcher im Kit enthalten

war, erfolgte eine Inkubation für 1 min. Nach Verwerfen der flüssigen Phase mit Hilfe einer Pipette und nach Entnahme des Gefäßes vom Stand, wurden 250 µl Lysis Buffer B zugegeben, 2-3 x gedreht und erneut im Stand für 1 min stehen gelassen. Wiederum folgte das Verwerfen der flüssigen Phase, anschließend wurde 1 ml Wash Solution (= 70 %iges Ethanol) zugegeben und für 1 min in den Stand gestellt, die flüssige Phase konnte wiederum mit Hilfe einer Pipette entnommen und verworfen werden. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, beim dritten Waschschrift soviel flüssige Phase wie möglich entnommen. Nach Inkubation der Proben für 10 min bei +65°C folgte die Zugabe von 100 µl Nuclease-freies Wasser und nochmalige Inkubation für 5 min bei +65°C. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in den Stand gestellt, die flüssige Phase in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und diese für eine PCR verwendet.

3.2.1.2. Positivkontrolle

Für die Positivkontrolle wurde der in der Mikrobank gelagerte Stamm MYT 13.1D auf CIN-Agar ausgestrichen und bei +30°C für 24 h bebrütet.

Wenig Koloniematerial wurde mit durch Antippen mit einer Pipettenspitze in 100 µl Nuclease-freiem Wasser in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gelöst und für 10 min bei +99°C erhitzt. Nach Zentrifugation bei 13.200 rpm für 3 min konnte der Überstand in ein neues 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und als Template für die Positivkontrolle verwendet werden.

3.2.1.3. Lagerung der gereinigten DNA

Die aufgereinigte DNA wurde bei -20°C gelagert und vor Verwendung bei Zimmertemperatur aufgetaut.

3.2.1.4. PCR-Protokolle

s. Kapitel 3.1.3.-3.1.5.

3.2.1.5. Sensitivitätsprüfung

Die Sensitivität der einzelnen PCR-Methoden konnte anhand der berechneten Keimzahl der drei unterschiedlich beimpften Hackfleischproben ermittelt werden. Dabei wurden diejenigen Keimzahlen verglichen, bei denen zum ersten Mal ein

positives PCR-Ergebnis erkennbar war. Dies ermöglichte einen qualitativen Vergleich der unterschiedlichen DNA-Aufreinigungsmethoden miteinander.

3.3. Dritter Teil: Nachweis von *Y. enterocolitica* aus Fleischproben

Im 3. Teil der Arbeit wurden Routineproben des Instituts aus dem Handel auf Vorhandensein von *Y. enterocolitica* kulturell und molekularbiologisch per PCR untersucht.

1.Tag:

Die Untersuchung der Proben erfolgten entweder frisch direkt nach der Anlieferung im Labor oder sie wurden bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert und am Tag der Untersuchung bei Zimmertemperatur aufgetaut.

10 g Probe wurden in 90 ml TSB eingewogen und im Stomacherbeutel für 30 s im Stomacher zerkleinert und durchmischt. Nach 2 h Bebrütung bei Raumtemperatur wurde mit 100 µl der Suspension ein 3-Ösenausstrich auf einer CIN-Platte durchgeführt und für 24 h bei +30°C bebrütet. 1 ml der Suspension wurden in 9 ml ITC-Bouillon pipettiert, durchmischt und bei +25°C für 48 h bebrütet. Die TSB-Anreicherung wurde ebenfalls bei +25°C über Nacht bebrütet.

2.Tag:

Die Auswertung des Direktausstriches auf CIN-Platte vom Vortag erfolgte durch Beurteilung der Koloniegröße und -farbe. Bis zu fünf charakteristische kleine (<1 mm), dunkellila gefärbte Kolonien, sog. "Kuhaugen", wurden ausgewählt und bis zur Erlangung einer Reinkultur auf CIN-Agar ausgestrichen und anschließend auf einer unspezifischen TSA-Platte zur weiteren Differenzierung ausgestrichen und bei 30°C 24 h bebrütet.

Die Alkalibehandlung erfolgte durch Überführen von 0,5 ml der Übernachtenreicherung in TSB in 4,5 ml KOH-Lösung, durchmischen und Inkubation für 20 s. Anschließend wurde eine Impföse (10 µl) im 3-Ösenausstrich auf CIN-Agar überführt und bei +30°C 24 h bebrütet.

Die Übernachtenreicherung in TSB diente auch als Template für die PCR. Dazu wurden 100 µl entnommen und wie in Kapitel 3.3.1. aufgeführt weiterbehandelt.

3.Tag:

Die Auswertung des CIN-Ausstriches nach KOH-Behandlung erfolgte nach demselben Schema wie beim Direktausstrich auf CIN-Agar.

Von der ITC-Anreicherung wurde mit 100 µl ein 3-Ösenausstrich auf einer CIN-Platte durchgeführt und für 24 h bei +30 °C bebrütet.

4.Tag:

Die CIN-Platten der ITC-Anreicherung wurden nach dem bekannten Muster beurteilt.

3.3.1. PCR-Nachweis

Als Probenmaterial für die PCR-Analyse diente die Übernachtenreicherung in TSB. Dazu wurden jeweils 100 µl in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 13.200 rpm für 3 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes konnte das verbleibende Pellet je nach verwendetem Extraktions-Kit weiter verwendet werden. Die Aufreinigung erfolgte mittels folgender drei kommerziell erhältlicher Kits:

- a) Biorad InstaGene™ Matrix (Methode 1)
- b) Biorad Aqua Genomic Tissue Kit (Methode 2)
- c) Qiagen DNeasy Tissue Kit (Methode 3)

3.3.1.1. DNA-Extraktion

Für die Durchführung der DNA-Extraktion wurden diejenigen Kits verwendet, welche im Vorversuch als am meisten geeignet befunden wurden. Die Durchführung ist in Kap. 3.2.1.1. aufgeführt. Die Lagerung der aufgereinigten DNA erfolgte bei -20 °C wie in Kap. 3.2.1.3. beschrieben. Die Behandlung der Positivkontrolle entspricht der in Kap. 3.2.1.2. beschriebenen Methode.

3.3.1.2. PCR-Protokolle

Für alle Proben erfolgte eine Untersuchung mittels Real-Time PCR mit SYBR Green und konventioneller PCR. Proben, welche in der auf SYBR Green basierenden Real-Time PCR-Methode ein positives Ergebnis ergaben, wurden zusätzlich mit der

Sonden Real-Time PCR-Methode untersucht. Die Negativkontrolle stellte der Mastermix ohne Zugabe des Templates dar.

Real-Time PCR mit SYBR-Green

Alle Proben wurden mit der Real-Time PCR-Methode mit SYBR Green als Fluoreszenzfarbstoff untersucht. Als Zielgen diente das bereits in Kap. 3.1.3. aufgeführte 170 bp große Fragment des *ail*-Genes, amplifiziert durch die Primer *ail1* und *ail2*. Die Durchführung der PCR ist in Kap. 3.1.3. beschrieben. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe eines PC-Programmes anhand der C_t -Werte und der Schmelzkurven.

Real-Time PCR mit einer TaqMan-Sonde (5' Nuclease PCR-Assay)

Bei den Proben, welche bei der Real-Time PCR-Methode mit SYBR Green ein positives Ergebnis erbrachten, erfolgte die Untersuchung mit der TaqMan Real-Time PCR-Methode. Verwendet wurden dieselben Primer *ail1* und *ail2* für das 170 bp-Fragment des *ail*-Genes, ebenso wurde dieselbe TaqMan-Sonde *ailP* verwendet. Die Durchführung der PCR entspricht der in Kapitel 3.1.4. aufgeführten Methode. Die Auswertung erfolgte anhand der C_t -Werte am PC.

Konventionelles PCR

Alle Proben wurden neben der Real-Time PCR mit SYBR Green mittels konventioneller Multiplex-PCR, wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben, untersucht und mittels Gelelektrophorese und abschließender Ethidiumbromidfärbung analysiert.

3.3.2. Identifizierung von *Y. enterocolitica*

Urea-Test

Die aus den verschiedenen Ausstrichen resultierenden verdächtigen Kolonien wurden nach der Kultivierung auf einer unspezifischen TSA-Platte zur ersten Differenzierung auf den Abbau von Harnstoff untersucht. Dabei kommt es zu einer alkalischen Reaktion, die durch Farbumschlag des im Harnstoff-Pepton-Schrägagar nach Christensen enthaltenen pH-Indikators nachgewiesen werden kann. Dazu

wurde der Schrägagar mit einer Kolonie beimpft und bei +30 °C für 24 h bebrütet. Bei einer positiven Reaktion kommt es durch die beschriebene Alkalisierung des Mediums zu einem Farbumschlag nach rosa. In diesem Fall erfolgte die weitere Untersuchung mit dem spezifischen API 20E-Test.

API 20E

Die weitere Untersuchung von Urease-positiven Keimen erfolgte zur Identifizierung mit dem API 20E-Test. Dazu wurden 3-5 Einzelkolonien in sterilem Wasser gelöst. Anschließend wurden die Röhren des Teststreifens nach Anleitung mit der Bakteriensuspension befüllt, zum Teil zur anaeroben Bebrütung zusätzlich mit Paraffinöl überschichtet. Die Ablesung gemäß Tabelle erfolgte nach einer Bebrütung für 24 h bei 30 °C, bei einigen Kammern nach Zugabe bestimmter Reagenzien.

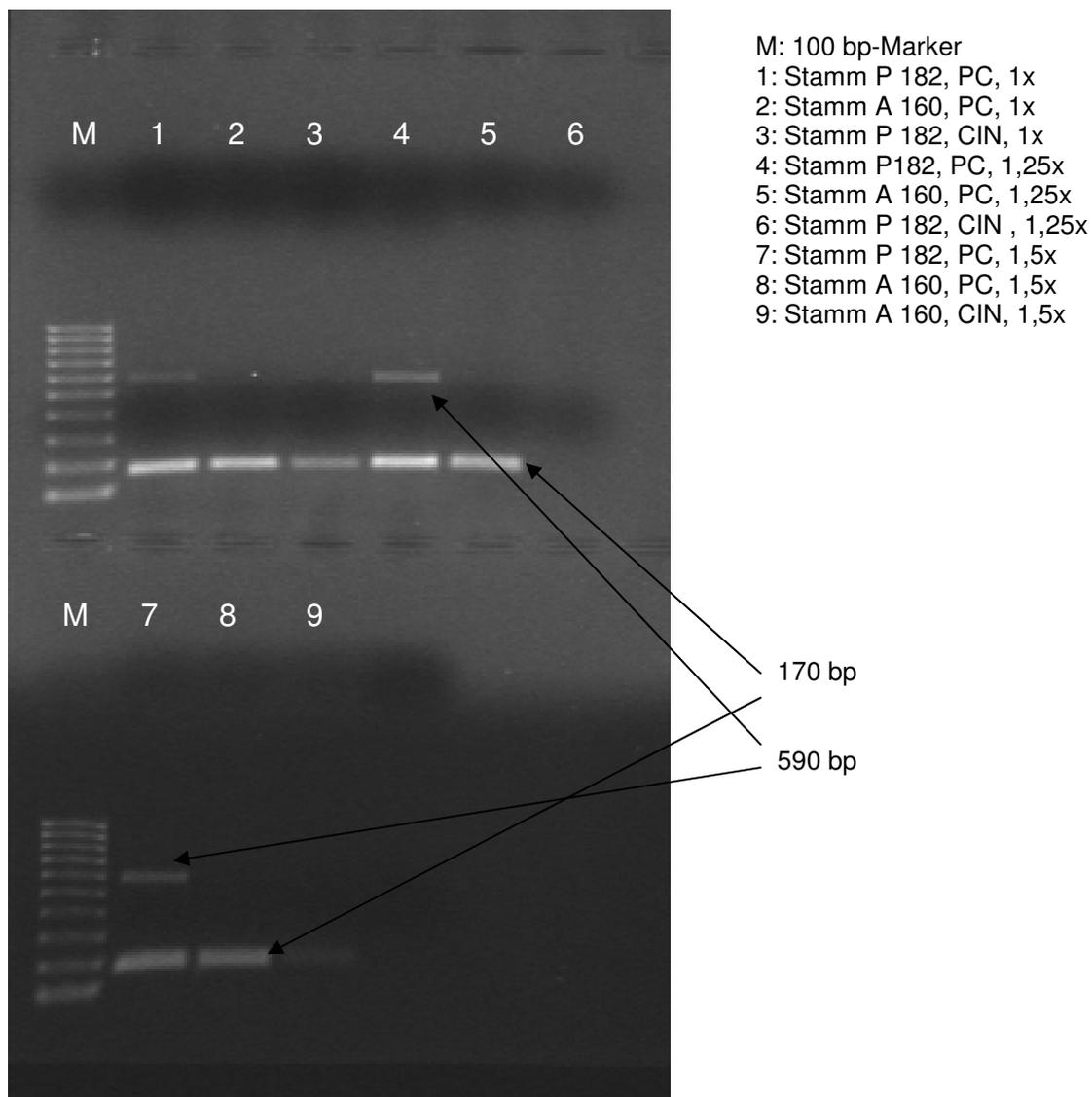
ERGEBNISSE

1. Vorversuche

1.1. Ermittlung der idealen Mastermix- und Primer-Konzentration

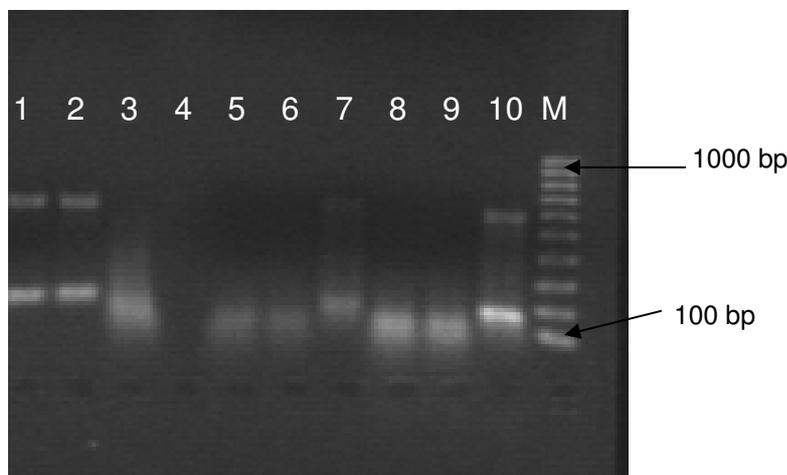
Um die beste Mastermix-Konzentration zu ermitteln, wurde ein konventioneller PCR-Lauf, mit Nachweis des *ail*- bzw. *virF*-Genes, durchgeführt. Wie in Abbildung 14 ersichtlich, war die *ail*-Bande bei einer 1-fachen (1x)-Mastermix-Konzentration und Anzucht auf Plate Count-Agar am deutlichsten sichtbar, das *virF*-Gen bei einer 1,25x-Mastermix-Konzentration.

Abbildung 14: PCR zur Ermittlung der idealen Mastermix-Konzentration



In einer weiteren konventionellen PCR wurde die Primer-Konzentration variiert. Als Template dienten auf PC- und CIN-Agar jeweils für 24- bzw. 48 h bei 30 °C bebrütete *Y. enterocolitica* des Bioserotyps 4/O:3. Eingesetzt wurden folgende Primer-Konzentrationen: 0,1 µM, 0,2 µM und 0,3 µM. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt. Die deutlichste Bande, sowohl für das *ail*-, als auch für das *virF*-Gen, konnte bei einer Konzentration von 0,2 µM nach 24 und 48 h Bebrütung auf PC-Agar erzielt werden. Bei der Bebrütung auf PC-Agar für 48 h und einer Primer-Konzentration von 0,3 µM war ebenfalls eine *ail*- und *virF*-typische Bande erkennbar.

Abbildung 15: Ermittlung der idealen Primer-Konzentration



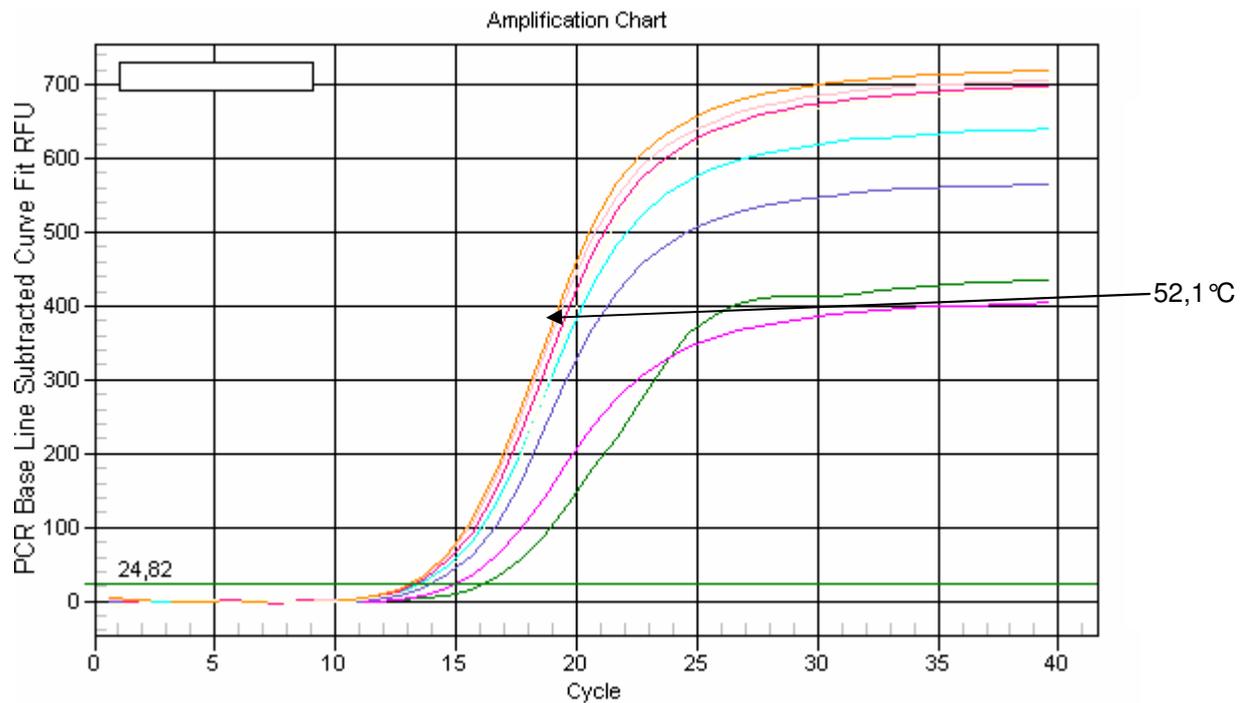
- 1: PC-Agar 24 h, 0,2 µM
- 2: PC-Agar 48 h, 0,2 µM
- 3: CIN-Agar 24 h, 0,2 µM
- 4: CIN-Agar 48 h, 0,2 µM
- 5: CIN-Agar 48 h, 0,1 µM
- 6: CIN-Agar 24 h, 0,1 µM
- 7: PC-Agar 48 h, 0,1 µM
- 8: CIN-Agar 48 h, 0,3 µM
- 9: CIN-Agar 24 h, 0,3 µM
- 10: PC-Agar 48 h, 0,3 µM
- M: 100 bp-Marker

1.2. Ermittlung der idealen Annealing-Temperatur

In einer Real-Time PCR wurde die Annealing-Temperatur über eine Spanne von 5 °C (55-60 °C) bzw. 10 °C (50-60 °C) variiert. Bei der SYBR Green PCR liegt die optimale Temperatur für das *ail*-Gen bei 51-52 °C, für das *virF*-Gen bei 56-57 °C. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 16 und 17 dargestellt. Wie in Abbildung 18

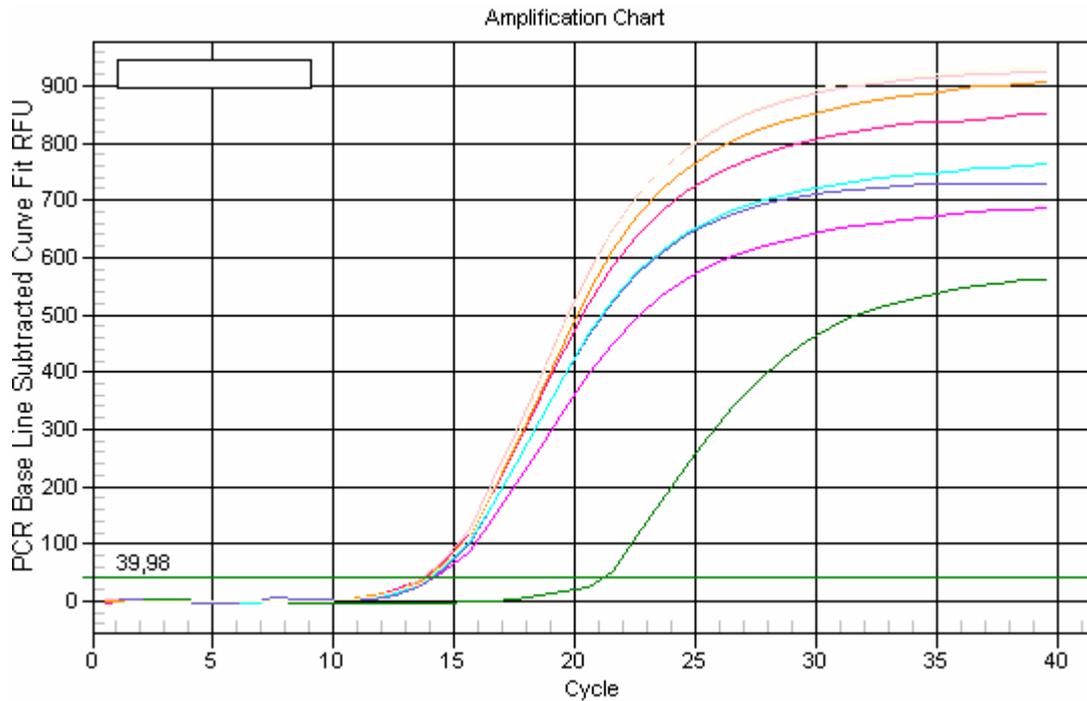
dargestellt, erwies sich für die Real-Time PCR mit einer TaqMan-Sonde eine Annealing-Temperatur von 52°C als optimal.

Abbildung 16: Gradient von 50-60°C für die *ail*-Primer in der Real-Time PCR mit SYBR Green.



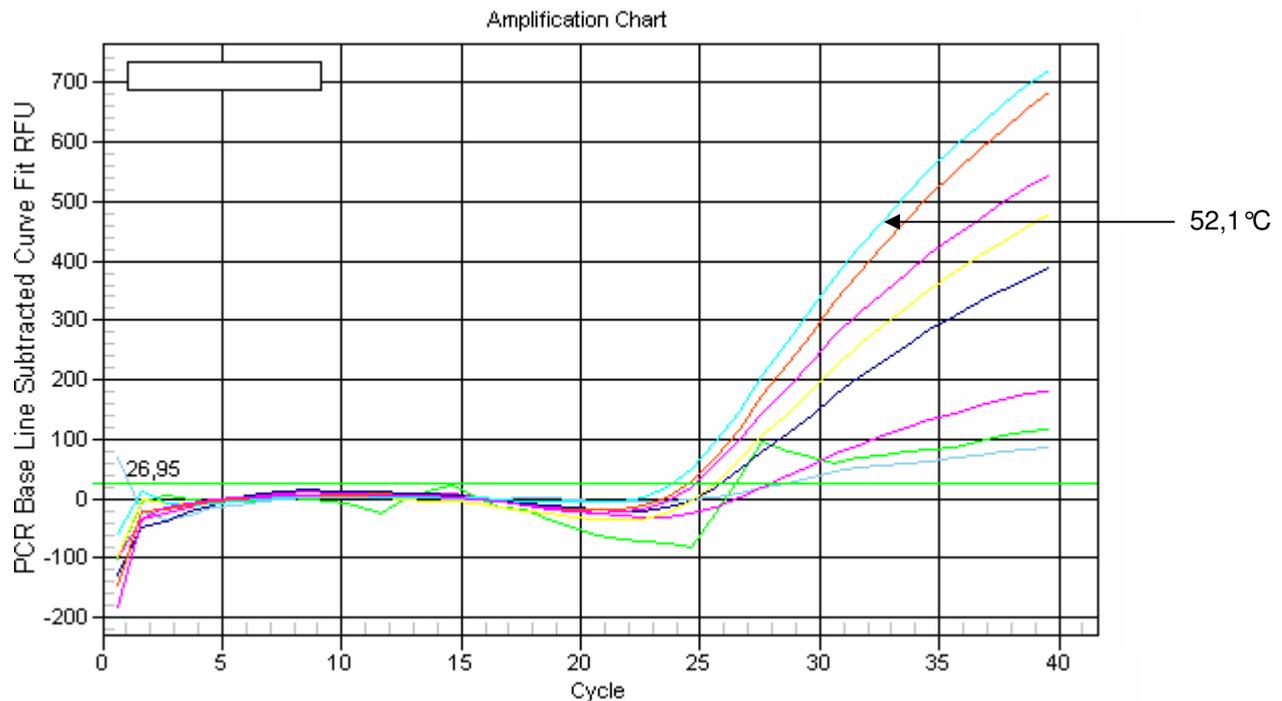
Temperatur	C_t -Wert
60,0°C	16,2
59,5°C	15,1
58,3°C	14,0
56,4°C	13,6
53,9°C	13,4
52,1°C	13,1
50,8°C	13,2
50,0°C	13,8

Abbildung 17: Gradient von 55-60°C für die *virF*-Primer in der Real-Time PCR mit SYBR Green.



Temperatur	C_t -Wert
60,0°C	21,1
59,8°C	14,1
59,2°C	14,1
58,3°C	13,9
57,0°C	13,7
56,1°C	13,7
55,5°C	13,8
55,0°C	13,9

Abbildung 18: Gradient von 50-60 °C für die Real-Time PCR mit TaqMan-Sonde und Primer *ail*



Temperatur	C_t -Wert
60,0 °C	26,5
59,5 °C	28,6
58,3 °C	28,0
56,4 °C	25,9
53,9 °C	25,7
52,1 °C	23,9
50,8 °C	24,6
50,0 °C	24,8

2. Nachweis von *Y. enterocolitica* in artifiziell beimpften Hackfleischproben

Im zweiten Teil der Arbeit wurden *Y. enterocolitica*-negative Rinderhackfleischproben mit *Y. enterocolitica* des Bioserotyps 4/O:3 in drei verschiedenen Verdünnungsstufen beimpft. Die Untersuchung aller Proben erfolgte mittels PCR und Kultur. Insgesamt wurden vier solcher Impfversuche durchgeführt. Der kulturelle Nachweis erfolgte mittels Direktausstrich, KOH-Behandlung nach 24 h Anreicherung in TSB und 48 h-Anreicherung in ITC. Die in TSB angereicherten Proben dienten als Ausgangsmaterial für die PCR-Untersuchung. Um eine möglichst hohe Sensitivität

beim Nachweis von *Y. enterocolitica* in Fleisch zu erzielen, erfolgte die Probenaufbereitung bzw. DNA-Extraktion der beimpften Hackfleischproben mit sechs verschiedenen Verfahren. Zudem wurden die Ergebnisse von drei verschiedenen PCR-Methoden auf ihre Nachweisgrenze hin verglichen.

Mit Hilfe des Tropfplattenverfahrens im Doppelansatz wurde die Keimzahl der in BHI angereicherten Keime ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Berechnung der Keimzahl mittels Tropfplattenverfahren

Versuch	Berechnete Keimzahl (KbE/ml BHI)
1. Impfversuch	$3,4 \times 10^{10}$
2. Impfversuch	8×10^{10}
3. Impfversuch	$1,8 \times 10^9$
4. Impfversuch	$1,5 \times 10^9$

BHI Brain Heart Infusion

Das in TSB eingewogene und zerkleinerte Hackfleisch (jeweils 10 g) wurde mit 1 ml der BHI-Bakteriensuspension aus drei verschiedenen Verdünnungsstufen beimpft. Die Beimpfung erfolgte beim 1. Impfversuch mit den Verdünnungsstufen 10^{-7} , 10^{-6} und 10^{-5} , in den folgenden Impfversuchen mit den Verdünnungsstufen 10^{-8} , 10^{-7} und 10^{-6} . Eine Probe wurde als Negativkontrolle jeweils nicht beimpft. Anhand der berechneten Keimzahl konnte die Keimzahl in den beimpften Hackfleischproben ermittelt werden und somit die KbE/10 g Hackfleischprobe.

2.1. Nachweis von *Y. enterocolitica* mittels PCR

Nach 24h-Anreicherung in TSB erfolgte die Aufreinigung der Proben mit sechs verschiedenen DNA-Extraktionskits um diejenigen Methoden zu ermitteln, die sich am besten hinsichtlich Dauer, Durchführbarkeit und Sensitivität eignen. Anschließend wurden die Proben mit einer Real-Time PCR-Methode mit SYBR Green als Fluoreszenzfarbstoff und einem TaqMan Real-Time PCR-Assay, sowie mit der konventionellen PCR untersucht. Mit allen drei PCR-Methoden konnten bereits ab der Impfmenge von 10 KbE/10 g Hackfleisch, und anschließender Anreicherung für 24 h in TSB, *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden.

2.1.1. Vergleich der verschiedenen Aufreinigungsmethoden

Folgende Aufreinigungsmethoden kamen zum Einsatz:

Methode A Pronase-Behandlung

Methode B Biorad InstaGene™ Matrix

Methode C Biorad Genomic Tissue Kit

Methode D Qiagen DNeasy Tissue Kit

Methode E Peqlab® E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini

Methode F Wizard® Magnetic DNA Purification System for food; Promega

Der Arbeitsaufwand war bei der Methode A sehr gering. Auch die Aufreinigung mit der Methode B benötigte nur wenig Zeit und war vergleichsweise einfach in der Durchführung. Die Methode A benötigte insgesamt ca. 1 h, wobei 40 min auf reine Inkubationszeit entfielen. Während dieser Zeit konnten andere Arbeiten durchgeführt werden. Die reine Arbeitszeit war mit ca. 15 min gering. Bei Anwendung der Methode B lag nach ca. 40 min die aufgereinigte DNA vor. Auch hier war die Arbeitszeit mit ca. 15 min sehr kurz. Durch die wenigen Präparationsschritte war bei diesen beiden Methoden die Kontaminationsgefahr sehr niedrig.

Die Aufreinigung mit der Methode C dauerte insgesamt ca. 2 h, wobei hiervon 1 h auf Inkubationszeit und 10-15 min auf Trockenzeit entfallen. Die reine Arbeitszeit betrug ca. 30 min. Durch das häufige Öffnen der Reaktionsgefäße ist die Kontaminationsgefahr relativ hoch. Zusätzliche, nicht im Kit enthaltene Reagenzien waren 100 %iges Isopropanol und 70 %iges Ethanol.

Die Methode D und E waren in der Durchführung fast identisch, wobei die Methode D weniger Reagenzien benötigte und die Reaktionsgefäße mit den Säulen konnten während der Zentrifugation geschlossen werden. Die Zentrifugation der Säulen von Peqlab erfolgte in offenem Zustand, was die Kontaminationsgefahr während des Zentrifugationsschrittes erhöht. Insgesamt dauerte die Extraktion ca. 2 h, auch hier entfielen 70 min auf die Inkubation. Die Arbeitszeit betrug demnach ca. 45 min. Als zusätzliche Reagenzien, die nicht im Kit enthalten waren, kam in beiden Fällen 96-100 %iges Ethanol hinzu.

Die Aufreinigung mit der Methode F war sehr unpraktikabel in der Durchführung. Außerdem benötigte sie mit 1,5 h auch relativ viel Zeit, wobei in den jeweils kurzen Inkubationsschritten von max. 10 min bzw. der 10-minütigen Zentrifugation nur kurze andere Arbeiten verrichtet werden konnten. Zudem konnten maximal zwei Proben parallel behandelt werden. Dadurch erhöhte sich bei vielen Proben die Aufreinigungszeit erheblich. Durch das häufige Öffnen und das Stehen lassen in geöffnetem Zustand war die Kontaminationsgefahr recht hoch. Die beiliegende Anleitung war teilweise unklar. Als zusätzliche Reagenzien wurden 100 %iges Isopropanol, 70 %iges Ethanol und Nuclease Free Water benötigt.

2.1.2. Real-Time PCR mit SYBR Green

Nach der Aufreinigung mit den Methoden B, C, D und E konnten in allen Proben *ail*-positive *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden. Die schlechtesten Ergebnisse wurden mit der Methode F erzielt. Auch wiesen drei der nicht-beimpften Proben nach Aufreinigung mit dieser Methode ein positives Ergebnis auf. In einer dieser nicht-beimpften Proben, konnte auch nach Aufreinigung mit der Methode E das *ail*-Gen nachgewiesen werden. Die niedrigsten C_t -Werte konnten in der Regel mit der Methode C erzielt werden, abgesehen von den Keimzahlen 10 bzw. 10^3 KbE/10 g bei welchen sich nach Aufreinigung mit der Methode E bzw. B noch niedrigere C_t -Werte ergaben. Am höchsten waren die C_t -Werte in der Regel nach Einsatz der Methoden A oder F (Tabelle 17). Die Detektion des *virF*-Genes gelang nur bei den höheren Keimzahlen ab 10^3 KbE/10 g Hackfleisch und nachfolgender Anreicherung, und nur nach Anwendung der Methoden C, D und E. Hier ergaben sich nach Aufreinigung mit der Methode C die niedrigsten C_t -Werte (Tabelle 18). In Abbildung 19 ist beispielhaft das Ergebnis der Real-Time PCR mit SYBR Green nach Aufreinigung mit dem Biorad Genomic DNA Kit dargestellt.

Tabelle 17: Anzahl und niedrigste C_t -Werte *ail*-positiver Proben nach Aufreinigung mit 6 verschiedenen Methoden und einer Real-Time PCR mit SYBR Green

KZ/10 g HF	Anzahl	Methode											
		A		B		C		D		E		F	
		<i>ail</i>	C_t										
10	2	2	32,5	2	28,9	2	28,8	2	30,3	2	28,5	1	34,8
10 ²	2	2	30,2	2	25,9	2	23,3	2	28,6	2	27,4	1	31,4
10 ³	4	3	27,5	4	22,1	4	22,5	4	24,1	4	23,5	4	27,4
10 ⁴	2	2	25	2	27,1	2	21,6	2	23,3	2	23,6	1	25,4
10 ⁵	2	2	23,1	2	20,5	2	19,6	2	22	2	22,6	2	26,3
Neg	4	0	-	0	-	0	-	0	-	1	34,7	3	31,5

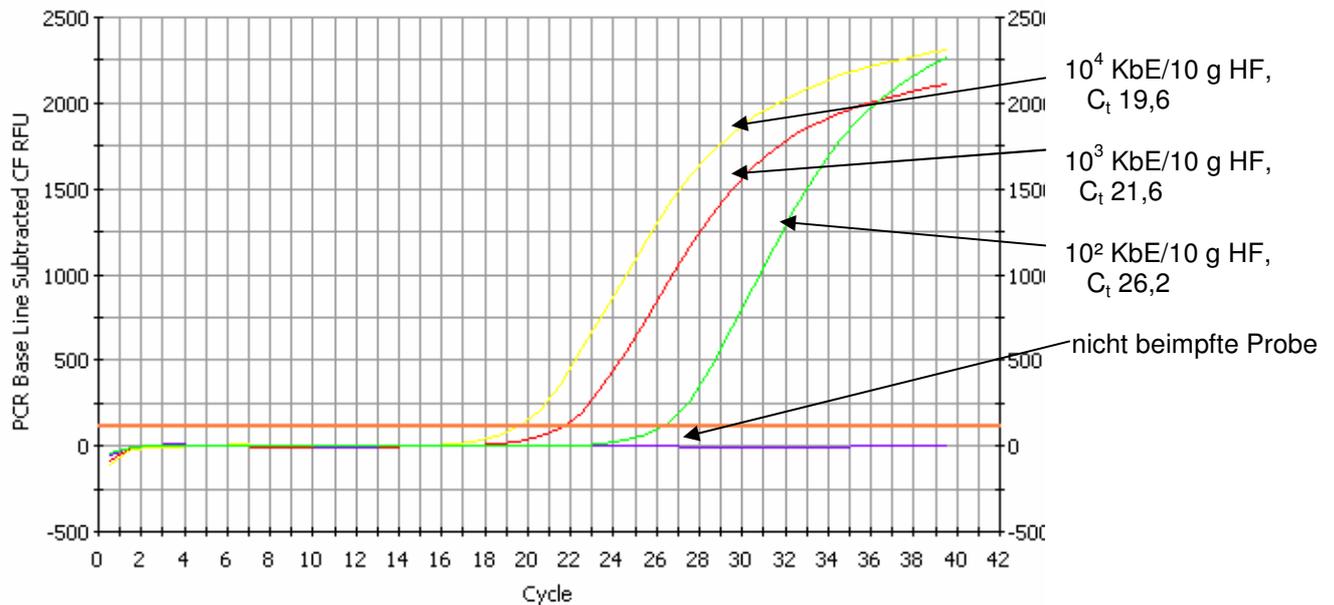
KZ	Keimzahl
HF	Hachfleisch
Neg	nicht beimpfte Probe
Methode A	Pronase-Behandlung
Methode B	Biorad InstaGene™ Matrix
Methode C	Biorad Genomic Tissue Kit
Methode D	Qiagen DNeasy Tissue Kit
Methode E	Peqlab® E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini
Methode F	Wizard® Magnetic DNA Purification System for food; Promega

Tabelle 18: Anzahl und niedrigste C_t -Werte *virF*-positiver Proben nach Aufreinigung mit 6 verschiedenen Methoden und einer Real-Time PCR mit SYBR Green

KZ/10 g HF	Anzahl	Methode											
		A		B		C		D		E		F	
		<i>virF</i>	C_t										
10	2	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
10 ²	2	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
10 ³	4	0	-	0	-	3	28,9	3	34,7	2	31,5	0	-
10 ⁴	2	0	-	0	-	1	32,2	0	-	0	-	0	-
10 ⁵	2	0	-	0	-	1	29,1	1	29,8	0	-	0	-
Neg	4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-

KZ	Keimzahl
HF	Hackfleisch
Neg	nicht beimpfte Probe
Methode A	Pronase-Behandlung
Methode B	Biorad InstaGene™ Matrix
Methode C	Biorad Genomic Tissue Kit
Methode D	Qiagen DNeasy Tissue Kit
Methode E	Peqlab® E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini
Methode F	Wizard® Magnetic DNA Purification System for food; Promega

Abbildung 19: Real-Time PCR (SYBR Green) des *ail*-Genes von mit drei verschiedenen Keimzahlen (10^2 , 10^3 und 10^4 KbE/10 g) beimpften Hackfleischproben, sowie eine nicht-beimpfte Probe, nach 24 h-Anreicherung in TSB und Aufreinigung mit Methode C (Biorad Genomic Tissue Kit)



2.1.3. Real-Time PCR mit TaqMan Sonde

Alle Proben wiesen nach Aufreinigung mit den Methoden B, C, D und E ein positives Ergebnis auf (Tabelle 19). Der Nachweis *ail*-positiver *Y. enterocolitica* gelang mit der Methode F nur bei Proben ab einer Impfmenge von 10^3 KbE/10 g. Dagegen ergab je eine Negativkontrolle, aber nicht dieselbe Probe, sowohl nach Anwendung der Methoden E und F ein positives Ergebnis. In beiden Proben konnte auch mit der SYBR Green Real-Time PCR das *ail*-Gen nachgewiesen werden. Die niedrigsten C_t -Werte konnten bei Keimzahlen von $10 \cdot 10^3$ KbE/10 g mit der Methode B erreicht werden, bei 10^4 und 10^5 KbE/10 g mit der Methode C.

Tabelle 19: Anzahl und niedrigste C_t -Werte *ail*-positiver Proben nach Aufreinigung mit 6 verschiedenen Methoden und einer Real-Time PCR mit TaqMan-Sonde

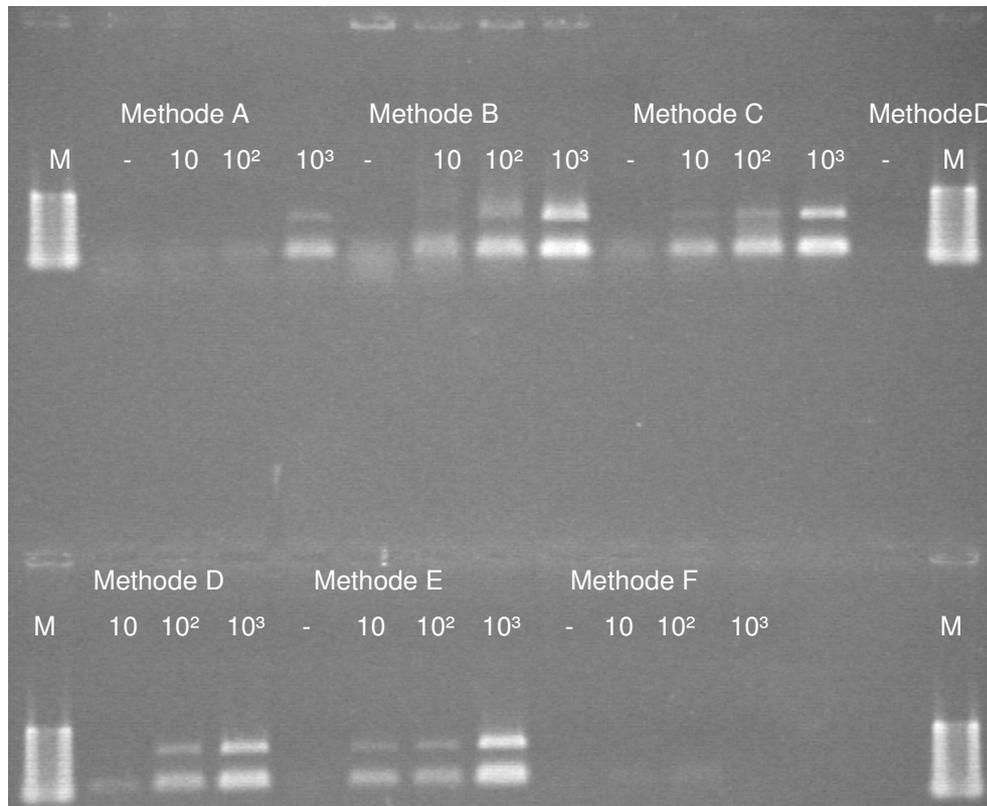
KZ/10 g HF	Anzahl	A		B		C		D		E		F	
		<i>ail</i>	C_t										
10	2	2	33,5	2	31,2	2	31,5	2	33,7	2	33,2	0	-
10 ²	2	1	33,1	2	28,3	2	29,7	2	31,7	2	32,8	0	-
10 ³	4	3	29,9	4	25,2	4	26,8	4	26,9	4	27,9	3	28,7
10 ⁴	2	2	25,4	2	26,4	2	25,2	2	27,9	2	27	1	33,9
10 ⁵	2	2	27,2	2	24,5	2	23	2	23	2	24,5	1	27
Neg	4	0	-	0	-	0	-	0	-	1	36,6	1	37,3

KZ	Keimzahl
HF	Hackfleisch
Neg	nicht beimpfte Probe
Methode A	Pronase-Behandlung
Methode B	Biorad InstaGene™ Matrix
Methode C	Biorad Genomic Tissue Kit
Methode D	Qiagen DNeasy Tissue Kit
Methode E	Peqlab® E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini
Methode F	Wizard® Magnetic DNA Purification System for food; Promega

2.1.4. Konventionelle PCR

Wie in Tabelle 20 dargestellt konnte mit den nach Methode B, C, D und E aufgereinigten Proben bei allen Keimzahlen (10 bis 10⁵ KbE/10 g) *ail*-positive *Y. enterocolitica* detektiert werden. Die schlechteste Nachweisrate wurde mit der Methode F erzielt, hier konnte erst ab einer beimpften Hackfleischprobe mit 10³ KbE/10 g das *ail*-Gen detektiert werden und bei keiner Probe konnte das *virF*-Gen amplifiziert werden. In Abbildung 20 ist das Gel der PCR vom 3. Impfversuch dargestellt. Deutlich zu sehen ist die zunehmende Bandenstärke der *ail*- und *virF*-Fragmente bei ansteigenden Keimzahlen. Ebenso ist erkennbar, dass nach Aufreinigung mit der Methode F keine Amplifikation des *ail*- oder *virF*-Genes stattgefunden hat.

Abbildung 20: Konventionelle PCR von mit drei verschiedenen Keimzahlen (10 , 10^2 und 10^3 KbE/10 g) beimpften Hackfleischproben, sowie eine nicht-beimpfte Probe, nach 24 h-Anreicherung in TSB und Aufreinigung mit 6 verschiedenen Methoden



M	100 bp-Marker
-	nicht beimpfte Probe
10, 10 ² , 10 ³	Keimzahl/10 g Hackfleisch vor der Anreicherung
Methode A	Pronase-Behandlung
Methode B	Biorad InstaGene™ Matrix
Methode C	Biorad Genomic Tissue Kit
Methode D	Qiagen DNeasy Tissue Kit
Methode E	Peqlab® E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini
Methode F	Wizard® Magnetic DNA Purification System for food; Promega

Tabelle 20: Anzahl positiver Ergebnisse für das *ail*- und *virF*-Gen nach Aufreinigung mit 6 verschiedenen Methoden und einer konventionellen PCR

KZ/10 g HF	Anzahl	Methode											
		A		B		C		D		E		F	
		<i>ail</i>	<i>virF</i>										
10	2	2	0	2	2	2	2	2	1	2	1	0	0
10 ²	2	2	0	2	2	2	1	2	2	2	2	0	0
10 ³	4	3	2	4	3	4	4	4	4	4	4	2	0
10 ⁴	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	0
10 ⁵	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	0
Neg	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

KZ	Keimzahl
HF	Hackfleisch
Neg	nicht beimpfte Probe
Methode A	Pronase-Behandlung
Methode B	Biorad InstaGene™ Matrix
Methode C	Biorad Genomic Tissue Kit
Methode D	Qiagen DNeasy Tissue Kit
Methode E	Peqlab® E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini
Methode F	Wizard® Magnetic DNA Purification System for food; Promega

2.2. Nachweis von *Y. enterocolitica* mittels Kultur

Die Proben in TSB wurden auf CIN-Agar ausgestrichen und nach 24 h Bebrütung auf *Y. enterocolitica*-typische Kolonien hin untersucht. Ebenso wurden die Proben nach Übernachtenreicherung in TSB und anschließender KOH-Behandlung, sowie nach 48 h Anreicherung in ITC, auf CIN-Agar ausgestrichen und auf *Y. enterocolitica*-typische Kolonien untersucht.

Bei den nicht beimpften Proben, sowie bei Keimzahlen bis 10² KbE/10 g Hackfleisch, konnten in keinem der Versuchsdurchgänge *Y. enterocolitica*-typische Kolonien gefunden werden. Wie in Tabelle 21 dargestellt konnte bei den Keimzahlen von 10⁴ und 10⁵ KbE/10 g beim Direktausstrich und bei der 48 h-Anreicherung in ITC in allen Proben *Y. enterocolitica*-typische Kolonien identifiziert werden.

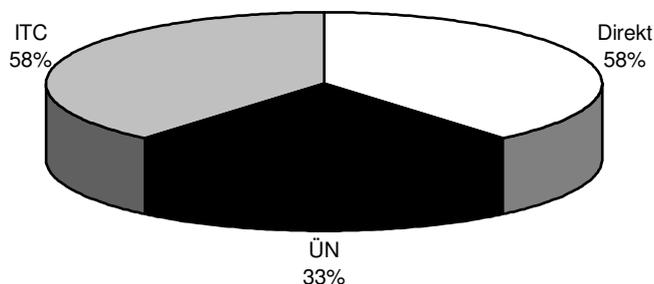
Tabelle 21: Kultureller Nachweis von *Y. enterocolitica* nach Direktausstrich und zwei verschiedenen Anreicherungen auf CIN

Keimzahl/ 10 g Hackfleisch	Anzahl Proben	Anzahl pos.		
		Direkt	ÜN + KOH	ITC
10	2	0	0	0
10 ²	2	0	0	0
10 ³	4	3	2	3
10 ⁴	2	2	1	2
10 ⁵	2	2	1	2
neg	4	0	0	0

ÜN + KOH Übernachtenreicherung in TSB und anschließende KOH-Behandlung
ITC Selektivanreicherung in ITC
neg nicht beimpfte Probe

Insgesamt war die Nachweisrate beim Direktausstrich und bei der Anreicherung in ITC am höchsten, das schlechteste Ergebnis wurde mit der Übernachtenreicherung in TSB und anschließender KOH-Behandlung erzielt (Abbildung 21).

Abbildung 21: Nachweishäufigkeit mittels drei verschiedener kultureller Methoden auf CIN-Agar



Direkt Direktausstrich auf CIN-Agar
ÜN Übernachtenreicherung in TSB und anschließende KOH-Behandlung
ITC Selektivanreicherung in ITC

3. Nachweis von *Y. enterocolitica* in Schweinefleischproben

Es wurden 150 Fleischproben, welche Schwein enthielten, auf *Y. enterocolitica* untersucht. Die Untersuchung erfolgte zum einen mittels PCR, zum anderen mittels kulturellen Methoden.

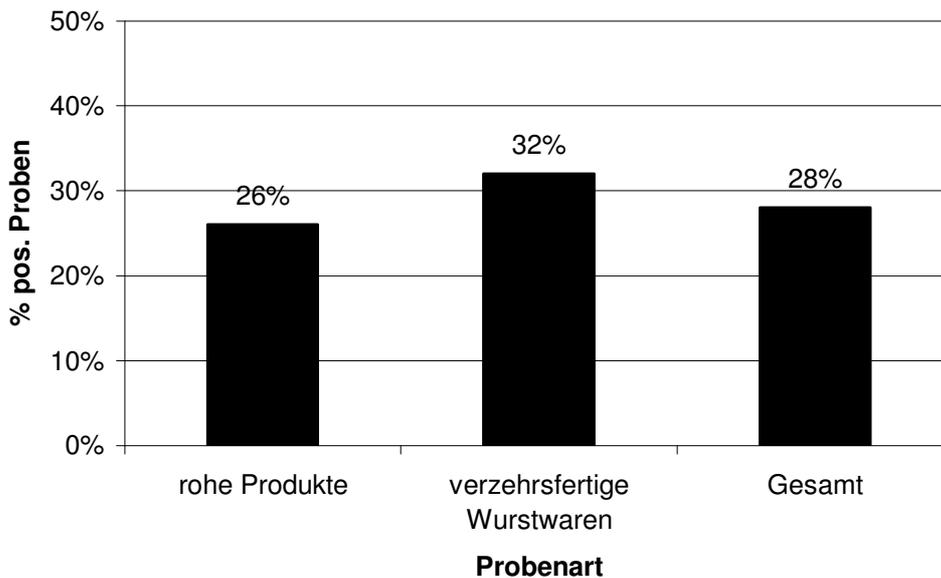
3.1. Nachweis von *Y. enterocolitica* mittels PCR

3.1.1. Allgemein

Mit allen drei PCR-Methoden (sowohl mit beiden Real-Time PCR-Methoden, als auch mit der konventionellen PCR) waren insgesamt 17 Proben *ail*-positiv, das sind 11 % aller Proben. Davon entfielen 10 % auf rohe Produkte (jeweils 10 % der Hackfleischproben und Schweinefleischstücke), und 14 % auf verzehrfertige Wurstwaren. Wenn sämtliche Proben, welche nur mit mindestens einer der drei PCR-Methoden ein positives Ergebnis ergaben, als *Y. enterocolitica*-positiv betrachtet, konnten in 43 der Proben (29 %) *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden (Tabelle 22).

3.1.2. Real-Time PCR mit SYBR Green

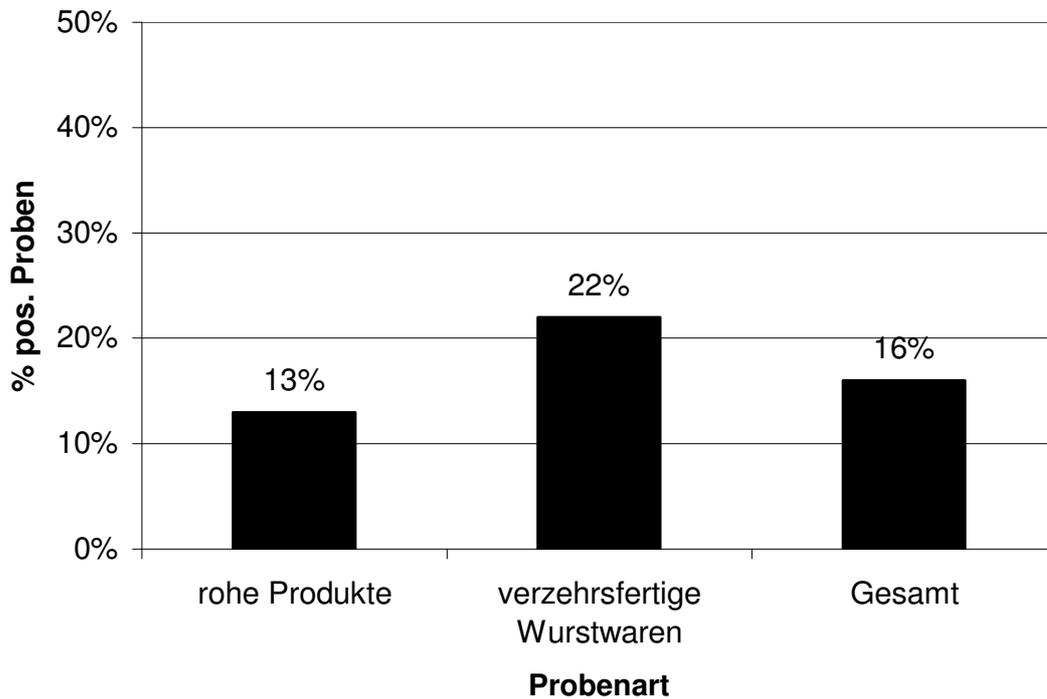
Bei Anwendung der Real-Time PCR mit SYBR Green konnte bei 42 Proben (28 %) *ail*-positive *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden (Abbildung 22). Davon entfielen 26 auf rohe Produkte und 16 auf verzehrfertige Wurstwaren. Damit waren 26 % der rohen Produkte und 32 % der Wurstwaren mit dieser Real-Time PCR positiv (Tabelle 22).

Abbildung 22: *ail*-positive Proben (%) mit der SYBR Green Real-Time PCR

Die C_t -Werte schwankten insgesamt zwischen 24,4 und 37,5, wobei die rohen Produkte meist niedrigere Werte (24,4-35,7) aufzeigten als die verzehrsfertigen Produkte (28,8-37,5).

3.1.3. Real-Time PCR mit TaqMan-Sonde

Bei der Untersuchung der Proben mit der *ail*-spezifischen TaqMan-Sonde konnten bei 23 der Proben (15 %) *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 und Tabelle 22 dargestellt. Drei Proben (2 Schweinefleischstücke, 1 gekochte Probe) waren mit der konventionellen PCR positiv, konnten aber mit der Sonden-PCR nicht detektiert werden. In sechs Proben (2 Hackfleisch-Proben, 4 verzehrsfertige Wurstwaren) konnten mit Hilfe der Sonden-PCR *Y. enterocolitica* detektiert werden, mit der konventionellen PCR dagegen nicht.

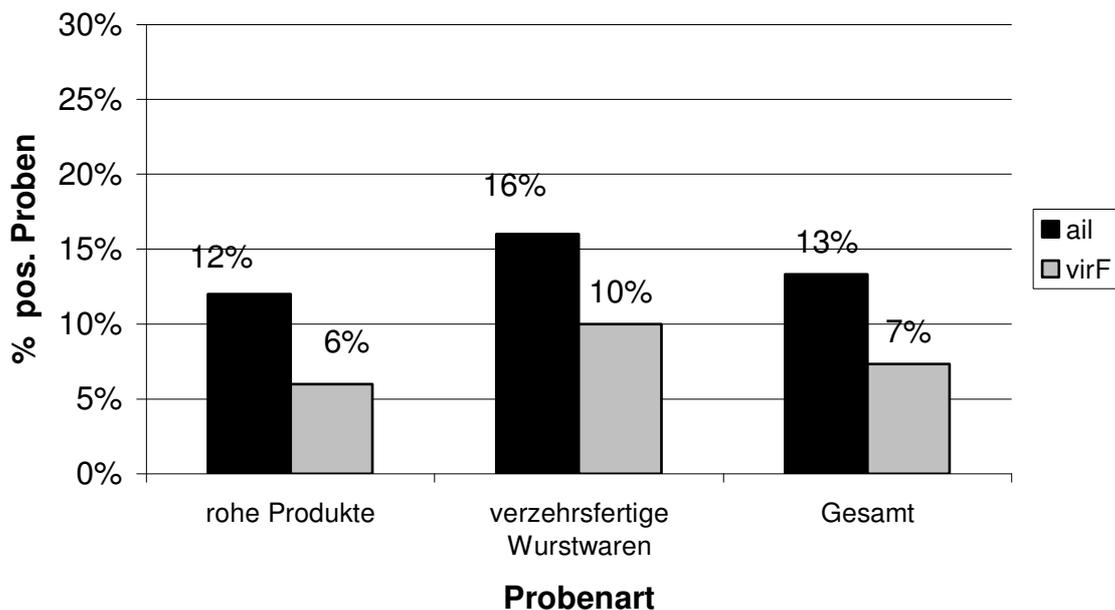
Abbildung 23: *ail*-positive (%) Proben mit der TaqMan Real-Time PCR

In der Regel waren die Proben mit dem Sondensystem positiv, welche bei der SYBR Green Real-Time PCR-Methode einen C_t -Wert < 33 ergaben.

Die C_t -Werte schwankten zwischen 29,9 und 37,5. Auch hier waren sie bei den rohen Produkten durchschnittlich niedriger (29,9-37,3) als bei den verzehrsfertigen Produkten (32,1-37,5).

3.1.4. Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR ergab bei insg. 20 Proben (13 %) eine Bande bei 170 bp (*ail*) und bei 11 Proben (7 %) eine *virF*-typische Bande bei 591 bp (Abbildung 24 und Tabelle 22). Jede der *virF*-positiven Proben war gleichzeitig auch *ail*-positiv. Eine Probe (Schweinefleisch-Stücke, Probe Nr. 61) war nur mit der konventionellen PCR positiv (nur *ail*), mit der Real-Time PCR aber negativ.

Abbildung 24: *ail*- bzw. *virF* positive Proben (%) mit der konventionellen PCR

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der kulturellen Untersuchung und der PCR-Methoden zusammengefasst.

Tabelle 22: Anzahl (%) von *ail*-positiven *Y. enterocolitica*-Proben bei Untersuchung von 150 Fleischproben mit verschiedenen Methoden

Probenart	Anzahl	Kultur			Konv. PCR (%)	Real-Time PCR				Alle Methoden (%)		
		D	ÜN	ITC		SYBR (%)	Sonde (%)					
Roh	100	0	0	0	12	(12)	26	(26)	12	(12)	27	(27)
Hackfleisch	70	0	0	0	7	(10)	17	(24)	9	(13)	17	(24)
Muskelfleisch	30	0	0	0	5	(17)	9	(30)	3	(10)	10	(33)
Verzehrfertig	50	0	0	0	8	(16)	16	(32)	11	(22)	16	(32)
Gesamt	150	0	0	0	20	(13)	42	(28)	23	(15)	43	(29)

D Direktausstrich

ÜN Übernachtenreicherung und anschließende KOH-Behandlung

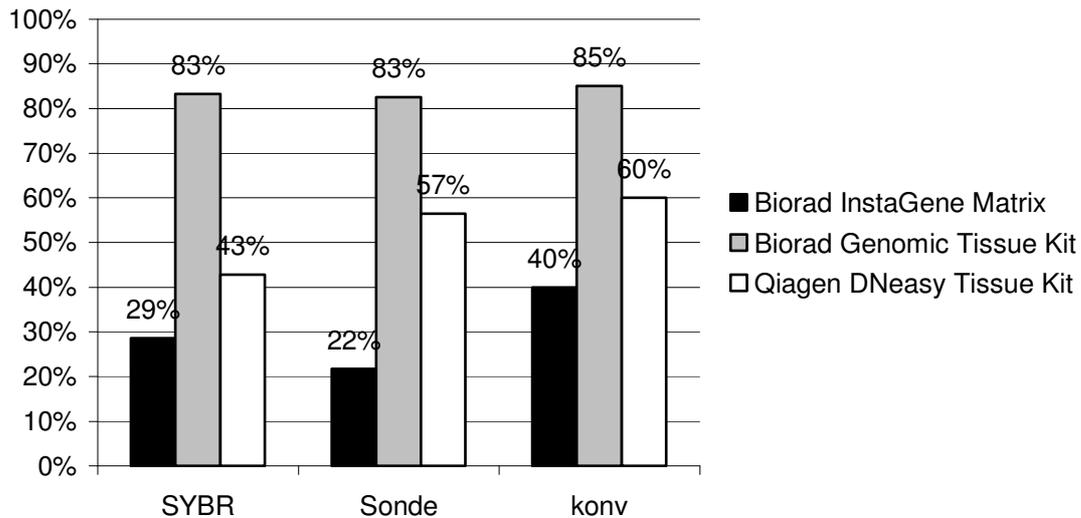
3.1.5. Vergleich der verschiedenen Aufreinigungsmethoden

Die besten Ergebnisse konnten nach Aufreinigung mit der Methode 2 erzielt werden.

Beim Vergleich der verschiedenen PCR-Methoden, konnte bei allen Methoden mit der Methode 2 die meisten positiven Ergebnisse erzielt werden. Mit dieser Methode

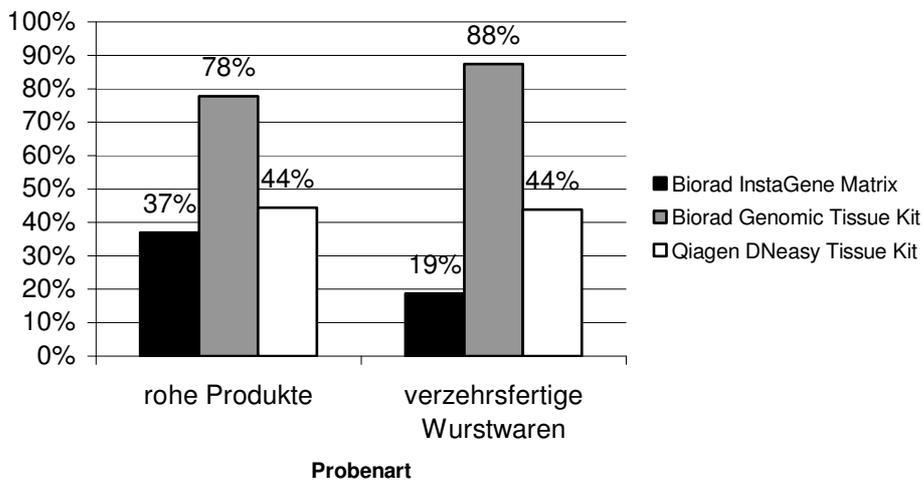
konnte bei allen drei PCR-Methoden > 80 % der positiven Proben erfolgreich aufgereinigt werden (Abbildung 25).

Abbildung 25: Anteil der verschiedenen Aufreinigungsmethoden an positiven Proben, getrennt nach den verschiedenen PCR-Methoden. Als 100 % gelten sämtliche Proben, die mit einer der drei PCR-Methoden positiv waren



Beim Vergleich der verschiedenen Probenarten, konnten sowohl bei den rohen, als auch bei den verzehrfertigen Wurstwaren, mit der Methode 2 (Biorad Genomic Tissue Kit) die meisten der positiven Proben erfolgreich aufgereinigt werden (Abbildung 26).

Abbildung 26: Anteil der verschiedenen Aufreinigungsmethoden an mit einer der drei PCR-Methoden positiven rohen bzw. verzehrsfertigen Produkten



In Tabelle 23 sind die C_t -Werte der Real-Time PCR-Methoden, getrennt nach Aufreinigungsmethode, aufgelistet. Bei der Real-Time PCR mit SYBR Green schwankten die C_t -Werte zwischen 24,4 und 37,5. Die C_t -Werte der Real-Time PCR mit Sonde reichten von 29,9 bis 37,5. Die niedrigsten Werte wurden mit der Methode 2 erzielt.

Tabelle 23: C_t -Werte der Proben nach drei verschiedenen Aufreinigungsmethoden

PCR-Methode	Aufreinigungsmethode		
	1	2	3
SYBR Green	25,2-35	24,4-37,5	27,3-34,5
Sonde	29,9-36,8	29,9-37,3	32,1-37,5

- 1 InstaGene Matrix
- 2 Biorad Genomic Tissue Kit
- 3 Qiagen DNeasy Tissue Kit

3.2. Nachweis von *Y. enterocolitica* mittels Kultur

In den untersuchten rohen und erhitzten Schweinefleischproben konnten mittels kulturellen Nachweisverfahren keine *Y. enterocolitica* isoliert werden (Tabelle 22).

Bei 32 Fleischproben wuchsen auf CIN-Agar verdächtige Kolonien (dunkelviolett, $\emptyset < 1$ mm, heller Hof), welche aber alle Urease-negativ waren. Aus der Hackfleisch-Probe Nr. 138 konnten nach Anreicherung in TSB mit anschließender KOH-Behandlung Urease-positive Keime isoliert werden. Die verdächtigen Kolonien konnten mittels API 20E als *Y. kristensenii* identifiziert werden.

DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war, eine Real-Time PCR-Methode zum Nachweis von *Y. enterocolitica* in Schweinefleisch zu entwickeln. Da die Probenvorbereitung einen großen Einfluss auf das Ergebnis der PCR ausübt, wurden mehrere Extraktionsmethoden verglichen. Zudem wurden Schweinefleischproben aus dem Handel mittels Real-Time PCR und der dazugehörigen Probenvorbereitung auf pathogene *Y. enterocolitica* untersucht und mit kulturellen Nachweismethoden und einer konventionellen Multiplex-PCR-Methode verglichen.

1. Auswahl der Zielgene und der Sonde

Als Ziel-Sequenz wurde das *ail*-Gen ausgewählt, da dieses Gen nur in *Y. enterocolitica*-Stämmen vorkommt, welche pathogen für den Menschen sind (CARNIEL 1995, BOTTONE 1997). In apathogenen *Y. enterocolitica*-Stämmen wurde das *ail*-Gen bisher nicht gefunden. Allerdings ist eine Variante des Gens in *Y. pseudotuberculosis* vorhanden (MILLER et al. 1989). Es existieren bereits viele auf dem *ail*-Gen basierende konventionelle PCR-Methoden (KWAGA et al. 1992, NAKAJIMA et al. 1992, NCFA 1998, THISTED-LAMBERTZ et al. 2000, RAMESH et al. 2002), aber nur wenige TaqMan Real-Time PCR-Methoden, welche das *ail*-Gen von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln detektieren (JOURDAN et al. 2000, BOYAPALLE et al. 2001). Die hier verwendeten Primer wurden aus der von NAKAJIMA et al. (1992) entwickelten konventionellen Multiplex-PCR übernommen. Deshalb konnte auf Spezifitätsprüfungen verzichtet werden. Keine der von den Autoren untersuchten *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen ergab ein positives Ergebnis, weshalb die PCR als *Y. enterocolitica*-spezifisch gilt. Für alle drei PCR-Methoden wurden dieselben Primer verwendet. Die in diesen Versuchen amplifizierte Sequenz des *ail*-Genes ist 170 bp lang.

Als weitere Zielsequenz wurde das auf dem Plasmid lokalisierte *virF*-Gen gewählt, da nur Stämme, welche sowohl chromosomale, als auch auf dem Plasmid lokalisierte Virulenzgene besitzen, als vollständig virulent angesehen werden (GRANT et al. 1998). Es dient somit ebenfalls der Erkennung von pathogenen *Y. enterocolitica*, da nur diese Plasmid-positiv sind (HEESEMANN 1994). Allerdings können auch plasmidtragende *Y. pseudotuberculosis*-Stämme ein positives Ergebnis liefern

(HARNETT et al. 1996). Auch das Fragment des *virF*-Genes, welches durch die in diesen Versuchen verwendeten *virF*-Primer amplifiziert wird, ist in Plasmid-positiven *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen vorhanden (NAKAJIMA et al. 1992). Ein *virF*-positives, aber *ail*-negatives Ergebnis ist deshalb ein Hinweis auf *Y. pseudotuberculosis*. Dieser Fall ist aber in den eigenen Untersuchungen nie aufgetreten. Eine Real-Time PCR-Methode, welche das *virF*-Gen nachweist, existiert bisher noch nicht. Die in diesen Versuchen verwendeten und bei NAKAJIMA et al. (1992) für die konventionelle Multiplex-PCR-Methode beschriebenen Primer amplifizieren ein Fragment mit einer Länge von 591 bp. Nach DORAK (2006) sollte das amplifizierte Fragment bei einer Real-Time PCR nicht länger als 400 bp sein, ideal sind Produkte von 50-150 bp. Je kürzer das Fragment, desto effizienter ist die PCR und desto toleranter ist sie gegenüber den Reaktionsbedingungen. Aufgrund der Länge des in den Versuchen amplifizierten *virF*-Fragmentes gelang der Nachweis des *virF*-Genes bei der SYBR Green Real-Time PCR nur in seltenen Fällen und erst bei hohen Keimzahlen. Deshalb wurde auf den Nachweis des *virF*-Genes bei der Untersuchung der Schweinefleischproben im dritten Teil der Arbeit verzichtet. Auch der alleinige Nachweis des *ail*-Genes kennzeichnet einen pathogenen *Y. enterocolitica*-Stamm.

Zur weiteren Bestätigung der positiven Ergebnisse mit der SYBR Green Real-Time PCR wurde eine Real-Time PCR, basierend auf einer TaqMan-Sonde, entwickelt. Dabei erfolgt nur dann eine Fluoreszenzemission, wenn diese Sonde an die entsprechende Zielsequenz des *ail*-Genes bindet und von der Taq-Polymerase hydrolysiert wird. Somit ist nur ein Signal erkennbar, wenn das richtige Produkt gebildet wurde. Die Sonde wurde zu den bereits in der konventionellen PCR und in der SYBR Green Real-Time PCR verwendeten Primern *ail* 1 und 2 mit Hilfe des Programms "Beacon Designer" des iCyclers konstruiert (SCHEU). Es wurde ein Bereich ausgewählt, dessen Sequenz nur bei pathogenen *Y. enterocolitica* vorhanden ist, um ein falsch-positives Ergebnis bei der Bindung der Sonde an eine "falsche" Sequenz zu verhindern.

2. Vorversuche

Der erfolgreiche Einsatz einer PCR erfordert die Optimierung einiger Parameter, um ein möglichst sensitives Ergebnis zu erzielen. Dazu zählt die Menge der

verschiedenen Reagenzien, die Konzentration der verwendeten Primer sowie die Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur.

In der konventionellen Multiplex-PCR erwies sich für das *ail*-Gen die Mastermix-Konzentration von 1x als optimal. Hierbei wurden eine Magnesium-Konzentration von 1,5 mM und eine dNTP-Konzentration von jeweils 200 µM eingesetzt. Die Menge der Taq-Polymerase betrug 0,625 U. Dies entspricht der empfohlenen Menge des Herstellers. Auch andere Autoren (KAPPERUD et al. 1993, LANTZ et al. 1998, KNUTSSON et al. 2002) verwenden eine dNTP-Konzentration von 200 µM und eine Menge an Polymerase von 0,5 bis zu 1 U. Die eingesetzte MgCl₂-Konzentration beträgt ebenfalls 1,5 mM. NAKAJIMA et al. (1992) verwenden eine geringere Konzentration an dNTPs und Taq-Polymerase (100 µM bzw. 0,5 U). Das *virF*-Gen konnte in den eigenen Versuchen bei einer Mastermix-Konzentration von 1,25x deutlicher nachgewiesen werden. Die Magnesium-Konzentration betrug dabei 1,875 mM, die dNTP-Konzentration jeweils 250 mM, die Menge an Taq-Polymerase 0,8 U. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der Multiplex-PCR das *ail*-Gen bevorzugt amplifiziert wird, und bei einer höheren Konzentration an dNTPs mehr für die Amplifikation des *virF*-Genes zur Verfügung stehen. Wenn die Anzahl an dNTPs erhöht wird, sollte auch die Menge an Magnesium erhöht werden, da dNTPs die Mg²⁺-Ionen komplexieren (INNIS und GELFAND 1990, ROLFS et al. 1992). Die Menge sollte für jedes neu entwickelte PCR-Programm optimiert werden. Die Menge an Magnesium kann durch eine separate MgCl₂-Lösung angepasst werden.

Die besten Ergebnisse konnten mit einer Primer-Konzentration von 0,2 µM erzielt werden. Die in der Literatur angegebenen Werte reichen von 0,1 µM bis 0,5 µM (INNIS und GELFAND 1990, SAIKI 1990, ROLFS et al. 1992, GREINER 2004). NAKAJIMA et al. (1992) verwenden eine Primer-Konzentration von nur 0,1 µM. Diese Menge ergab in den eigenen Untersuchungen keine befriedigenden Ergebnisse. Ebenso wie die höhere Konzentration von 0,3 µM. Bei einer zu hohen Primer-Konzentration kommt es vermehrt zur Bildung von Primer-Dimeren.

Die optimale Annealing-Temperatur wurde in einem Gradient-Programm ermittelt. Für das *ail*-Gen erwies sich eine Annealing-Temperatur von 52 °C als optimal, für das *virF*-Gen eine Temperatur von 56-57 °C. Bei der Multiplex-PCR wurde als

Kompromiss 55°C als Annealing-Temperatur gewählt, da sich bei zu niedriger Temperatur die Gefahr von unspezifischen Anlagerungen der Primer an fast ähnliche Sequenzbereichen der Template-DNA erhöht. Wenn die Temperatur zu hoch gewählt wird, nimmt die Ausbeute und somit die Sensitivität der Reaktion ab (INNIS und GELFAND 1990, ROLFS et al. 2004). Bei der Ermittlung der Annealing-Temperatur wird von einer Temperatur ausgegangen, welche 5°C unter der Schmelztemperatur der Primer liegt (INNIS und GELFAND 1990). Bei der Bestellung der Primer wird diese Schmelztemperatur angegeben. Für die verwendeten *ail*-Primer wurde eine Schmelztemperatur von 57,3°C angegeben. Damit liegt die ermittelte Annealing-Temperatur ziemlich genau 5°C unter der angegebenen Schmelztemperatur. Für die *virF*-Primer wurde für den *virF*-forward-Primer eine Temperatur von 59,8°C, für den *virF*-reverse-Primer 52,0°C angegeben. Für den *virF*-forward Primer lag die ermittelte Annealing-Temperatur damit nur 3-4°C unter der angegebenen Schmelztemperatur, für den *virF*-reverse-Primer dagegen 4-5°C darüber. NAKAJIMA et al. (1992) verwenden für die Multiplex-PCR zum gemeinsamen Nachweis des *ail*, *virF* und *inv*-Genes eine Annealing-Temperatur von 55°C, wie sie auch in der eigenen Multiplex-PCR eingesetzt wurde.

3. Nachweis von *Y. enterocolitica* in künstlich beimpftem Probenmaterial

Als Impfkeim wurde ein *Y. enterocolitica*-Stamm des Bioserotyps 4/O:3 gewählt, da dieser Bioserotyp regelmäßig aus Schweinen und Schweinefleisch in Deutschland isoliert werden kann (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999b, 2000b) und die größte Bedeutung als Durchfallerreger beim Menschen besitzt (RKI 2004b). Als Probenmaterial wurde Rinderhackfleisch gewählt, da Rinder selten Träger von pathogenen *Y. enterocolitica* darstellen (BUCHER et al. 2002b). Jeweils 10 g wurden mit Keimzahlen von 10 bis 10⁵ KbE in vier Durchgängen beimpft und anschließend für 24 h in TSB angereichert. Durch die selektive Anreicherung können sich die gewünschten Bakterien vermehren, dadurch minimiert sich die Gefahr, die DNA toter Keime nachzuweisen. Zudem wäre ohne Anreicherung eine Keimzahl von 10³-10⁴ KbE nötig, um sie in der PCR nachweisen zu können. Die Nachweisgrenzen werden je 10 g Probenmaterial angegeben, da dies auch der eingesetzten Probenmenge entspricht. Eine Probe wurde als Negativkontrolle nicht beimpft, um Kreuzkontaminationen während der Probenvorbereitung zu erkennen.

3.1. PCR-Nachweis

3.1.1. Probenvorbereitung

Vor der Durchführung einer PCR müssen die Proben behandelt werden, um inhibitorische Inhaltsstoffe der Lebensmittel zu entfernen und um die DNA freizusetzen und zu konzentrieren. Deshalb wurden in dieser Arbeit die beimpften Rinderhackfleischproben mit sechs Methoden aufgereinigt, welche sich für die Anwendung in Routinelabors eignen. Aus diesen sechs Methoden wurden dann die am besten geeigneten ausgewählt. Die Wertung der sechs verschiedenen Methoden erfolgte nach folgenden Gesichtspunkten: Anzahl der positiven Ergebnisse, Arbeitsaufwand und Dauer der Gesamtextraktion, Kontaminationsgefahr sowie DNA-Ausbeute.

Der Biorad Genomic Tissue Kit lieferte im Hinblick auf die DNA-Ausbeute das beste Ergebnis. In allen Proben ab einer Impfmenge von 10 KbE/10 g Hackfleisch konnte das *ail*-Gen nachgewiesen werden. Auch für das *virF*-Gen lieferte diese Methode das beste Ergebnis. Die hohe DNA-Ausbeute wird durch die niedrigen C_t -Werten von 19,6-28,8 Zyklen (SYBR Green) bzw. 23-32,5 Zyklen (TaqMan-Sonde), je nach Impfmenge, bestätigt. Allerdings war die Durchführung recht arbeitsaufwendig, da die DNA-Extraktion insgesamt ca. 2 h dauerte. Durch viele Pipettierschritte erhöht sich die Kontaminationsgefahr, aber jede der nicht beimpften Proben lieferte ein negatives Ergebnis. Auch andere Autoren konnten mit dieser Methode aus gramnegativen Bakterien hochreine DNA isolieren (LEWINGTON et al. 1987). MERK (2000) konnte mit einem auf demselben Prinzip beruhenden Kit nur eine geringe Sensitivität von 10^5 - 10^8 KbE/ml beim Nachweis von *Burkholderia cepacia* erzielen. Die Autorin führt die schlechten Ergebnisse auf eine ungenügende Fällung der DNA zurück. Der Qiagen DNeasy Tissue Kit und Peqlab® E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini Kit waren in allen Arbeitsschritten identisch. Der Zeitaufwand war relativ hoch, die gesamte Extraktion dauerte ebenfalls ca. 2 Stunden, allerdings war die Handhabung einfacher als die des Biorad Genomic Tissue Kit. Der Qiagen DNeasy Tissue Kit hatte den Vorteil, dass die Säulen während der Zentrifugation geschlossen werden konnten, während die Säulen von Peqlab in offenem Zustand zentrifugiert werden mussten. Dadurch erhöht sich die Gefahr einer Kreuzkontamination. In einer nicht beimpften Hackfleischprobe im Impfversuch gelang mittels Real-Time PCR nach

Aufreinigung mit dem Peqlab E.Z.N.A. Tissue Mini Kit ein Nachweis von *ail*-positiven *Y. enterocolitica*. In diesem Fall kann von einer Kontamination ausgegangen werden. Durch diese erhöhte Kontaminationsgefahr bei dem Kit der Fa. Peqlab wurde der Qiagen DNeasy Tissue Kit vorgezogen. Die DNA-Ausbeute war bei beiden Methoden gleich gut, der Nachweis des *ail*-Genes war in allen beimpften Proben möglich. Auch die C_t -Werte waren, mit Werten ab 22 (SYBR Green) bzw. 23 (TaqMan-Sonde) Zyklen, bei beiden Kits vergleichbar niedrig. Nach GRIEB et al. (2002) ergeben diese, auf Silika-Säulen basierende Verfahren eine DNA hoher Reinheit. Auch SCHEU (1999) konnte mit dieser Methode bei der Extraktion von DNA aus Schokolade gute Ergebnisse erzielen. TREBESIUS et al. (1998) konnten nach Aufreinigung von beimpfter Mausleber mit dem Qiagen Tissue Kit *Y. enterocolitica* ab einer Keimzahl von 100 KbE/ml mit einer Seminested-PCR nachweisen. Eine Nachweisgrenze von 0,4 KbE/ml ITC-Anreicherung erzielten BOYAPALLE et al. (2001) beim Nachweis von *Y. enterocolitica* aus Schweinefleisch. In Untersuchungen von THISTED-LAMBERTZ et al. (2006) mit dem Qiagen DNeasy Tissue Kit konnten sehr gute Ergebnisse erzielt werden. Die Nachweisgrenze lag bei 25 KbE/g Fleisch und nachfolgender Anreicherung. Detektiert wurde das *virF*-Gen mit der PCR-Methode nach NCFA (1998). Der Arbeitsaufwand war bei der Pronase-Behandlung und der Aufreinigung mit der InstaGene-Matrix am geringsten. Die Arbeitszeit betrug 1 Stunde bzw. 40 Minuten, davon entfielen aber jeweils nur ca. 15 Minuten auf Arbeitszeit. Die Pronase-Behandlung, welche einer Behandlung mit Proteinase K entspricht, ist sehr kostengünstig. Die InstaGene-Matrix war der einzige Kit, für welchen keine zusätzlichen Reagenzien benötigt wurden. Die Kontaminationsgefahr war bei beiden Methoden sehr gering, da nur ein Reaktionsgefäß benötigt wird, welches bis zur Entnahme der DNA geschlossen bleibt. Allerdings lagen die C_t -Werte bei der Pronase-Behandlung mit 23,1-33,7 (SYBR Green) bzw. 25,4-36,9 (TaqMan) relativ hoch, was für eine geringe DNA-Ausbeute spricht. Mit der InstaGene-Matrix konnte mehr DNA gewonnen werden, was durch die niedrigeren C_t -Werte belegt wird (22,1-29,1, SYBR Green bzw. 24,5-33,4, TaqMan-Sonde). Zudem konnte mit der Pronase-Behandlung in jeweils einer der vier mit 10^3 KbE/10 g beimpften Proben das *ail*-Gen mit keiner der drei PCR-Methoden nachgewiesen werden, wogegen mit der InstaGene-Matrix in allen Proben das *ail*-Gen detektiert werden konnte. Aus diesem Grund wurde die InstaGene-Matrix der Pronase-Behandlung vorgezogen. MERK (2000) konnte mit der InstaGene-Matrix aus

Gewebe keine in der PCR nachweisbare DNA isolieren. SANDERY et al. (1996) konnten mit dieser Methode aus einer Anreicherung *Y. enterocolitica* ab einer Impfmenge von 60 KbE/ml isolieren. KAPPERUD et al. (1993) konnten beim Vergleich der Proteinase K-Behandlung mit der IMS von in TSB angereicherten Fleischproben mit beiden Methoden dieselbe niedrige Nachweisgrenze von 2 KbE/g erreichen. Auch die Methode nach NCFA empfiehlt die Proteinase K-Behandlung. Bei dem Promega Wizard® Magnetic DNA Purification System for food war der Arbeitsaufwand sehr hoch, die DNA-Ausbeute nur gering und die Kontaminationsgefahr erhöht. Deshalb wurde diese Methode im dritten Teil der Arbeit nicht weiter verwendet. In der Literatur konnten keine Ergebnisse von Untersuchungen gefunden werden, welche auf dieser Isolationsmethode basieren.

3.2. Vergleich der verschiedenen PCR-Methoden

In dieser Arbeit konnte das *ail*-Gen mittels Real-Time PCR (SYBR Green und TaqMan-Sonde) ab einer Keimzahl von 10 KbE/10 g Hackfleisch und nachfolgende Anreicherung nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht die niedrige Nachweisgrenze der Real-Time PCR. Zudem ist der Real-Time PCR-Nachweis schneller als eine konventionelle PCR. Das Ergebnis lag nach 2,5 (SYBR Green) bzw. 1,5 Stunden (TaqMan-Sonde) vor. Der Nachweis des *virF*-Genes in der Real-Time PCR mit SYBR Green gelang nur bei wenigen Proben und erst ab einer Impfmenge von 10³ KbE/10 g Hackfleisch. Dies könnte, wie bereits oben erwähnt, an der Länge des Fragmentes liegen. Je kürzer das Fragment, desto effizienter ist die PCR und desto toleranter ist sie gegenüber den Reaktionsbedingungen. Bei der Impfmenge von 10 KbE/10 g konnten C_T-Werte ab 19,6 (SYBR Green) bzw. 23 (TaqMan-Sonde) Zyklen erzielt werden. Damit lagen diese bei der TaqMan Real-Time PCR höher als bei der Methode mit SYBR Green, was dafür spricht, dass mehr DNA nötig ist, bis es zu einem positiven Signal kommt. Sehr geringe Keimzahlen können nicht mehr dargestellt werden. Die Methode mit SYBR Green ist somit sensitiver und kann sehr gut als kostengünstiges Screening eingesetzt werden.

Bei der konventionellen PCR konnte das *ail*-Gen ab einer Impfmenge 10 KbE/10 g Hackfleisch und nachfolgende Anreicherung in TSB für 24 h, sicher nachgewiesen werden. Für den sicheren Nachweis des *virF*-Genes sind höhere Keimzahlen nötig. Das könnte daran liegen, dass das Fragment des *virF*-Genes mehr als dreimal so

lang ist, wie das *ail*-Fragment. Die beiden Reaktionen konkurrieren in einer Multiplex-PCR um die Reaktionskomponenten miteinander, dabei wird das *ail*-Gen bevorzugt amplifiziert (WEYNANTS et al. 1996).

Diese Sensitivitäten geben aufgrund der geringen Probenzahlen nur eine Tendenz an. Zudem wurden keine Impfmengen unter 10 KbE/10 g Hackfleisch untersucht, weshalb diese Keimzahl nicht als unterste Nachweisgrenze angesehen werden kann. Bereits andere Autoren zeigten in früheren Studien, dass die Nachweisgrenze einer konventionellen PCR in der Regel höher liegt als die von Real-Time PCR-Methoden. BOYAPALLE et al. (2001) ermittelte bei einer auf dem *ail*-Gen basierenden konventionellen PCR eine Nachweisgrenze von 4×10^2 KbE/g Fleisch. Mittels einer TaqMan Real-Time PCR konnten bereits 0,4 KbE/g und nachfolgende Anreicherung nachgewiesen werden. JOURDAN et al. (2000) wies mit einer TaqMan Real-Time PCR das *ail*-Gen ab einer Konzentration von 4 KbE/ml Anreicherung (ITC und TSB) nach. Allerdings wurden hierbei Reinkulturen verwendet. Bei der Anreicherung von Schweinefleisch in ITC oder TSB konnten nach 24 h-Anreicherung 1 KbE/g Fleisch nachgewiesen werden. Damit sind diese Werte vergleichbar mit der hier ermittelten Nachweisgrenze von 10 KbE/10 g Fleisch. Die Nachweisgrenze der konventionellen Multiplex-PCR-Methode nach NAKAJIMA et al. (1992) wird mit 10^3 - 10^4 KbE/ml Flusswasser angegeben.

3.3. Kultureller Nachweis

In 58% der Proben gelang der Nachweis mit dem Direktausstrich auf CIN, sowie nach 48 h-Anreicherung in ITC. Mit diesen Methoden war die Isolierung in drei von vier Proben ab einer Keimzahl von ca. 10^3 KbE/10 g Hackfleisch möglich und jeweils in allen Proben mit einer Impfmenge von 10^4 und 10^5 KbE/10 g. Die hohe Nachweisrate beim Direktausstrich ist überraschend und lässt sich dadurch erklären, dass die Hackfleischproben mit einem frischen Stamm beimpft wurden und die Keime somit nicht gestresst waren. So konnten sich die Yersinien auch beim Direktausstrich besser vermehren. Zudem wuchs auf den Platten nur wenig Hintergrundflora, so dass die Yersinien beim Ausstrich auf Selektivagar nicht von anderen Keimen überwuchert wurden. Die Nachweisgrenze von *Y. enterocolitica* nach 48 h-Anreicherung in ITC und nachfolgendem Ausstrich auf CIN geben BOYAPALLE et al. (2001) mit 4×10^3 KbE/g an, damit liegt diese Nachweisgrenze

über der eigenen. Mit der Alkalibehandlung nach Anreicherung in TSB wurden nur in 33% der Proben *Y. enterocolitica* isoliert. Die Alkalibehandlung dient lediglich dazu, den Yersinien durch ihre Alkalotoleranz einen Vorteil gegenüber der Begleitflora zu verschaffen. Da aber auch einige Yersinien bei der Behandlung abgetötet werden, folgt die geringere Nachweisrate. Auch in der Literatur wird die Alkalibehandlung kontrovers diskutiert, da einige *Y. enterocolitica*-Stämme als Alkali-sensitiv gelten, weshalb parallel zur Alkalibehandlung immer ein Direktausstrich durchgeführt werden sollte (LOGUE et al. 1996).

4. Nachweis von *Y. enterocolitica* in Schweinefleischproben aus dem Handel

4.1. PCR-Nachweis

Mit der SYBR Green Real-Time PCR waren 26 % der untersuchten rohen Produkte und 32 % der verzehrsfertigen Schweinefleischprodukte positiv für *Y. enterocolitica*. Mit der TaqMan Real-Time PCR konnte in 12 % der rohen Proben und in 22% der verzehrsfertigen Produkte *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden. Damit wies diese PCR-Methode eine niedrigere Nachweisrate auf, als die Methode mit SYBR Green. Bisher existieren in der Literatur keine Untersuchungen, welche die Nachweisrate von *Y. enterocolitica* mit einer SYBR Green Real-Time PCR mit der einer TaqMan Real-Time PCR vergleicht. Wie bereits die eigenen Versuche mit dem beimpften Hackfleisch gezeigt haben, ist bei der TaqMan Real-Time PCR eine höhere Keimzahl nötig, bis es zu einem positiven Signal kommt. Dies spricht bei den Proben, welche mit der SYBR Green Real-Time PCR positiv waren, aber mit der Sonden PCR negativ, für eine sehr geringe Keimzahl. Möglich ist auch, dass in diesen Proben ein falsches Produkt amplifiziert wurde, da die Spezifitätsprüfung nur mit der Schmelzkurvenanalyse erfolgt, welche durchaus auch zu einem falsch-positiven Ergebnis führen kann. Nur bei der Sonden PCR erfolgt der Nachweis sequenzspezifisch. In diesem Fall könnten nur diejenigen Proben als *Y. enterocolitica*-positiv gewertet werden, in welchen mit der TaqMan Real-Time PCR das *ail*-Gen nachgewiesen werden konnte. Um diese Gefahr auszuschließen, müsste das Fragment der SYBR Green Real-Time PCR nach Anfertigung eines Gels sequenziert werden. Wie bereits oben erwähnt kann die SYBR Green Real-Time PCR als kostengünstiges Screening eingesetzt werden. Ein positives Signal mit der

SYBR Green Real-Time PCR sollte aber immer noch mit der Sonden-PCR bestätigt werden. Mit der konventionellen PCR-Methode gelang der Nachweis des *ail*-Genes in 12 % der rohen und in 16 % der verzehrsfertigen Proben. Die höhere Nachweisrate bei der Real-Time PCR zeigt die höhere Sensitivität dieser Variante gegenüber der konventionellen PCR. In einer Probe konnte mit der konventionellen PCR das *ail*-Gen nachgewiesen werden, mit beiden Real-Time PCR-Methoden dagegen nicht. In diesem Fall kann von einem falsch-positiven Ergebnis ausgegangen werden. Die Ursache einer falsch-positiven Signals der konventionellen PCR liegt vermutlich an einer Kontamination während der Anfertigung des Gels oder an einem Pipettierfehler. Auch eine Inhibition der Real-Time PCR, z.B. durch zu hohe DNA-Menge, ist möglich. Das *virF*-Gen konnte mit der konventionellen PCR nur in 6 % der rohen und in 10 % der verzehrsfertigen Proben detektiert werden. Als Ursache kommt dabei die bereits oben beschriebene schlechtere Amplifizierbarkeit des *virF*-Fragmentes gegenüber dem Fragment des *ail*-Genes in der Multiplex-PCR in Frage.

Untersuchungen mittels PCR zum Vorkommen von *Y. enterocolitica* in Schweinefleisch in Deutschland liegen bisher noch nicht vor. Die PCR-Nachweisrate von pathogenen *Y. enterocolitica* in rohem Schweinefleisch aus anderen Ländern in der Literatur schwankt zwischen 10 % (THISTED-LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM 2005) und 47 % (VISHNUBHATLA et al. 2000). Damit liegen die eigenen erzielten Ergebnisse im Mittel der Ergebnisse aus der Literatur. Bei der Untersuchung von erhitzten, verzehrsfertigen Produkten aus Schweden mittels konventioneller PCR nach NCFA (1998) konnten THISTED-LAMBERTZ et al. (2006) in 11 % der Proben pathogene *Y. enterocolitica* nachweisen. Diese Nachweisrate liegt damit knapp unter den in den eigenen Untersuchungen mittels konventioneller PCR erzielten Ergebnissen. BOYAPALLE et al. (2001) untersuchten Schweinehackfleisch aus den USA kulturell, mit einer konventionellen Multiplex-PCR basierend auf dem *ail* und *yadA*-Gen, als auch mit einer TaqMan Real-Time PCR-Methode. Kulturell konnte in keiner der 350 Proben pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden. Mit der konventionellen Multiplex PCR waren 10 %, mit der TaqMan Real-Time PCR 38 % der Proben *Y. enterocolitica*-positiv. Auch diese Ergebnisse weisen dieselben Tendenzen einer höheren Nachweisrate der Real-Time PCR gegenüber konventionellen Methoden wie die eigenen Ergebnisse auf.

Die meisten der positiven Ergebnisse wurden nach Aufreinigung mit dem Biorad Genomic Tissue Kit erzielt. Mit dieser Methode konnten 83 % (Real-Time PCR) bzw. 85 % (konventionelle PCR) der positiven Proben erfolgreich aufgereinigt werden. Allerdings hätten bei alleiniger Anwendung dieser Methode 17 bzw. 15 % der positiven Proben nicht erkannt werden können. Im Vergleich der Probenarten war diese Methode bei verzehrsfertigen Proben erfolgreicher als bei rohen Produkte. Bei Aufreinigung mit der InstaGene-Matrix ergaben sich 71 % (SYBR Green), 78 % (TaqMan Sonde) bzw. 60 % (konventionelle PCR) falsch-negative Ergebnisse. Vor allem bei den verzehrsfertigen Wurstwaren konnten mit diesem Extraktionskit nur 19 % der positiven Proben erkannt werden. Bei den rohen Produkten schnitt diese Methode mit 37 % deutlich besser ab. In den Vorversuchen mit beimpften Hackfleisch-Proben konnte mit dieser Methode gute Ergebnisse erzielt werden. Möglicherweise sind in den verzehrsfertigen Wurstwaren Inhibitoren vorhanden, welche durch diese Methode nicht genügend entfernt werden. Nach MERK (2000) ist InstaGene nicht für Probenmatrizes geeignet, welche inhibitorische Bestandteile wie Protein, Zucker, Knorpel, Schleim etc. enthalten. Auch wiesen die untersuchten Routineproben zum Teil nur eine sehr geringe Keimzahl auf, was durch die meist hohen C_t -Werte von > 30 Zyklen belegt wird. Eine Aufreinigung mit der InstaGene-Matrix ist somit nicht für den Nachweis von sehr geringen Keimzahlen geeignet. Insbesondere die TaqMan Real-Time PCR zeigte mit dieser Methode ein schlechtes Ergebnis. Der Qiagen DNeasy Tissue Kit war ebenfalls nur mäßig sensitiv. Vor allem bei der Real-Time PCR mit SYBR Green konnten viele der positiven Proben nicht detektiert werden. Da der Arbeitsaufwand vergleichbar mit dem des Biorad Genomic Tissue Kit ist, kann diese Methode aufgrund der geringeren DNA-Ausbeute in den eigenen Ergebnissen für die Routineanwendung nicht empfohlen werden.

4.2. Kultureller Nachweis

Mit der kulturellen Methode konnte in keiner Probe *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden. Eine verdächtige Kolonie einer Schweinehackfleischprobe konnte nach 24 h-Anreicherung in TSB und nachfolgende KOH-Behandlung, mittels API 20E als *Y. kristensenii* identifiziert werden. Dies zeigt, dass in den Proben entweder keine, oder nur eine sehr geringe Keimzahl an *Y. enterocolitica* vorhanden ist. Auch kann eine hohe Hintergrundflora dazu führen, dass keine *Y. enterocolitica* nachgewiesen

werden können, da diese überwuchert werden. Zudem ist auf einer dicht bewachsenen Platte die Auswahl von Kolonien zur weiteren Untersuchung erschwert. Eine weitere mögliche Ursache für das negative Ergebnis ist, dass mit dem CIN-Agar nur ein Selektivagar zum Einsatz kam. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen. In der Literatur schwanken die Nachweisraten von pathogenen *Y. enterocolitica* in rohem Schweinefleisch mittels Kultur zwischen 0 % (BOYAPALLE et al. 2001, DE BOER 1995, DE GUISTI et al. 1995, STEFANO/BOZHKOVA 1998, THISTED-LAMBERTZ et al. 2006) und 32 % (VISHNUBHATLA et al. 2000). In Deutschland lagen die Isolierungsraten in Hackfleisch und rohem Schweinefleisch bei 0–10 % (KARIB und STEEGER 1994, HANK 2003, KOCH 2003, ARNOLD et al. 2004). In verzehrfertigen Produkten konnte in den meisten Untersuchungen keine pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden (VELAZQUEZ et al. 1993, NORTJE et al. 1999, HANK 2003, THISTED-LAMBERTZ 2006). NESBAKKEN et al. (1991) konnten aus 4 von 33 Wurstproben aus Norwegen pathogene *Y. enterocolitica* des Bioserotyps 4/O:3 nach Anreicherung in ITC und Ausstrich auf SSDC-Agar isolieren.

Der Vergleich der PCR-Ergebnisse mit der Kultur zeigen, dass in Schweinefleisch pathogene *Y. enterocolitica* vorhanden sind, allerdings in einer so geringen Keimzahl, dass sie mit den kulturellen Methoden nicht nachgewiesen werden können. Das Ergebnis ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus der Literatur, in welchen mittels PCR pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden konnten, aber nicht mit kulturellen Verfahren. THISTED LAMBERTZ et al. (2006) wiesen in 100 Hackfleischproben bzw. in 97 Wurstproben mit der kulturellen Methode nach DIN EN ISO 10273 keine pathogenen *Y. enterocolitica* nach, mit der PCR konnte in 35 % (Hackfleisch) bzw. 11 % (Wurst) der Proben solche nachgewiesen werden. JOHANNESSEN et al. (2000) konnten mit kulturellen Methoden in 6 von 300 (2 %) Schweinefleischproben pathogene *Y. enterocolitica* nachweisen, mit der PCR-Methode waren 42 % der Proben positiv. Vier der kulturell positiven Proben waren mit der PCR negativ, 48 der PCR-positiven Proben ergaben dagegen mit der kulturellen Methode ein negatives Ergebnis. Die Autoren wendeten als kulturelle Methode Kälteanreicherung für 21 Tage in PSB, sowie Kälteanreicherung in PSB für 8 Tage und anschließende Selektivanreicherung in Rappaport-Bouillon an. Die Anreicherungen wurden auf CIN-Agar ausgestrichen. Die konventionelle PCR-

Methode basierte auf der von KAPPERUD et al. (1993) entwickelten Methode zum Nachweis des *yadA*-Genes. FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999a) untersuchten 255 Hackfleischproben kulturell und mittels PCR. Dabei konnten kulturell nach Anreicherung in MRB für vier Tage in 2 % der Proben pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden. Mit der konventionellen PCR zum Nachweis des *yadA*-Genes waren 25 % der Proben positiv. Diese Ergebnisse aus der Literatur können nicht direkt mit den eigenen Untersuchungen verglichen werden, da sich sowohl der kulturelle Nachweis, als auch der PCR-Nachweis in der Durchführung unterscheiden. Die Tendenz, dass die PCR eine höhere Sensitivität aufweist als der kulturelle Nachweis kann dennoch bestätigt werden. Bei einem kulturell negativen, aber PCR-positiven Ergebnis besteht aber auch die Möglichkeit, dass es sich dabei um tote bzw. nicht mehr vermehrungsfähige oder kultivierbare Keime handelt. Dies ist einer der wichtigsten Schwachstellen eines PCR-Nachweises, da diese toten oder zerstörten Zellen bei der Betrachtung der Sicherheit von Lebensmitteln irrelevant sind, da sie nicht mit Sicherheit als gesundheitsgefährdend einzustufen sind. Vor allem bei erhitzten Produkten kann von abgetöteten Keimen oder von einer Sekundärkontamination bei der Herstellung oder Lagerung ausgegangen werden. In diesem Fall muss der Schlacht- oder Herstellungsprozess und die Lagerung der Lebensmittel überprüft werden, um die Kontaminationsgefahr zu minimieren. In rohem Fleisch ist die Gefahr, tote Keime mit der PCR nachzuweisen unwahrscheinlich. Auch die vorherige Anreicherung dient der Minimierung dieser Gefahr. Durch die Übernachtenreicherung können sich die vorhandenen Keime vermehren und so in der PCR detektierbare Konzentrationen erreichen, während tote Keime verdünnt werden.

5. Schlussfolgerung

Die PCR ist aufgrund der hohen Sensitivität und der definierbaren Spezifität eine wertvolle Methode zum Nachweis von pathogenen Keimen in Lebensmitteln. Vor allem für Keime wie *Y. enterocolitica*, welche kulturell schwer zu isolieren sind. Zudem erfolgt, durch gezielte Auswahl der Zielgene, der Pathogenitätsnachweis. Bei der Probenvorbereitung hat sich der Biorad Genomic Tissue Kit bewährt, dieser stellt eine sehr sensitive, aber auch zeitaufwendige Methode zur Probenvorbereitung dar. Die DNA-Ausbeute ist mit der InstaGene-Matrix geringer, dafür ist diese Methode zeit- und kostengünstig. Die entwickelte SYBR Green Real-Time PCR ist eine

schnelle, kostengünstige und sensitive Methode zum Nachweis von *ail*-positiven *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln. Sie eignet sich somit gut als Screening. Positive Proben sollten anschließend noch mit der sequenzspezifischen TaqMan Real-Time PCR verifiziert werden. Mit den PCR-Methoden können in kulturell negativen Proben pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden. Die Real-Time PCR hat gegenüber konventionellen PCR-Methoden zudem den Vorteil, dass sie schneller und sensitiver ist als diese.

ZUSAMMENFASSUNG

Yersinia (Y.) enterocolitica ist ein bedeutender Lebensmittelkeim, der vorwiegend in Schweinefleisch vorkommt. Kulturell ist er sehr schwer nachzuweisen, da er auf Selektivagar sehr schnell von anderen Keimen überwuchert wird. Zudem sind die kulturellen Isolierungsmethoden sehr zeitaufwendig und eine Aussage über pathogene oder apathogene Stämme kann aufgrund der Ergebnisse ohne weitere Diagnostik nicht getroffen werden. Aus diesen Gründen wird in der Diagnostik von *Y. enterocolitica* aus Lebensmitteln vermehrt der PCR-Nachweis eingesetzt, welcher innerhalb von Stunden, bei vorheriger Anreicherung nach einem Tag, ein zuverlässiges Ergebnis liefert. Abhängig von der Wahl des Zielgenes werden nur pathogene Keime detektiert. Die Sensitivität einer PCR ist in großem Maße von der Aufreinigung abhängig, deshalb sollte ein PCR-Protokoll immer einschließlich Probenvorbereitung etabliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Real-Time PCR-basiertes Nachweisverfahren, zusammen mit der Probenvorbereitung, für *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln entwickelt. Nachgewiesen wurde das chromosomale *ail*-Gen, sowie das auf dem Plasmid lokalisierte *virF*-Gen. In Vorversuchen erfolgte die Optimierung von verschiedenen Bedingungen für eine PCR, wie die Mastermix-Konzentration, Primer-Konzentration und Annealing-Temperatur. Anschließend erfolgte die Untersuchung von gezielt kontaminierten Rinderhackfleischproben. Diese Proben wurden nach Anreicherung mit sechs verschiedenen Extraktionsverfahren aufgereinigt und anschließend mit drei PCR-Methoden, davon eine Real-Time PCR mit SYBR Green und eine TaqMan Real-Time PCR sowie eine konventionelle Multiplex-PCR mit Gelelektrophorese, auf *Y. enterocolitica* untersucht. Parallel dazu wurde der klassische kulturelle Nachweis mit Anreicherung in TSB und ITC und Ausstrich auf CIN-Agar durchgeführt. Abschließend erfolgte die Untersuchung von 150 Schweinefleischproben aus dem Handel. Diese wurden ebenfalls mittels der drei PCR-Methoden und kulturell untersucht. Die Aufreinigung der Proben erfolgte nach Anreicherung mit drei Extraktionsmethoden, welche in den Versuchen mit den beimpften Proben die besten Ergebnisse lieferten.

Mit allen drei PCR-Methoden konnten *ail*-positive *Y. enterocolitica* ab einer Impfmenge von 10 KbE/10 g Hackfleisch und nachfolgende Anreicherung nachgewiesen werden. Der Nachweis des *virF*-Genes gelang nur mit der konventionellen PCR, bei der SYBR Green Real-Time PCR konnte das *virF*-Gen nur selten und nur bei sehr hohen Keimzahlen detektiert werden. Bei der SYBR Green Real-Time PCR (*ail*) lagen die C_t -Werte bei der niedrigsten Impfmenge von 10 KbE/10 g, je nach Aufreinigungsmethode, im Bereich von 28,5 bis 34,8, bei der höchsten Impfmenge von 10^5 KbE/10 g konnten Werte ab 19,6 Zyklen erzielt werden. Die besten Ergebnisse konnten mit der Aufreinigung der InstaGene™ Matrix (Biorad), dem Biorad Genomic Tissue Kit und dem Qiagen DNeasy Tissue Kit erzielt werden. Mit diesen Methoden erfolgt auch die Aufreinigung der Schweinefleischproben aus dem Handel. Insgesamt konnte in 43 Proben (29 %) *ail*-positive *Y. enterocolitica* detektiert werden. Die höchste Nachweisrate mit 42 positiven Proben (28 %) wurde mit der SYBR Green Real-Time PCR erzielt, wogegen mit der TaqMan Real-Time PCR in 23 Proben (15 %) und mit der konventionellen PCR nur in 20 Proben (13 %) pathogene *Y. enterocolitica* detektiert werden konnten. Am höchsten war die Nachweisrate nach Aufreinigung mit dem Biorad Genomic Tissue Kit, welcher schon in den Vorversuchen die beste DNA-Ausbeute lieferte. Kulturell konnte in keiner Probe *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Real-Time PCR eine sensitive und schnelle Methode zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln darstellt. Die Probenaufbereitung mit dem Biorad Genomic Tissue Kit liefert eine hohe DNA-Ausbeute, ist aber zeitaufwendig, wogegen die InstaGene Matrix zwar weniger sensitiv, dafür aber wesentlich schneller ist. Die Real-Time PCR mit SYBR Green eignet sich vor allem als kostengünstiges Screening, positive Ergebnisse sollten noch mit der sequenzspezifischen TaqMan Real-Time PCR bestätigt werden.

SUMMARY

Development of a real-time PCR assay for detection of *Yersinia enterocolitica*

Yersinia (Y.) enterocolitica is a significant foodborne pathogen which is mainly present in pork. Direct cultural isolation is rarely successful, because it is easily overgrown by background flora, even on selective agar. Moreover, these cultural methods are time-consuming and statements on the pathogenicity of isolated strains cannot be made without further testing. This is why there is an increasing use of PCR in detecting *Y. enterocolitica* in foods. These methods yield reliable results within a few hours or, in case of enrichment, after one day. Depending on the choice of the target gene, only pathogenic strains are detected. The sensitivity of PCR is largely dependent on the DNA extraction procedure and therefore a new PCR assay should always be developed including sample preparation.

The purpose of this study was to develop a real-time PCR method together with the sample preparation to detect *Y. enterocolitica* in foods. The chromosomal *ail*-gene and the *virF*-gene located on the virulence plasmid were chosen as target genes. In the first part of this thesis, the PCR-conditions such as mastermix-concentration, primer-concentration and annealing-temperature were optimized. In the second part, experimentally contaminated minced beef was examined. After enrichment in TSB, six different methods of DNA extraction were compared. *Y. enterocolitica* was detected with three PCR-methods, one real-time PCR with SYBR Green, one TaqMan real-time PCR and one conventional multiplex PCR with gel electrophoresis. In addition cultural isolation after enrichment in TSB and ITC and plating on CIN-agar was carried out. In the third part, 150 pork samples were examined using the three PCR-methods and the culture method. For sample preparation the best three of the six methods were chosen.

All three PCR methods were able to detect *ail*-positive *Y. enterocolitica* after inoculation with 10 cfu/10 g meat following enrichment. The detection of the *virF*-gene was only successful with conventional PCR. As far as SYBR Green real-time PCR is concerned the *virF*-gene could rarely be detected and if so only in samples

inoculated with at least 10^3 CFU/10g. When using the *ail* SYBR green real-time PCR assay, the positive signal was generated between 28,5-34,8 amplification cycles, if the samples were inoculated only with 10 cfu/10 g. Amplification cycles of 19,6 could be achieved if the samples were spiked with 10^5 CFU/10 g. Sample preparation with the Instagene matrix, Biorad genomic tissue kit and the Qiagen DNeasy tissue kit yielded the best results. These three methods were used in the third part when the naturally contaminated pork samples were examined. In 43 samples (29 %) *ail*-positive *Y. enterocolitica* could be detected. The most effective method was the SYBR Green real-time PCR (28 % positive samples), followed by TaqMan real-time PCR (15 %) and conventional PCR (13 %). Most samples were detected after extraction with the help of Biorad genomic tissue kit. No *Y. enterocolitica* could be isolated when using the culture method.

These results show that the real-time PCR is a sensitive and fast method for detecting pathogenic *Y. enterocolitica* in foods. The sample preparation with the Biorad genomic tissue kit yields a high rate of DNA but is time consuming, whereas the Instagene matrix is less sensitive, but faster. The real-time PCR with SYBR Green is suitable as a low-price method of screening. Positive results should be verified with the specific TaqMan real-time PCR.

ANHANG

1. Anhang zu Material und Methoden

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

1.1.1. Flüssige Medien

TSB-Nährbouillon/CASO-Nährbouillon

(Tryptone Soja Broth/Caseinpeptone-Sojamehlpepton-Bouillon)

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung

(MERCK, 105459)

30 g

Destilliertes Wasser

ad 1000 ml

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

ITC-Nährbouillon

(Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Nährbouillon)

ITC-Bouillon (Basis)(MERCK, 116723)

22 g

Destilliertes Wasser

480 ml

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

zugeführtes Supplement:

ITC Selektiv Supplement (MERCK, 116725)

Ethanol absolut (vergällt) (MERCK, 1.00974)

2 ml

Destilliertes Wasser

18 ml

- Zugabe des Supplementes bei Abkühlung des Basismediums auf +45 °C
- Verteilung von je 9 ml in Reagenzglasröhrchen

1.1.2. Feste Medien

CIN-Agar

(Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar)

Basismedium:

Yersinia Selektivagar nach SCHIEMANN (Basis)

MERCK, 116434	29 g
Destilliertes Wasser	ad 500 ml

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

zugeführtes Supplement:

Yersinia Selektiv Supplement (MERCK, 116466)

Ethanol absolut (vergällt) (MERCK, 100974)	1 ml
Destilliertes Wasser	1 ml

- Zugabe des Supplementes bei Abkühlung des Basismediums auf +50 °C
- Abfüllen je ca. 12,5 ml in sterile Petrischalen

TSA-Agar

(Tryptic soy agar/CASO-Agar)

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CASO-Agar)

(MERCK, 105458)	40 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

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

UREA-Agar

Basismedium:

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

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

zugeführte Lösung:

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

- je 5 ml in sterile Reagenzglasröhrchen abfüllen
- zum Trocknen schräg lagern

1.1.3. Aufbewahrungsmedium

Mikrobank

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

1.2. Testsysteme und Reagenzien

Api 20E

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

Umfasst folgende Tests:

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

zusätzlich benötigte Reagenzien:

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

1.3. Geräte und Hilfsmittel

1.3.1. Allgemeine Materialien

Waagen

- Analysenwaage CP3202S-OCE SARTORIUS
 - Analysenwaage AC210S SARTORIUS

Magnetrührer mit Heizplatte

- Magnetrührwerk MR 2002 HEIDOLPH
 - Typ RCT Janke und Kunkel IKA LABORTECHNIK

Pipetten

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

Pipettensitzen

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

Glaspipetten

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

Dispensierhilfe

- Dispensette ® 0-10 ml BRAND

Reagenzgläser

SCHOTT

Reagenzglas-Schüttelgerät

JANKE & KUNKEL

Wattestopfen

- STERI-Wattestopfen Nr. 14 SCHUBERT

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

Aufbewahrungsgefäße

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

Petrischalen

WALDECK

Reaktionsgefäße

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

Sicherheitsbrenner

- GASI SCHÜTT

- Gasprofi 1^{SCS} WLD-TEC

Ösen

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

Handschuhe

- Gentle Skin classic MEDITRADE

Stomacher-Beutel

- Bag light INTERSCIENCE

Stomacher 400 Circulus SEWARD

Kühlgeräte BOSCH

- Kühl-Gefrier-Kombination Typ "Premium" LIEBHERR

Brutschränke

- Typ B 6060, Typ B 6200 HERAEUS INSTRUMENTS

Autoklav

- Hochdruckdampf-Sterilisator Typ 112 KSG STERILISATOREN
GmbH

Sterilbank

- HeraSafe KENDRO

Mikrobank

- Mikrobank TM Product Code PL 160 PRO-LAB DIAGNOSTICS

Zentrifugen

- 5415D EPPENDORF

Heizblöcke

- Thermomixer comfort EPPENDORF

- Thermostat plus EPPENDORF

1.4. PCR

1.4.1. Reagenzien zur Probenvorbereitung

Pronase	MERCK
Biorad InstaGene™ Matrix, Cat.-Nr. 732-6030	BIORAD
Biorad Genomic Tissue Kit, Cat.-Nr. 732-6343	BIORAD
Qiagen DNeasy Tissue Kit, Cat.-Nr. 69506	QIAGEN
Peqlab® E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini Kit, Cat.-Nr. 12-3496-02	PEQLAB
Wizard® Magnetic DNA Purification System for food, Cat.-Nr. FF3750	PROMEGA
MagneSphere® Magnetic Separation Stand, Cat.-Nr. Z5332	PROMEGA
Ethanol	MERCK
Isopropanol	MERCK

1.4.2. Geräte und Hilfsmittel

Thermocycler	
- iCycler IQ®	BIORAD
Elektrophorese-Kammern	
- SubCell GT	BIORAD
Stromversorgung	
- PowerPac 200	BIORAD
- PowerPac basis	BIORAD
Gel-Dokumentationssystem	
- UV-Kammer mit integrierter Kamera Gel-Doc 1000	BIORAD
Aqua bidest Bereiter	
- Fistreem™ Cyclon™	FISONS PLC
Mikrowelle	MICROMAXX
PCR-Tubes	
- 0,2 ml Thin Wall Tubes	BIORAD
- 200 µl Thin Wall Cap Strips	BIORAD

- PCR Plate, 96 well	BIORAD
- Optical tape	BIORAD
Parafilm® M 4"x250' american	CAN COMPANY

1.4.3. Reagenzien für die PCR

Eppendorf® MasterMix (2,5x)	EPPENDORF
Eppendorf® HotMasterMix (2,5x)	EPPENDORF
iIQ™ SYBR® Green Supermix	BIORAD
iQ™ Supermix	BIORAD
Wasser, Molecular Biology Grade	EPPENDORF
Längenstandart	
- EZ Load™ Molecular Rulers 100 bp	BIORAD
Loading buffer	
- Sample Acid Loading buffer	BIORAD
Agarose	
- Certified Molecular Biology Agarose	BIORAD
TBE-Puffer	
- 10x Tris/Boric Acid/EDTA Buffer	BIORAD
Ethidiumbromid Solution 10 mg/ml	BIORAD
Primer ail1 + 2, virF1 + 2	MWG-BIOTECH AG
Sonde ailP	MWG-BIOTECH AG

2. Anhang zu Ergebnisse

2.1. Ergebnisse der beimpften Hackfleischproben

Tabelle 24: Ergebnisse der beimpften Hackfleischproben mit der SYBR Green Real-Time PCR für das *ail*-Gen

Datum	Keimzahl	Verdünnung/ geimpfte KZ	SYBR Green Real-Time PCR <i>ail</i> (Ct)					
			Methode A	Methode B	Methode C	Methode D	Methode E	Methode F
20.05.- 31.05.05	3,4x10 ¹⁰	neg	-	-	-	-	-	31,5
		10 ⁻⁷ /10 ³	-	27,5	26,2	25,6	27,6	27,8
		10 ⁻⁶ /10 ⁴	25	27,4	21,6	23,3	23,6	25,4
		10 ⁻⁵ /10 ⁵	23,1	20,5	19,6	22	22,6	26,3
30.05.- 3.06.05	8x10 ¹⁰	neg	-	-	-	-	-	32,9
		10 ⁻⁸ /10 ³	28,8	27,9	26,5	30,4	28,4	30,1
		10 ⁻⁷ /10 ⁴	29,4	27,1	24,5	27,7	26,1	-
		10 ⁻⁶ /10 ⁵	27,4	24,9	22,8	26,6	24,5	32,9
06.06.- 10.6.05	1,8x10 ⁹	neg	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻⁸ /10	33,7	29,1	28,9	31,8	28,5	34,8
		10 ⁻⁷ /10 ²	31,8	27,7	23,3	28,6	29,8	31,4
		10 ⁻⁶ /10 ³	27,8	23,7	22,5	24,1	24,1	27,4
13.06.- 22.06.05	1,5x10 ⁹	neg	-	-	-	-	34,7	36
		10 ⁻⁸ /10	32,5	28,8	28,8	30,3	29,4	-
		10 ⁻⁷ /10 ²	30,2	25,9	26,7	28,7	27,4	-
		10 ⁻⁶ /10 ³	27,5	22,1	23	24,6	23,5	27,5

KZ	Keimzahl
neg	nicht-beimpfte Probe
Methode A	Pronase-Behandlung
Methode B	Biorad InstaGene™ Matrix
Methode C	Biorad Genomic Tissue Kit
Methode D	Qiagen DNeasy Tissue Kit
Methode E	Peqlab® E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini
Methode F	Wizard® Magnetic DNA Purification System for food; Promega

Tabelle 25: Ergebnisse der beimpften Hackfleischproben mit der SYBR Green Real-Time PCR für das *virF*-Gen

Datum	Keimzahl	Verdünnung/ geimpfte KZ	SYBR Green Real-Time PCR <i>virF</i> (Ct)					
			Methode A	Methode B	Methode C	Methode D	Methode E	Methode F
20.05.- 31.05.05	3,4x10 ¹⁰	neg 10 ⁻⁷ /10 ³ 10 ⁻⁶ /10 ⁴ 10 ⁻⁵ /10 ⁵	-	-	-	-	-	-
30.05.- 3.06.05	8x10 ¹⁰	neg 10 ⁻⁸ /10 ³ 10 ⁻⁷ /10 ⁴ 10 ⁻⁶ /10 ⁵	-	-	-	-	-	-
					30	34,7	-	-
					32,2	-	-	-
					29,1	29,8	-	-
06.06.- 10.6.05	1,8x10 ⁹	neg 10 ⁻⁸ /10 10 ⁻⁷ /10 ² 10 ⁻⁶ /10 ³	-	-	-	-	-	-
					-	-	-	-
					-	-	-	-
					28,9	34,7	33,9	-
13.06.- 22.06.05	1,5x10 ⁹	neg 10 ⁻⁸ /10 10 ⁻⁷ /10 ² 10 ⁻⁶ /10 ³	-	-	-	-	-	-
					-	-	-	-
					-	-	-	-
					30,9	32,1	31,5	-

KZ	Keimzahl
neg	nicht-beimpfte Probe
Methode A	Pronase-Behandlung
Methode B	Biorad InstaGene™ Matrix
Methode C	Biorad Genomic Tissue Kit
Methode D	Qiagen DNeasy Tissue Kit
Methode E	Peqlab® E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini
Methode F	Wizard® Magnetic DNA Purification System for food; Promega

Tabelle 26: Ergebnisse der beimpften Hackfleischproben mit der TaqMan Real-Time PCR für das *ail*-Gen

Datum	Keimzahl	Verdünnung/ geimpfte KZ	RealTimePCR <i>ail</i> (Sonde)					
			Methode A	Methode B	Methode C	Methode D	Methode E	Methode F
20.05.- 31.05.05	3,4x10 ¹⁰	neg	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻⁷ /10 ³	-	29,9	30,3	29,6	29,9	-
		10 ⁻⁶ /10 ⁴	25,4	30,5	25,6	27,9	27,9	-
		10 ⁻⁵ /10 ⁵	27,3	24,5	23	23	25,7	-
30.05.- 3.06.05	8x10 ¹⁰	neg	-	-	-	-	-	37,3
		10 ⁻⁸ /10 ³	30,3	28,9	26,8	30	29,3	31,5
		10 ⁻⁷ /10 ⁴	31,5	26,4	25,2	28,6	27	33,9
		10 ⁻⁶ /10 ⁵	27,2	24,8	23,6	27	24,5	27
06.06.- 10.6.05	1,8x10 ⁹	neg	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻⁸ /10	33,5	33,4	32,2	33,7	33,2	-
		10 ⁻⁷ /10 ²	33,1	28,3	30,9	31,7	32,8	-
		10 ⁻⁶ /10 ³	31,5	26,5	26,8	26,9	27,9	28,7
13.06.- 22.06.05	1,5x10 ⁹	neg	-	-	-	-	36,6	-
		10 ⁻⁸ /10	36,9	31,2	31,5	34,1	35,2	-
		10 ⁻⁷ /10 ²	-	28,5	29,7	32,4	33	-
		10 ⁻⁶ /10 ³	29,9	25,2	27,6	28,4	28,6	32,9

KZ	Keimzahl
neg	nicht-beimpfte Probe
Methode A	Pronase-Behandlung
Methode B	Biorad InstaGene™ Matrix
Methode C	Biorad Genomic Tissue Kit
Methode D	Qiagen DNeasy Tissue Kit
Methode E	Peqlab® E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini
Methode F	Wizard® Magnetic DNA Purification System for food; Promega

Tabelle 27: Ergebnisse der beimpften Hackfleischproben mit der konventionellen PCR für das *ail*- und *virF*-Gen

Datum	Keimzahl	Verdünnung/ geimpfte KZ	konventionelle PCR											
			Methode A		Methode B		Methode C		Methode D		Methode E		Methode F	
			<i>ail</i>	<i>virF</i>	<i>ail</i>	<i>virF</i>	<i>ail</i>	<i>virF</i>	<i>ail</i>	<i>virF</i>	<i>ail</i>	<i>virF</i>	<i>ail</i>	<i>virF</i>
20.05.- 31.05.05	3,4x10 ¹⁰	neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻⁷ /10 ³	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	(+)	-
		10 ⁻⁶ /10 ⁴	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		10 ⁻⁵ /10 ⁵	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
30.05.- 3.06.05	8x10 ¹⁰	neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		10 ⁻⁸ /10 ³	+	(+)	+	+	+	(+)	+	+	+	(+)	(+)	-
		10 ⁻⁷ /10 ⁴	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-
		10 ⁻⁶ /10 ⁵	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
06.06.- 10.6.05	1,8x10 ⁹	neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		10 ⁻⁸ /10	(+)	-	+	(+)	+	+	+	-	+	+	-	-
		10 ⁻⁷ /10 ²	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
		10 ⁻⁶ /10 ³	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
13.06.- 22.06.05	1,5x10 ⁹	neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		10 ⁻⁸ /10	(+)	-	+	+	+	(+)	+	(+)	+	-	-	-
		10 ⁻⁷ /10 ²	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
		10 ⁻⁶ /10 ³	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

KZ	Keimzahl
neg	nicht-beimpfte Probe
Methode A	Pronase-Behandlung
Methode B	Biorad InstaGen™ Matrix
Methode C	Biorad Genomic Tissue Kit
Methode D	Qiagen DNeasy Tissue Kit
Methode E	Peqlab® E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini
Methode F	Wizard® Magnetic DNA Purification System for food; Promega
+	positiv
(+)	schwach positiv
-	negativ

2.2. Ergebnisse der untersuchten Schweinefleischproben

Tabelle 28: Ergebnisse der Untersuchung von Schweinefleischproben aus dem Handel mittels Kultur, konventioneller PCR, Real-Time PCR mit SYBR Green und Real-Time PCR mit Sonde

Datum		Labor-Nr.; Probenart	K	konventionelle PCR						RealTime PCR SYBR-Green <i>ail</i>			RealTime PCR Sonde <i>ail</i>		
				1		2		3		1	2	3	1	2	3
				<i>ail</i>	<i>virF</i>	<i>ail</i>	<i>virF</i>	<i>ail</i>	<i>virF</i>						
4.- 7.7.05	1	3732 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
	2	3733 SF	-	+	-	-	-	-	-	35	-	34,4	-	N.D.	N.D.
	3	3734 SF	-	+	+	+	+	-	-	32,6	30	32,9	33,3	33,2	34,2
	4	3700 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33,5	N.D.	N.D.	35,5
	5	1781 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	6	3702 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34,5	N.D.	N.D.	-
11.- 21.7.05	7	260 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	-
	8	3863 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	-
	9	3865 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.
	10	3871 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	11	3872 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	33,9	-	N.D.	-	N.D.
	12	3819 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	33,6	-	N.D.	-	-
18.- 22.7.05	13	3959 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	14	3846 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	15	3979 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	35,7	-	N.D.	N.D.	N.D.
	16	3978 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	17	3844 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	34,9	33,9	N.D.	N.D.	N.D.
	18	3399 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	33,7	-	N.D.	N.D.	-
	19	3400 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	20	3554 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.
25.- 30.7.05	21	4124 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	22	4132 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	23	4141 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	34,5	-	N.D.	-	N.D.
	24	4126 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	25	4134 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	26	4143 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
1.- 5.8.05	27	13692 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	28	unbek. HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	29	4223 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	-
	30	2002 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	31	4093 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	-
	32	10015 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	33	09497 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	34	10016 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
8.- 17.8.05	35	4310 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	36	4307 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	37	4311 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	38	4303 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	39	4295 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	40	4315 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	41	4292 VF	-	-	-	+	-	-	-	-	32,8	-	N.D.	-	N.D.
	42	4297 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.

Tabelle 28 (Fortsetzung):

Datum		Labornr.; Proben- art	K	konventionelle PCR						RealTime PCR SYBR-Green <i>ail</i>			RealTime PCR Sonde <i>ail</i>			
				1		2		3		1	2	3	1	2	3	
				<i>ail</i>	<i>virF</i>	<i>ail</i>	<i>virF</i>	<i>ail</i>	<i>virF</i>							
15.- 19.8.05	43	4265 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	44	4592 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	45	4425 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	46	4264 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	47	4471 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	48	4263 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	49	4463 HF	-	-	-	+	-	-	-	-	29,2	-	-	N.D.	34,7	N.D.
	50	4468 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	51	4466 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	52	4462 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	53	4464 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	54	4470 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	55	4461 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
29.8.- 2.9.05	56	13321 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	57	4647 SF	-	-	-	-	-	-	-	34,4	32,8	-	-	-	-	N.D.
	58	4646 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	59	4655 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	60	4631 HF	-	-	-	-	-	-	-	34,8	-	-	-	-	N.D.	N.D.
	61	4630 SF	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.
18.- 28.9.05	62	5268 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	63	5251 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	64	4221 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	65	5252 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	66	4637 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	67	5316 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	68	5315 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	69	5313 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	70	4312 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	26.9.- 10.10.05	71	5376 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
72		4597 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
73		5250 HF	-	(+)	-	(+)	-	-	-	32,4	32,6	-	-	-	36,1	N.D.
74		5260 SF	-	+	+	+	+	+	+	25,2	24,4	-	-	31,2	29,9	N.D.
75		4639 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
76		5012 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
77		5269 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
78		5013 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
4.- 10.10.05	79	5646 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	33,5	-	-	N.D.	-	N.D.
	80	unbek. HF	-	-	-	-	-	-	-	-	34,3	-	-	N.D.	-	N.D.
	81	3962 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	82	5261 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	32,2	-	-	N.D.	-	N.D.
	83	5254 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	84	4654 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	85	4306 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	86	4305 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
17.- 26.10.05	87	17897 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	88	16971 HF	-	-	-	-	-	-	-	34,9	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	89	18971 HF	-	-	-	-	-	-	-	33,7	30,8	33,5	-	-	35,7	-
	90	19802 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.
	91	5365 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.

Tabelle 28 (Fortsetzung):

Datum		Labornr.; Proben- art	K	konventionelle PCR						RealTime PCR SYBR-Green <i>ail</i>			RealTime PCR Sonde <i>ail</i>		
				1		2		3		1	2	3	1	2	3
				<i>ail</i>	<i>virF</i>	<i>ail</i>	<i>virF</i>	<i>ail</i>	<i>virF</i>						
	92	14514 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
	93	14706 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	
	94	18060 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	-	
	95	15695 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	-	
	96	17574 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	
	97	15801 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
	98	5360 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
24.- 27.10.05	99	19915 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
	100	6108 VF	-	-	-	-	-	-	-	36,7	-	N.D.	-	N.D.	
	101	6109 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
	102	6073 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
	103	6110 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
	104	21140 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
	105	19588 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
	106	20549 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
14.- 18.11.05	107	16558 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
	108	6147 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
	109	15354 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
	110	6151 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
	111	6448 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
	112	6074 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	
	113	6148 VF	-	-	-	-	-	-	-	33,2	-	N.D.	-	N.D.	
	114	17448 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.	
21.- 24.11.05	115	5785 VF	-	-	-	+	+	-	-	-	29,5	-	N.D.	34,8	N.D.
	116	unbek. SF	-	-	-	+	+	+	+	-	29,8	29,2	N.D.	33,8	33,7
	117	unbek. HF	-	-	-	+	-	+	+	-	30,6	28,9	N.D.	34,3	32,7
	118	5932 VF	-	-	-	+	-	+	+	-	30,8	29,2	N.D.	35,7	32,1
	119	5845 HF	-	-	-	+	-	+	-	-	30,6	28,6	N.D.	33,5	33,2
	120	6134 VF	-	-	-	+	-	+	-	-	28,8	29,1	N.D.	34,8	34,7
	121	5934 VF	-	-	-	+	-	+	+	-	30,3	29,8	N.D.	33,8	34,4
	122	5933 VF	-	-	-	+	-	+	-	-	34,7	28,9	N.D.	36,1	34
28.11- 2.12.05	123	5796 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
	124	5034 VF	-	+	-	+	+	+	-	34,7	31,6	-	-	33,4	N.D.
	125	19526 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
	126	259/05 VF	-	+	-	+	+	+	-	-	32	-	-	33,4	N.D.
	127	5644 SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	128	19212 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	129	19903 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	130	19471 HF	-	+	-	-	-	+	+	29,7	26,8	31,3	29,9	32,7	37,2
5.- 14.12.05	131	4085 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.
	132	22263 HF	-	-	-	-	-	+	-	-	30,9	27,3	N.D.	37,3	-
	133	6381 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.
	134	6151 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.
	135	6380 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.
	136	21748 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.
	137	23478 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	-	N.D.
	138	23754 HF	Y.k.	-	-	-	-	-	-	-	33,6	-	N.D.	-	N.D.
12.- 14.12.	139	6460 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34	N.D.	N.D.	37,5
	140	6461 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	33,6	-	N.D.	-	N.D.

Tabelle 28 (Fortsetzung):

Datum		Labornr.; Proben- art	K	konventionelle PCR						RealTime PCR SYBR-Green <i>ail</i>			RealTime PCR Sonde <i>ail</i>					
				1		2		3		1	2	3	1	2	3			
				<i>ail</i>	<i>virF</i>	<i>ail</i>	<i>virF</i>	<i>ail</i>	<i>virF</i>									
	141	22933 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
	142	21500 HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.	N.D.
2.- 6.1.06	143	7361 VF	-	-	-	-	-	-	-	34,2	37,5	-	36,8	-	-			
	144	7330 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	145	7329 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	146	7359 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32,6	-	-	37,5			
	147	7360 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	148	6138 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	34,3	33,9	-	36,5	-			
	149	6449 VF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	150	25733 HF	-	+	+	+	+	-	-	31	28,7	32,4	33,8	32,5	36,4			

bei den Real-Time PCR-Methoden ist bei positiven Proben der C_t -Wert angegeben

K	Kultureller Nachweis
Methode 1	Biorad InstaGene™ Matrix
Methode 2	Biorad Genomic Tissue Kit
Methode 3	Qiagen DNeasy Tissue Kit
HF	Hackfleisch
SF	Schweinefleisch-Stücke
VF	Verzehrsfertige Wurstwaren
-	negativ
+	positiv
(+)	schwach positiv
N.D.	nicht durchgeführt
Y.k.	<i>Y. kristensenii</i>

LITERATURVERZEICHNIS

- ABER R.C. (1990):
Transfusion-associated *Yersinia enterocolitica*
Transfusion **30**, 193-195
- ALBERTSON P.-Ä. (1986):
Partition of cell particles and macromolecules
Wiley, New York, USA, 3. Auflage
- ALDOVA E., SVANDOVA E., VOTYPKA J., SOUREK J. (1990):
Comparative study of culture methods to detect *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3
on swine tongues
Zbl. Bakt. **272**, 306-312
- ALEKSIC S. (1995):
Occurrence of *Y. enterocolitica* antigens O:3, O:9 and O:8 in different *Yersinia*
species, their corresponding H antigens and origin
Contrib. Microbiol. Immunol. **13**, 89-92
- ALEKSIC S. und BOCKEMÜHL J. (1990):
Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen
Immun. Infekt. **18**, 178-185
- ALEKSIC S. und BOCKEMÜHL J. (1996):
Untersuchungen von *Yersinia*-Stämmen aus Deutschland, 1993-1994
Bundesgesundheitsblatt **3**, 94-97
- ALEKSIC S. und BOCKEMÜHL J. (1999):
Yersinia and other enterobacteriaceae
In: MURRAY P.R., BARON E.J., PFALLER M.A., TENOVER F.C., YOLKEN R.H.
(Hrsg.): Manual of clinical microbiology
American society for microbiology, Washington D.C., 3. Auflage, S. 483-496
- ALEKISC S., STEIRGERWALT A.G., BOCKEMÜHL J., HUNTLEY-CARTER G.P.,
BRENNER D. (1987):
Yersinia rhodei sp. Nov. isolated from human and dog faeces and surface water
Int. J. Bact. **37**, 327-332
- ALEKSIC S., BOCKEMÜHL J., WUTHE H.H. (1995):
Epidemiology of *Yersinia pseudotuberculosis* in Germany, 1983-1993
In: RAVAGNAN G. und CHIESA C. (Hrsg.): Contribution to microbiology and
immunology, vol.13, Yersiniosis, present and future
Karger, Basel, Switzerland, S. 55-58
- AL-HENDY A., TOIVANEN P., SKURNIK M. (1992):
Lipopolysaccharide O side chain of *Yersinia enterocolitica* O:3 is an essential
virulence factor in an orally infected murine model
Infect. Immun. **60**, 870-875

- ALONSO R., NICHOLSON P.S., PITT T.L. (1993):
Rapid extraction of high purity chromosomal DNA from *Serratia macescens*
Lett. Appl. Microbiol. **16**, 77-79
- AL-SOUD W.A. und RADSTRÖM P. (2000):
Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces
and meat
J. Clin. Microbiol. **38**, 4463-4470
- 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., ZOESLER 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., MEHLMANN I.J., SANDERS A.C. (1980)
Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia*
pseudotuberculosis from foods
Appl. Environ. Microbiol. **39**, 135-140
- AUSUBEL F., BRENT R., KINGSTON R., MOORE D., SEIDMANN J.G., SMITH J.,
STRUHL K. (1998):
Current protocols in molecular biology
John Wiley & Sons, New York, USA
- AUTENRIETH I.B. und FIRSCHING R. (1996):
Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*:
an ultrastructural and histological study
J. Med. Microbiol. **44**, 285-294
- BANGSOW T., HUCH, R., MALE, D., MÜLLER, S. (2002):
Polymerase-Kettenreaktion
In: SCHIMPF (Hrsg.): Gentechnische Methoden
Spektrum Akadem. Verlag Berlin Heidelberg, S. 147-167
- BARRETT N.J. (1986):
Communicable disease associated with milk and dairy products in England and
Wales 1983-1984
J. Infect. **12**, 265-272
- BAUMGARTEN R., MIERSCH H., FENGLER J.D. (1977):
Krankheitsbilder von *Yersinia*-Infektionen
Dtsch. Gesundheitswes. **32**, 1218
- BECKER-ANDRE M. und HAHLBROCK K. (1989):
Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel
approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY)

Nucleic Acids Res. **17**, 9437-9447

BEN-GURION R. und SHAFFERMAN A. (1981):
Essential virulence determinants of different *Yersinia* species are carried on a common plasmid
Plasmid **5**, 183-187

BERCOVIER H. und MOLLARET H.H. (1984):
Genus XIV *Yersinia* van Loghem (1944)
in: KRIEG N.R. und HOLT J.G. (1984): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, William & Wilkins, Baltimore, Philadelphia, Hongkong, London, Munich, Sydney, Tokyo, 1. Auflage, S. 498-506

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

BEUTLER E., GELBART T., KUHL W. (1990):
Interference of heparin with the polymerase chain reaction
BioTechniques **9**, 166

BHADURI S. (2003):
A comparison of sample preparation methods for PCR detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* from ground pork using swabbing and slurry homogenate techniques
Mol. Cell. Probes **17**, 99-105

BHADURI S. und PICKARD A.R. (1995):
A method for isolation of chromosomal and plasmid DNA from *Yersinia enterocolitica* for simultaneous amplification by polymerase chain reaction: a possible model for other bacteria
J. Rapid Methods Autom. Microbiol. **4**, 107-113

BHADURI S. und COTTRELL B. (1998):
A simplified preparation method from various foods for PCR detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*: a possible model for other food pathogens
Mol. Cell. Probes **12**, 79-83

BHADURI S., WESLEY I.V., BUSH E.J. (2005):
Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains in pigs in the United States
App. Environ. Microbiol. **71**, 7117-7121

BICKLEY J., SHORT J.K., MCDOWELL D.G., PARKES H.C. (1996):
PCR detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions
Lett. Appl. Microbiol. **22**, 153-158

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

Role of YadA, Ail and Lipopolysaccharide in serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3
Infect. Immun. **73**, 2232-2244

BLACK R.E., JACKSON R.J., TSAI T., MEDVESKY M., FEELEY J.C., MACLEOD K.I.E., WAKELEE A.M. (1978):
Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk
N. Eng. J. Med. **298**, 76-79

BLAIS B.W. und PHILLIPPE L.M. (1995):
Comparative analysis of *yadA* and *ail* polymerase chain reaction methods for virulent *Yersinia enterocolitica*
Food Control **6(4)**, 211-214

BOCKEMÜHL J. (1999):
Yersinia enterocolitica und *Yersinia pseudotuberculosis*
In: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln
Behrs Verlag, S. 168-176

BOCKEMÜHL J. und ROGENTIN P. (2004):
Enterale Yersiniosen, Klinische Bedeutung, Epidemiologie, Diagnostik und Prävention
Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz **7**, 685-691

BOLIN I., NORLANDER L., WOLF-WATZ H. (1982):
Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid
Infect. Immun. **37**, 506-512

BOLLET C., GEVAUDAN M.J., DE LAMBALLERIE X., ZANDOTTI C., DE MICCO P. (1991):
A simple method for the isolation of chromosomal DNA from gram positive or acid-fast bacteria
Nucleic Acids Res. **19**, 1955

BORST M. und MILLER D.M. (1990):
DNA isolation and southern analysis: a clinician's view
Am. J. Med. Sci. **299**, 356-360

BOTTONE E.J. (1977):
Yersinia enterocolitica: a panoramic view of a charismatic microorganism
Crit. Rev. Microbiol. **5**, 211-241

BOTTONE E.J. (1997):
Yersinia enterocolitica: The charisma continues
Crit. Rev. Microbiol. **April 1997**, 257-276

BOTTONE E.J. (1999):
Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates
Microbes and Infection **1**, 323-333

BOTTONE E.J. und HURVELL B. (1981):

Yersinia enterocolitica

CRC Press Inc., Boca Raton, Florida

BOYAPALLE S., WESLEY I.V., SCOTT HURD H., GOPAL REDDY P. (2001):
Comparison of culture, multiplex, and 5' nuclease polymerase chain reaction assays
for the rapid detection of *Yersinia enterocolitica* in swine and pork products
J. Food Prot. **64**, 1352-1361

BRENNER D.J. (1981):

Classification of *Yersinia enterocolitica*

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

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

BROCK T.D. und FREEZE H. (1969):

Thermus aquaticus gen.n. and sp.n., a nonsporulating extreme thermophile

J. Bacteriol. **98**, 289-297

BUCHER M. (2001):

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

Diss. med. vet., München

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

Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Puten

43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene vom 24.-28.09.2002 in
Garmisch-Partenkirchen

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

Vorkommen von Yersinien-Arten in Kälbern und Junggrindern

Fleischwirtschaft **82(9)**, 125-127

BUCHHOLZ D.H., AUBUCHON J.P., SNYDER E.L., KANDLER R., EDBERG S.,
PISCITELLI V., PICKARD C., NAPYCHANK P. (1992):

Removal of *Yersinia enterocolitica* from AS-1 red cells

Transfusion **32**, 667-672

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

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

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

BUSTIN S.A. (2000):

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

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

CALOS M.P. und MILLER J.H. (1980):

Transposable elements

Cell **20**, 579-595

CARMAN W.F., WALLACE L.A., WALKER J. (2000):
Rapid virological surveillance of community influenza infection in general practice
BMJ **321**, 736-737

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

CHAMBERLAIN J.S., GIBBS R.A., RANIER J.E., NGUYEN P.N., CASKEY C.T. (1988):
Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification
Nucleic Acids Res. **16**, 11141-11156

CHEYROU A., GUYOMARC C., JASSERAND P., BLOUIN P. (1991):
Improved detection of HBV DNA by PCR after microwave treatment of serum
Nucleic Acids Res. **19**, 4006

CHRISTENSEN S.G. (1987):
The *Yersinia enterocolitica* situation in Denmark
Contr. Microbiol. Immunol. **9**, 93-97

CLEGG R.M. (1992):
Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids
Meth. Enzymol. **211**, 353-388

CLEMENTI M., MENZO S., MANZIN A., BAGNARELLI P. (1995):
Quantitative molecular methods in virology
Arch. Virol. **140**, 1523-1539

COMEY C.T., JUNG J.M., BODOWLE B. (1991):
Use of formamide to improve amplification of HLA DQ α sequences
BioTechniques **10**, 60-61

CORNELIS G.R. (1994):
Yersinia pathogenicity factors
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **192**, 243-263

CORNELIS G.R. (2002):
Yersinia type III secretion: send in the effectors
J. Cell Biol. **158**, 401-408

CORNELIS G.R., LAROCHE Y., BALLIGUND G. (1987):
Yersinia enterocolitica as a primary model for bacterial invasiveness
Rev. Inf. Dis. **9**, 64-87

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

- COMEY, THEISEN C., JUNG J.M. BUDOWLE B. (1991)
Use of formamide to improve amplification of HLA DQ alpha sequences
BioTechniques **10**, 60-61
- COVER T. und ABER R. (1989):
Yersinia enterocolitica
N. Engl. J. Med. **321**, 16-24
- D'AQUILA R.T., BECHTEL L.J., VIDELER J.A., FRON J.J., GORCZYCA P.,
KAPLAN J.C. (1991):
Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating
Nucleic Acids Res. **19**, 3749
- DANG C. und JAYASENA S.D. (1996):
Oligonucleotide inhibitors of *Taq* DNA polymerase facilitate detection of low copy
number targets by PCR
J. Mol. Biol. **264**, 268-278
- DE BOER E.(1995):
Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods
Int. J. Food Microbiol. **17(2)**, 75-84
- DE BOER E. und 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. und SELDAM W.M. (1987):
Comparison of methods for the isolation of *Y. enterocolitica* from porcine tonsils and
pork
Int. J. Food Microbiol. **12**, 375-378
- DE BOER E. und BEUMER R.R. (1999):
Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms
Int. J. Food Microbiol. **50**, 119-130
- DEDIE K., BOCKEMÜHL J., KÜHN H., VOLKMER K.-J., WEINKE T. (1993):
Yersinien mit enterischem Verlauf beim Mensch
Lehrbuch über bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch, Epidemiologie, Pathologie,
Klinik, Diagnostik und Bekämpfung
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, S. 377-398
- DE FRANCHIS R., CROSS N.C.P., FOULKES N.S., COX T.M. (1988):
A potent inhibitor of *Taq*-polymerase copurifies with human genomic DNA
Nucleic Acids Res. **16**, 10355
- DE GUISTI M., DE VITO E., SERRA A., QUATTRUCCI A., BOCCIA A., PACIFICO
L., RANUCCI A., RAVAGNAN G., CHIESA C. (1995):
Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughtered pigs and pork
products
Contrib. Microbiol. Immunol. **13**, 126-129

- DE KONING-WARD T.F., WARD A.C., ROBINS-BROWNE R.M. (1994):
Characterization of the urease-encoding gene complex of *Yersinia enterocolitica*
Gene **145**, 25-32
- DE LOMAS J.G., SUNZERI F.J., BUSCH M.P. (1992):
False-negative results by polymerase chain reaction due to contamination by glove
powder
Transfusion **32**, 83-85
- DELMAS C.L. und VIDON D.J.-M. (1985):
Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species of food in France
Appl. Environ. Microbiol. **50**, 767
- DELOR J. und CORNELIS G. (1992):
Role of Yst toxin in experimental infection of young rabbits
Infect. Immun. **10**, 4268-4277
- DELOR I., KAECKENBEECK A., WAUTERS G., CORNELIS G.R. (1990):
Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gen encoding the heat-stable
enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic
Yersiniae
Infect. Immun. **58**, 2983-2988
- DE SILVA D., REISER A., HERRMANN M., TABITI K., WITTEWER C. (1998):
Rapid genotyping and quantification on LightCycler® with hybridization probes
Biochemica **2**, 12-15
- DICKINSON J.H., KROLL R.G., GRANT K.A. (1995):
The direct application of the polymerase chain reaction to DNA extraction from foods
Lett. Appl. Microbiol. **20**, 212-216
- DIDENKO V.V. (2001):
DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and
applications
Biotechniques **31**, 1106-1121
- DORAK M.T. (2006):
Real-Time PCR
Veröffentlichung aus dem Internet:
www.dorak.info/genetics/realtime.html
- DOYLE M.P. und HUGDAHL M.B. (1983):
Improved procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from meats
Appl. Environ. Microbiol. **45**, 127-135
- DOYLE M.P., HUGDAHL M.B., TAYLOR L.S. (1981):
Isolation of virulent *Yersinia enterocolitica* from porcine tongues
Appl. Environ. Microbiol. **42**, 180-183
- DURISIN M.D., IBRAHIM A., GRIFFITHS, MANSEL W. (1997):

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

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

EBELING W., HENNRICH N., KLOCKOW M., METZ H., ORTH H.D., LANG H. (1974):

Proteinase K from *Tritirachium album* Limber

Eur. J. Biochem. **47**, 91-97

EICKBUSH T.H. und MOUDRIANAKIS E.N. (1978):

The compaction of DNA helices into either continuous supercoils or folded-fiber rods and toroids

Cell **13**, 295-306

ELNIFRO E.M., ASHISHI A.M., COOPER R.J., KLAPPER P.E. (2000):

Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology

Clin. Microbiol. Rev. **13**, 559-570

ERLICH H.A., GELFAND D., SNINSKY J.J. (1991):

Recent advances in the polymerase chain reaction

Science **252**, 1643-1651

FALCÃO J.P., BROCCHI M., PROCENCA-MÓDENA J.L., ACRANI G.O., CORRÊA E.F., FALCÃO D.P. (2004)

Virulence characteristics and epidemiology of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia* other than *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* isolated from water and sewage

J. Appl. Microbiol. **96**, 1230-1236

FALKOW S. (1988):

Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity

Rev. Infect. Dis. **10**, 274-276

FANG X., LI J.J., PERLETTE J., TAN W., WANG K. (2000):

Molecular beacons: novel fluorescent probes

Anal. Chem. **72**, 747A-753A

FANTASIA M., MINGRONE G.M., MARTINI A., BOSCATO C., CROTTI D. (1993):

Characterisation of *Yersinia* species isolated from kennel and from cattle and pig farms

Vet. Rec. **132**, 532-534

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

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

J. Clin. Microbiol. **30**, 245-256

FEHLHABER K. und JANETSCHKE P. (1992):

Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene

Gustav Fischer Verlag, Jena

- FENOLLAR F. und RAOULT D. (2004):
Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms.
APMIS **112**, 785–807.
- FENWICK S.G., MADIE P., WILKS C.R. (1994):
Duration of carriage and transmission of *Yersinia enterocolitica* biotype 4 serotype O:3 in dogs
Epidemiol. Infect. **113**, 471-477
- FLUIT A.C. WIDJOJOATMODJO M.N., BOX A.T.A. TORENSMA R., VERHOEF J. (1993):
Rapid detection of Salmonellae in poultry with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay
Appl. Environ. Microbiol. **59**, 1342-1346
- FÖRSTER T.(1948):
Zwischenmolekulare Energieumwandlung und Fluoreszenz
Ann. Phys. **6**, 55-75
- FORBERG U., FRYDEN A., KIHSTROM E., PERSSON K., WEILAND O. (1986):
Yersinia enterocolitica septicemia: clinical and microbiological aspects
Scand. J. Infect. Dis. **18**, 269-279
- FREDRIKSSON-AHOMAA M., HIELM S., KORKEALA H. (1999a):
High prevalence of *yadA*-positive *Yersinia enterocolitica* in pig tongues and minced meat at retail level
J. Food Prot. **62**, 123-127
- FREDRIKSSON-AHOMAA M., AUTIO T., KORKEALA H. (1999b):
Efficient subtyping of *Yersinia enterocolitica* bioserotyp 4/O:3 with pulse-field gel electrophoresis
Letters Appl. Microbiol. **29**, 308-312
- FREDRIKSSON-AHOMAA M., KORTE T., KORKEALA H. (2000a):
Contamination of carcasses, offals and the environment with *yadA*-positive *Yersinia enterocolitica* in a pig slaughterhouse
J. Food. Prot. **63**, 31-35
- FREDRIKSSON-AHOMAA M., BUCHER M., STOLLE A. (2000b):
Prävalenz von *Yersinia enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 in Tonsillen bei Schlachtschweinen in der Region München
41. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, Teil I Vorträge, S. 116-122
- FREDRIKSSON-AHOMAA M., BUCHER M., HANK C., STOLLE A. KORKEALA H. (2001a):
High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 on pig offal in southern Germany: a slaughtering technique problem
Syst. Appl. Microbiol. **24**, 457-463

FREDRIKSSON-AHOMAA M., HALLANVUO S., KORTE T., SILTONEN A., KORKEALA (2001b):
Correspondence of genotypes of sporadic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains from humans and porcine origin
Epidemiol. Infect. **127**, 37-47

FREDRIKSSON-AHOMAA M., LYHS U., KORTE T., KORKEALA H. (2001c):
Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food samples at retail level in Finland
Arch. Lebensmittelhyg. **52**, 66-68

FREDRIKSSON-AHOMAA M., KORTE T., KORKEALA H. (2001d):
Transmission of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 to pets via contaminated pork
Letters Appl. Microbiol. **32**, 375-378

FREDRIKSSON-AHOMAA M., STOLLE A., KORKEALA H. (2006a):
Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections
Immuno. Med. Microbiol. **47**, 315-329

FREDRIKSSON-AHOMAA M., STOLLE A., SIITONEN A., KORKEALA H. (2006b):
Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O:3 originate mainly from pigs
J. Med. Microbiol. **55**, 747-749

FREEMAN W.M., WALKER S.J., VRANA K.E. (1999):
Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential
Biotechniques **26**, 112-125

FUKUSHIMA H. und GOMYODA M. (1986):
Inhibition of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 by natural microflora of pork
Appl. Environ. Microbiol., **51**, 990-994

FUKUSHIMA H. und GOMYODA M. (1991):
Intestinal carriage of *Yersinia pseudotuberculosis* by wild birds and mammals in Japan
Appl. Environ. Microbiol., **57**, 1152-1155

FUKUSHIMA H., NAKAMURA R., IITSUKA S., TSUBOKURA M., OTSUKI K., KAWAOKA Y. (1984):
Prospective systematic study of *Yersinia* spp. in dogs
J. Clin. Microbiol. **19**, 616-622

FUKUSHIMA H., NAKAMURA R., IITSUKA S., ITO Y., SAITO K. (1985):
Presence of zoonotic pathogens simultaneously in dogs and cats
Zbl. Bakt., 1.Abt. Orig. B, **181**, 430-440

FUKUSHIMA H., MARUYAMA K., OMORI I., ITO K., IORIHARA M. (1990):
Kontamination von Schweinen mit Yersinien im Schlachthaus
Fleischwirtschaft **70(11)**, 1330-1335

FUKUSHIMA H., GOMYODA M., KANEKO S. (1991):

Wild animals as the source of infection with *Yersinia pseudotuberculosis* in Shimane Prefecture, Japan

Contrib. Microbiol. Immunol. **12**, 1-4

FUKUSHIMA H., HOSHINA K., ITOWA H., GOMYODA M. (1997):

Introduction into Japan of pathogenic *Yersinia* through imported pork, beef and fowl
Int. J. Food Microbiol. **35**, 205-212

FUKUSHIMA H., TSUNOMORI Y., SEKI R. (2003):

Duplex real-time SYBR Green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools

J. Clin. Microbiol. **41(11)**, 5134-5146

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

Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in groups of swine at slaughter

J. Food Protection **61(6)**, 677-682

GAMBOA F., MANTEROLA J.M., LONCA J., MATAS L., VINADO B., GIMÉNEZ M., CARDONA P.J., PADILLA C., AUSINA V (1997):

Detection and identification of *Mycobacteria* by amplification of RNA and DNA in pretreated blood and bone marrow aspirates by a simple lysis method

J. Clin. Microbiol. **35**, 2124-2128

GIBSON J.R., SUTHERLAND K., OWEN R.J. (1994):

Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*

Lett. Appl. Microbiol. **19**, 357-358

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

A novel method for real time quantitative RT-PCR

Genome Research **6**, 995-1001

GILLILAND G., PERRIN S., BUNN H.F. (1990):

PCR protocols: a guide to methods and applications

Academic Press, San Diego, S. 60-69

GOLDSTEYN-THOMAS E.J., KING R.K., BURCHAK J., GANNON V.P.J. (1991):

Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction

Appl. Environ. Microbiol. **57**, 2576-2580

GOODWIN D.C. und LEE S.B. (1993):

Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR

BioTechniques **15**, 438-444

GOVERDE R.L.J., JANSEN, W.H., BRUNINGS H.A., HUIS J.H.J., MOOL F.R. (1993):

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

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

- GRANFORS K., VILJANEN M., TILIKAINEN A., TOIVANEN (1980):
Persistence of IgM, IgG, and IgA antibodies to *Yersinia* in *Yersinia* Arthritis
J. Infect. Dis. **141**, 424-429
- GRANT T., BENNETT-WOOD V., ROBINS-BROWNE R.M. (1998):
Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* lacking classical virulence markers
Infect. Immun **66(3)**, 1113-1120
- GREINER R. (2004)
Möglichkeiten zur Optimierung einer PCR
Kursunterlagen des Forschungszentrums Karlsruhe, Oktober 2004
- GRIEB, E., MECKELEIN, B., SCHULZ, K., SERANSKI, P., SETZKE, E. (2002):
Isolierung der DNA
In: SCHIMPF (Hrsg.): Gentechnische Methoden
Spektrum Akadem. Verlag Berlin Heidelberg, S. 89-101
- GROSS-BELLARD M., OUDET P., CHAMBOM P. (1973):
Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells
Eur. J. Biochem. **36**, 32-38
- HAHN G. (1989):
Yersinia – Yersiniosen
In: HEESCHEN W. (Hrsg.): Pathogene Mikroorganismen und deren Toxine in
Lebensmitteln tierischer Herkunft
Behr's Verlag, Hamburg, S.127
- HANK C. (2003):
Ein Beitrag zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Hackfleisch und
Fleischerzeugnissen vom Schwein im Hinblick auf die eingesetzten Kultur- und
Isolierungsverfahren
Diss. med. vet., München
- HANNA M.O., ZINK D.L., CARPENTER Z.L., VANDERZANT C. (1976):
Yersinia enterocolitica-like organisms from vacuum-packaged beef and lamb
J. Food Sci. **41**, 1254-1256
- HANNA M.O., STEWART J.C., CARPENTER Z.L., VANDERZANT C. (1977):
Effect of heating, freezing, and pH on *Yersinia enterocolitica*-like organism from meat
J. Food Protect. **40(10)**, 689-692
- HANSKI C., KUSCHKA U., SCHMORANZA 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 O:8 with intestinal mucosa during experimental enteritis
Infect. Immun. **57**, 673-678
- HARNETT N., LIN Y.P., KRISHNAN C. (1996):

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

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

HARTUNG M. und 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

HAYSHIDANI H., KANEKO K., SAKURAI K., OGAWA M. (1995):

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

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

HEESEMANN J. (1990):

Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische Methoden

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

HEESEMANN J. (1994):

Kap. 15.3: Die Gattung *Yersinia*, Yersiniosen

in: BRANDIS H., KÖHLER W., EGGERS H.J., PULVERER G. (Hrsg.): Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 7.Auflage, S. 425-436

HEESEMANN J. und LAUFS R. (1983):

Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid

J. Bacteriol. **155**, 761-767

HEESEMANN J. und GRÜTER L. (1987):

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

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

HEESEMANN J. und KARCH H. (1995):

Diagnostik von Yersiniosen und Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)

Internist, **36**, 102-105

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

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

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

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

Untersuchungen über das Verhalten von *Yersinia enterocolitica* bei unterschiedlichen Temperaturen und verschiedenen Pökelsalzkonzentrationen

Arch. Exper. Vet. med. **38**, 745-750

HELLER M.J. und MORRISON L.E. (1985):

In: KINGSBURY D.T. und FALKOW S. (Hrsg.): Rapid detection and identification of infectious agents

Academic Press, New York, S. 245-256

HIGUCHI R. (1989):

Simple and rapid preparation of samples for PCR

In: ERLICH H.A. (Hrsg.): PCR technology

Stockton Press, New York, S. 31-38

HIGUCHI R. (1992):

4. Simple and rapid preparation of samples for PCR

In: PCR Technology – Principles and applications for DNA amplification

Freeman and Company, New York, S. 31-38

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

Identification of foodborne pathogens by nucleic acid hybridisation

Int. J. Food Microbiol. **12**, 67-76

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

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

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

HOF H. und DÖRRIES R. (2002):

Medizinische Mikrobiologie

Thieme Verlag Stuttgart, 2.Auflage

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

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

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

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

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

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

HOORFAR J., WOLFFS P., RADSTRÖM P. (2004):

Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin

APMIS **112**, 808-814

HUNG T., MAK K., FONG K. (1990):

A specificity enhancer for polymerase chain reaction

Nucleic Acids Research **18**, 4963

HUNTER B.T. (1993):

Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on vakuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef

J. Food Prot. **57**, 204-208

IBELGAUFTS H. (1993):
Gentechnologie von A bis Z
VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim

IBRAHIM A. und REA I.C. (1991):
Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from red meat and milk
J. Food Sci. **56**, 1524-1526

IBRAHIM A., LIESACK W., PIKE S., STACKEBRANDT W. (1992):
The polymerase chain reaction: an epidemiological tool to differentiate between two clusters of pathogenic *Yersinia enterocolitica*
FEMS Microbiol. Lett. **97**, 63-66

IBRAHIM A., LIESACK W., GRIFFITHS M.W., ROBINS-BROWNE R.M. (1997):
Development of a highly specific assay for rapid identification of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* based on PCR amplification of the *Yersinia* heat-stable enterotoxin gene (*yst*)
J. Clin. Microbiol. **35**, 1636-1638

INNIS M.A. und GELFAND D.H. (1990):
Optimization of PCRs
in: INNIS, GELFAND, SNINSKY, WHITE (Hrsg.): PCR Protocols, a guide to methods and applications
Academic Press, San Diego, S. 1-11

ISBERG R.R. (1989):
Mammalian cell adhesion functions and cellular penetration of enteropathogenic *Yersinia* species
Mol. Microbiol. **3**, 1449-1453

IZARD D., HUSSON M.O., VINCENT P., LECLERC H., MONGET D., BOEUFGRAS M. (1984):
Evaluation of the four-hour Rapid 20E system for identification of members of the family Enterobacteriaceae
J. Clin. Microbiol. **20**, 51-54

JACOBS J., JAMMER D., VAN DEVEN J., WAUTERS M., VERMYLEN C., VANDEPITTE J. (1989):
Yersinia enterocolitica in donor blood. A case report and review
J. Clin. Microbiol. **27**, 1119-1121

JACOBSEN N.R., BOGANOVICH T., SKURNIK M., LÜBECK P.S., AHRENS P., HOORFAR J. (2005):
A real-time PCR assay for the specific identification of serotype O:9 of *Yersinia enterocolitica*
J. Microbiol. Meth. **63**, 151-156

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

- Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Norwegian prok products determined by a PCR method and traditional culturing method
Int. J. Food Microbiol. **54**, 75-80
- JOHNS M.B. und PAULUS-THOMAS J.E. (1989):
Purification of human genomic DNA from whole blood using sodium perchlorate in place of phenol
Anal. Biochem. **180**, 276-278
- JOTHIKUMARD N. und GRIFFITHS M.W. (2002):
Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex real-time PCR assays
Appl. Environ. Microbiol. **68**, 3169-3171
- JOURDAN A.D., JOHNSON S.C., WESLEY I.V. (2000):
Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the *ail* gene of pathogenic *Yersinia enterocolitica*
Appl. Environ. Microbiol. **66**, 3750-3755
- JUNG R., SOONDRUM K., NEUMAIER M. (2000):
Quantitative PCR
Clin. Chem. Lab. Med. **38(9)**, 833-836
- KANEKO S., ISHIZAKI N., KOKUBO Y. (1995):
Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in pork using the polymerase chain reaction
Contrib. Microbiol. Immunol. **13**, 156-157
- KAPPERUD G. (1981):
Survey on the reservoirs of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria in Scandinavia
Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B, **89**, 29-35
- KAPPERUD G. (1991):
Yersinia enterocolitica in food hygiene
Int. J. Food Microbiol. **12**, 53-66
- KAPPERUD G. und BERGAN T. (1984):
Biochemical and serological characterization of *Yersinia enterocolitica*
In: BERGAN T. und NORRIS J.R. (Hrsg.): Methods in microbiology
Academic Press, London **15**, S. 295-344
- KAPPERUD G., NAMORK E., SKURNIK M., NESBAKKEN T. (1987):
Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein YEP1 and possible importance for pathogenesis
Infect. Immun. **55**, 2247-2254
- KAPPERUD G., VARDUND T., SKJERVE E., HORNES E., MICHALSEN T.E. (1993):

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reactions and colorimetric detection of amplified DNA
Appl. Environ. Microbiol. **59**, 2938-2944

KARIB H. und SEEGER H. (1994):
Vorkommen von Yersinien- und *Campylobacter*-Arten in Lebensmitteln
Fleischwirtschaft **74**, 1104-1106

KAWAOKA Y., OTSOKI K., TSUBOKURA M. (1982):
Temperature-dependent variation in the synthesis of the receptor for *Yersinia enterocolitica* bacteriophage X1
Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg., 1. Abt. Orig. A, **253**, 364-369

KAY E.R.M., SIMMONS N.S., DOUNCE A.L. (1952):
An improved preparation of sodium desoxyribonucleate
J. Am. Chem. Soc. **74**, 1724-1726

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

KLEEBERGER A. und BUSSE M. (1975):
Total count and bacterial flora of minced meat with special reference to Enterobacteriaceae and Pseudomonads
Z. Lebensm. Unters. Forsch. **158**, 321-331

KNEMEYER J.-P., MARME N., SAUER M. (2000):
Probes for detection of specific DNA sequences at the single-molecule level
Anal. Chem. **72**, 3717-3724

KNUTSSON R., BLIXT Y., GRAGE H., BORCH E., RADSTRÖM P. (2002a):
Evaluation of selective enrichment PCR procedures for *Yersinia enterocolitica*
Int. J. Food Microbiol. **73**, 35-46

KNUTSSON R., FONTANESI M., GRAGE H., RADSTRÖM P. (2002b):
Development of a PCR-compatible enrichment medium for *Yersinia enterocolitica*: amplification precision and dynamic detection range during cultivation
Int. J. Food Microbiol. **72**, 185-206

KOCH C.U. (2003):
Ein Beitrag zur Epidemiologie und Verbreitung von pathogenen *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in Münchener Metzgereien
Diss. med. vet., München

KONDOLO K. und WAUTERS G. (1985):
Pyrazinamidase activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms
J. Clin. Microbiol. **21**, 980-982

KRAUSS H., WEBER A., EUDERS B., SCHIEFER H.G., SLENCZKA W., ZAHNER H. (1997):

Enterale Yersiniosen, Lehrbuch über Zoonosen
Deutscher Ärzte Verlag, Köln, 2.Auflage, S. 89-92

KRONBERG A. (1998):

DNA Replication
Freeman, San Francisco

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

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled polynucleotide probes

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

KWOK S. und HIGUCHI R. (1989):

Avoiding false positives with PCR
Nature **18**, 237-238

LAIRD W.J. und CAVANAUGH D.C. (1980):

Correlation of autoagglutination and virulence of *Yersiniae*
J. Clin. Microbiol. **11**, 430-432

LANTZ P.-G. (1998):

PCR-based detection of microorganisms in complex biological samples
Thesis, Department of Applied Microbiology, Lund University, Sweden

LANTZ P.-G., HAHN-HÄGERDAL B., RADSTRÖM P. (1994):

Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens
Trends Food Sci. Technol. **5**, 384-389

LANTZ P.-G., MATSSON M., WADSTRÖM T., RADSTRÖM P. (1997):

Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR

J. Microbiol. Methods **28**, 159-167

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

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

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

Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples

Biotechnology Annual Review **5**, 87-130

LEE W.H., VANDERZANT C., STERN N. (1981):

The occurrence of *Yersinia enterocolitica* in foods
In: BOTTONE E.J. (Hrsg.): *Yersinia enterocolitica*
CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, S. 161-171

LEE L.A., TAYLOR J., CARTER G.P., QUINN B., FARMER J.J., TAUXE R.V. (1991):
Yersinia enterocolitica O:3: an emerging cause of pediatric gastroenteritis in the
United States. The *Yersinia enterocolitica* Collaborative Study Group
J. Infect. Dis. **163**, 660-663

LEWINGTON J., GREENAWAY S.D., SPILLANE B.J. (1987):
Rapid small scale preparation of bacterial genomic DNA, suitable for cloning and
hybridization analysis
Lett. Appl. Microbiol. **5**, 51-53

LIEDTKE W., OPALKA B., ZIMMERMANN W., SCHMID E. (1994):
Different methods of sample preparation influence sensitivity of *Mycobacterium*
tuberculosis and *Borrelia burgdorferi* PCR
PCR Methods Appl. **3**, 301-304

LINDQVIST R. (1997):
Preparation of PCR samples from food by a rapid and simple centrifugation
technique evaluated by detection of *Escherichia coli* O157:H7
Int. J. Food Microbiol. **37**, 73-82

LIVAK, K. J., FLOOD S. J. A., MARMARO J., GIUSTI W., DEETZ K. (1995):
Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched
system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.
PCR Methods Appl. **4**, 357-362

LOCATELLI G., SANTORO F., VEGLIA F., GOBBI A., LUSSO P., MALNATI M.S.
(2000):
Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA
J. Clin. Microbiol. **38**, 4042-4048

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 influence of alkali
treatment on their isolation
Int. J. Food Microbiol. **33**, 257-274

LUDES A. und WEISS R. (1984):
Zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* bei Schafen
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **97**, 198-202

LÜCKE F.-K. und TEN BOSCH C. (1998):
Möglichkeiten und Grenzen für den Einsatz der PCR zum Nachweis und zur
Typisierung lebensmittelhygienisch relevanter Bakterien
Dt. Lebensmittel-Rundschau **6**, 182-187

MAAS M. und DAHLHOFF K. (1994):
Comparison of sample preparation methods for detection of *Chlamydia pneumoniae*
in bronchoalveolar lavage fluid by PCR
J. Clin. Microbiol. **32**, 2616-2619

- MACKAY I.M. (2004):
Real-time PCR in the microbiology laboratory
Clin. Microbiol. Infect. **10**, 190-212
- MACKAY I.M., ARDEN K.E., NITSCHKE A. (2002):
Real-time PCR in virology
Nucleic Acids Res. **30(6)**, 1292-1305
- MÄKI-IKOLA O., HEESEMANN J., TOIVANEN A., GRANFORS K. (1997):
High frequency of *Yersinia* antibodies in healthy populations in Finland and Germany
Rheumat. Int. **16**, 227-229
- MAHONY J., CHONG S., JANG D., LUINSTRA K., FAUGHT M., DALBY D. (1998):
Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity.
J. Clin. Microbiol. **36**, 3122–3126
- MALORNY B., TASSIOS P.T., RADSTRÖM P., COOK N., WAGNER M., HOORFAR J. (2003):
Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens
Int. J. Food Microbiol. **83**, 39-48
- MARMUR J. (1961):
A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms
J. Mol. Biol. **3**, 208-218
- MARTIN G.P. und TIMMERS E. (1997):
6. PCR and its modifications for the detection of infectious diseases
In: Nucleic Acid Amplification Technologies
Eaton Publishing, Natick, USA, S. 79-99
- MC HALE R.H., STAPLETON P.M., BERQUIST P.L. (1991):
Rapid preparation of blood and tissue samples for polymerase chain reaction
Bio Techniques **10**, 20-22
- MC KILLIP J. und DRAKE M. (2004):
Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food
J. Food Protection **67**, 823-832
- MC PHERSON M.J. und MOLLER S.G. (2000):
Analysis, sequencing and in vitro expression of PCR products
In: PCR
Springer Verlag, New York, S. 169-174
- MERCIER B., GAUCHER O., FEUGEAS O., MAZURIER C. (1990):
Direct PCR from whole blood, without DNA extraction
Nucleic Acid Res. **18**, 5908

- MERK S. (2000):
Einfluss von Probenaufbereitung und Probenmatrix auf die PCR-Diagnostik von bakteriellen Zoonoseerregern am Beispiel der Modellpathogene *Burkholderia cepacia* und *Yersinia enterocolitica*
Diss. med. vet., Hannover
- MILLER V.L. und 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 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(1)**, 121-131
- MOLLARET H. (1976):
Contribution à l'étude épidémiologique des infections à *Yersinia enterocolitica*
Mèd. Malad. Infect. **6**, 442-448
- 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
- MORRISON T.B., WEIS J.J., WITTEWER C.T. (1998):
Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification
Biotechniques **24**, 954-962
- MÜLLER H.-J. und BRUCHHAUS I. (1997):
Problematik der Isolierung genomischer DNA
Biospektrum **3**, 68-73
- MULLIS K., FALOONA F., SCHARF S., SAIKI R., HORN G., ERLICH H. (1986):
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **51**, 263-273
- MURIANA P.M. (2002):
Yersinia-virulence and pathogenesis
Veröffentlichung aus dem Internet unter www.okstate.edu/ag/fapc/fsw/yersinia
- N.N. (1996):
ANONYMOUS: Yersiniosis: another unwelcome holiday guest
Food Prot. Rep. **12**, 1-2
- NAKAJIMA H., INOUE M., MORI T., ITOH K.-I., ARAKAWA E., WATANABE H. (1992):
Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method
J. Clin. Microbiol. **30**, 2484-2486

- NATTERMANN H. (1986):
Untersuchungen zur Diagnostik, Epizootiologie, Pathogenese und Klinik der *Yersinia enterocolitica*-Infektion bei Schweinen, Rindern, Hühnern und Hunden
Diss. med. vet., HU Berlin
- NATTERMANN H., HORSCH F., SEEGER M., DEE W., SCHLINGMANN G., SCHLINGMANN H. (1985):
Epizootiologie der *Yersinia enterocolitica* Infektion in einem Schweinebestand
Mh. Vet. Med. **40**, 366-370
- NATTERMANN H., HORSCH F., DEE W., ORTMANN G. (1986a):
Die *Yersinia enterocolitica* Infektion bei landwirtschaftlichen Nutztieren
Mh. Vet. Med. **41**, 23-26
- NATTERMANN H., DEDEK J., LOEPELMANN H. (1986b):
Serologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* beim Schwarzwild
Mh. Vet. Med., **41**, 565-567
- NAZARENKO I.A., BHATNAGAR S.K., HOHMANN R.J. (1997):
A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer
Nucleic Acids Res. **25**, 2516-2521
- NAZARENKO I., LOWE B., DARFLER M., IKONOMI P., SCHUSTER D., RASCHTCHIAN A. (2002):
Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore
Nucleic Acids Res. **30**, e37
- NESBAKKEN T. (1985):
Comparison of sampling and isolation procedures for recovery of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 from the oral cavity of slaughter pigs
Acta Vet. Scand. **26**, 127-135
- 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. und SKJERVE E. (1996):
Interruption of microbial cycles in farm animals from farm to table
Meat Science **43**, 47-57
- NESBAKKEN H., GONDROSEN B., KAPPERUD G. (1985):

Investigation of *Yersinia enterocolitica*-like bacteria, and thermotolerant Campylobacters in Norwegian pork products
Int. J. Food Microbiol. **1**, 311-320

NESBAKKEN T., KAPPERUD G., DOMMARSNES K., SKURNIK M., HORNES E., (1991):
Comparative study of a DNA hybridization method and two isolation procedures for detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 in naturally contaminated pork products
Appl. Environ. Microbiol. **57**, 389-394

NEUBAUER H., HENSEL A., ALEKSIC S., MEYER H. (2000a):
Identification of *Yersinia enterocolitica* within the genus *Yersinia*
System. Appl. Microbiol. **23**, 58-62

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

NEUBAUER H., HENSEL A., ALEKSIC S., FINKE E.-J., MEYER H. (2000c):
Yersinia enterocolitica 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three different homology clusters
Int. J. Med. Microbiol. **290**, 61-64

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

NEWTON C.R. und GRAHAM A. (1997):
In: PCR
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 3.Auflage, S. 19-46

NIELSEN B., HEISEL C., WINGSTRAND A. (1996):
Time course of the serological response to *Yersinia enterocolitica* O:3 in experimentally infected pigs
Vet. Microbiol. **48**, 293-303

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

NORTJE G.L., VORSTER S.M., GREEBE R.P., STEYN P.L. (1999):
Occurrence of *Bacillus cereus* and *Yersinia enterocolitica* in South African retail meats
Food Microbiol. **16**, 213-217

OGDEN R.C. und ADAMS D.A. (1987):
Electrophoresis in agarose and acrylamide gels

Methods Enzymol. **152**, 61-87

OHARA M., KUROSU Y., ESUMI M. (1994):
Direct PCR of whole blood and hair shafts by microwave treatment
BioTechniques **17**, 726-728

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

OLSVIK O., POPOVIC T., CUDJOE K.S., HORNES E., UGELSTAD J., UHLEN M.
(1994):
Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology
Clin. Microbiol. Rev. **7**, 43-54

OVERMAN T.L., PLUMLEY D., OVERMAN S.B., GOODMAN N.L. (1985):
Comparison of the API rapid E four-hour system with the API 20E overnight system
for the identification of routine clinical isolates of the family Enterobacteriaceae
J. Clin. Microbiol. **21**, 542-545

ÖZBAS Z.Y., LEHNER A., WAGNER M. (2000):
Development of a multiplex and semi-nested PCR assay for detection of *Yersinia*
enterocolitica and *Aeromonas hydrophila* in raw milk
Food Microbiol. **17**, 197-203

PAI C.H., MORS V., SEEMAYER T.A. (1980):
Experimental *Yersinia enterocolitica*-enteritis in rabbits
Infect. Immun. **28**, 238

PELLUDAT C., HOGART M., HEESEMANN J. (2002):
Transfer of the core region genes of the *Yersinia enterocolitica* WA-C serotype O:8
high-pathogenicity island to *Yersinia enterocolitica* MRS40, a strain with low levels of
pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhances mouse
virulence
Infect. Immun. **70**, 1832-1841

PEPE C.J. und MILLER V.L. (1993):
Yersinia enterocolitica invasin: A primary role in the initiation of infection
Microbiol. **90**, 6473-6477

PEPE J.C., BADGER J.L., MILLER V.L. (1994):
Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica*
inv gene
Mol. Microbiol. **11**, 123-135

PEPE J.C., WACHTEL M.R., WAGAR E., MILLER V.L. (1995):
Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c
mouse model of infection
Infect. Immun. **63**, 4837-4848

- PFAFFL M.W., HORGAN G.W., DEMPFLER L. (2002):
Relative expression software tool (REST®) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR
Nucleic Acids Res. **30**, e36
- PICHHARDT K. (1989):
Lebensmittelmikrobiologie – Grundlagen für die Praxis
Springer Verlag, Berlin, 4. Auflage
- PIERSON D. und FALKOW S. (1990):
Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional *inv*-homologous sequences
Infect. Immun. **58**, 1059-1064
- POWELL H.A., GOODING C.M., GARRETT S.D., LUND B.M., MCKEE R.A. (1994):
Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction
Lett. Appl. Microbiol. **18**, 59-61
- PSCHYREMBL (2002):
Pschyrembl Klinisches Wörterbuch
de Gruyter, Berlin New York, 259. Auflage, S. 1432
- RAMESH A., PADMAPRIYA B.P., CHANDRASHEKAR A., VARADARAJ M.C. (2002):
Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples
Mol. Cell. Probes **16**, 307-314
- RAPPOLEE D.A. (1990):
Optimizing the sensitivity of RT-PCR
Amplifications A forum for PCR Users **4**, 5-7
- RASMUSSEN H.N., RASMUSSEN O.F., ANDERSEN J.K., OLSEN J.E. (1994):
Specific detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by two-step PCR using hot-start and DMSO
Mol. Cell. Probes **8**, 99-108
- RILEY G. und TOMA S. (1989):
Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using congo red-magnesium oxalate agar medium
J. Clin. Microbiol. **27(1)**, 213-214
- ROBINS-BROWNE R.M. (1997):
Yersinia enterocolitica
In: DOYLE M.P., BEUCHAT L.R., MONTVILLE T.J. (Hrsg.): Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers
American Society for Microbiology Press, Washington D.C, S. 192-215
- ROBINS-BROWNE R.M. (2001):

Yersinia enterocolitica

In: DOYLE M.P., BEUCHAT L.R., MONTVILLE T.J. (Hrsg.): Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers
American Society for Microbiology Press, Washington D.C., 2. Auflage, S. 215-245

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

ROSSEN L., NORSKOV P., HOLMSTROM. K., RASMUSSEN O.F. (1992):
Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions
Int. J. Food Microbiol. **17**, 37-45

ROTH A., MAUCH H., GÖBEL U.B. (2001):
Kontrollen
In: Nukleinsäure-Amplifikationstechniken, MIQ 1, Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik
Urban & Fischer Verlag, München, Jena, S. 16-17

SAGNER G., GOLDSTEIN C., VAN MILTENBURG R. (1999):
Detection of multiple reporter dyes in real-time, online PCR analysis with the LightCycler®System
Biochemica **2**, 7-11

SAIKI R.K. (1990):
Amplifikation of Genomic DNA
in: INNIS, GELFAND, SNINSKY, WHITE (Hrsg): PCR Protocols, A guide to methods and applications
Academic Press, San Diego, S. 13-20

SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A. (1988):
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase
Science **239**, 487-491

SALYERS A.A. und WHITT D.D. (2002):
Yersinia pestis, the cause of plague, and its relatives
In: SALYERS A.A. and WHITT D.D. (Hrsg.): Bacterial pathogenesis: a molecular approach
American Society for Microbiology Press, Washington D.C., 2. Auflage, S. 202-215

SAMADI A.R., WACHSMUTH K., HUY M.I., MAHBUB M., AGBONLAHOR D.E. (1982):
An attempt to detect *Yersinia enterocolitica* infection in Dacca, Bangladesh
Trop. Geogr. Med. **34**, 151-154

SANDERY M., STINEAR T., KAUCNER C. (1996):
Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in environmental waters by PCR
J. Appl. Bact. **80**, 327-332

- SATSANGI J., JEWELL D.P., WELSH K., BUNCE M., BELL J.I. (1994):
Effect of heparin on polymerase chain reaction
Lancet **343**, 1509-1510
- SCHEU P. (1999):
Entwicklung eines spezifischen Nachweissystems für Salmonellen in Lebensmitteln auf Grundlage der PCR
Diss. rer. nat., Berlin
- SCHEU P.M., BERGHOF K., STAHL U. (1998):
Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction
Food Microbiology **15**, 13-31
- SCHIEMANN D.A. (1979):
Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*
Can. J. Microbiol **25**, 1298-1304
- SCHIEMANN D.A. (1980):
Isolation of toxigenic *Yersinia enterocolitica* from retail pork products
J. Food Prot. **43**, 360-365
- SCHIEMANN D.A. (1989):
Yersinia enterocolitica and *Yersinia pseudotuberculosis*
In: DOYLE M.P. (Hrsg): *Foodborne bacterial pathogens*
Marcel Dekker, New York, S. 601-672
- SCHIEMANN D.A. und DEVENISH J.A. (1982):
Relationship of HeLa-cell infectivity to biochemical, serological and virulence characteristics of *Yersinia enterocolitica*
Infect. Immun. **35**, 497-506
- SCHOCHETMAN G., OU C., JONES W.K. (1988):
Polymerase chain reaction
J. Infect. Dis. **158**, 1154-1157
- SCHWÄGELE F. (1999):
Polymerase Chain Reaction – PCR, Möglichkeiten und Grenzen der Anwendung in der Lebensmittelanalytik
Fleischwirtschaft **1**, 121-123
- SELVIN P. (1995):
Fluorescence resonance energy transfer
Meth. Enzymol. **246**, 300-334
- SHIOZAWA K., NISHINA T., MIWA Y., MORI T., AKAHANE S., ITO K. (1991):
Colonization in the tonsils of swine by *Yersinia enterocolitica*
Contrib. Microbiol. Immunol. **12**, 63-67
- SIEBERT P.D. und LARRICK J.W. (1992):
Competitive PCR

Nature **359**, 557-558

SKJERVE E., LIUM B., NIELSEN B., NESBAKKEN T. (1998):
Control of *Yersinia enterocolitica* in pigs at herd level
Int. J. Food Microbiol. Immunol. **45**, 195-203

SKURNIK M. und TOIVANEN P. (1992):
LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*
J. Bacteriol. **147**, 2047-2051

STEFANOV I. und BOZHKOVA k. (1998):
Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from retail minced meat
Bulgarian Journal of agricultural science **4**, 547-550

STENGEL G. (1983):
Ein Beitrag zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica*
Diss. med. vet., FU Berlin

STENGEL G. (1986):
Zur Diagnostik und Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Wasser
J. Vet. Med. B., **33**, 82-92

STOLL L. (1988):
Bakteriologische und serologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* bei Mensch und Schwein in Südhessen
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **88**, 184-187

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

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

STRYER L. und HAUGLAND R.P. (1967):
Energy transfer: a spectroscopic ruler
Proc. Natl. Acad. Sci. **58**, 719-726

SZITA J., KALI M., REDEY B. (1973):
Incidence of *Yersinia enterocolitica* infection in Hungary
Contrib. Microbiol. Immunol. **2**, 106-110

TAUXE R.V., VANDEPITTE J., WAUTERS G., MARTIN S.M., GOOSSENS V., DE
MOL P., VAN NOYEN R., THIERS G. (1987):
Yersinia enterocolitica infections and pork: the missing link

Lancet **1**, 1129-1132

TENNANT S.M., SKINNER N.A., JOE A., ROBINS-BROWNE R.M. (2003):
Yersinia enterocolitica biotype A: not as harmless as you think
Advances in Experimental Medical Biology **529**, 125-128

THELWELL N., MILLINGTON S., SOLINAS A., BOOTH J., BROWN T. (2000):
Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection
Nucleic Acids Res. **28**, 3752-3761

THIBODEAU V., FROST E.H., CHENIER S., QUEESAY S. (1999):
Presence of *Yersinia enterocolitica* in tissues of orally inoculated pigs and the tonsils
and faeces of pigs at slaughter
Can. J. Vet. Res. **63**, 96-100

THISTED LAMBERTZ S. (2005):
Development of a PCR-based method for detection of pathogenic *Yersinia*
enterocolitica in pork
Doctoral thesis No. 2005:123

THISTED LAMBERTZ S. und DANIELSSON-THAM M.-L. (2005):
Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by
PCR and pulsed-field gel electrophoresis
App. Environ. Microbiol. **71**, 3674-3681

THISTED LAMBERTZ S., LINDQVIST R., BALLAGI-PORDANY A., DANIELSSON-
THAM M.-L. (2000):
A combined culture and PCR method for detection of pathogenic *Yersinia*
enterocolitica in food
Int. J. Food Microbiol. **57**, 63-73

THISTED LAMBERTZ S., GRANATH K., FREDRIKSSON-AHOMAA M.,
JOHANSSON K.-E., DANIELSSON-THAM M.-L. (2006):
Evaluation of a combined culture and PCR method for detection of pathogenic
Yersinia enterocolitica in food
in manuskript

THOERNER P., BIN KINGOMBE C.I., BÖGLI-STUBER K., BISSIG-CHOISAT B.,
WASSENAAR T.M., FREY J., JEMMI T. (2003):
PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia*
pseudotuberculosis and investigation of virulence gene distribution
Appl. Environ. Microbiol. **69**, 1810-1816

TINDALL K.R. und KUNKEL T.A. (1988):
Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase
Biochemistry **27**, 6008-6013

TJERNELD F. (1992):
Aqueous two-phase partitioning on an industrial scale
In: HARRIS J.M.(Hrsg): Poly(ethylen glycol) chemistry: biotechnical and biomedical
applications

Plenum Press, New York, USA

TODD A.V. FUERY C.J., IMPEY H.L., APPLGATE T.L., HAUGHTON M.A. (2000):
DzyNA-PCR. Use of DNAzyme to detect and quantify nucleic acid sequences in a
real-time fluorescent format
Clin. Chem. **46**, 625-630

TOMA S. und DEIDRICK V.R. (1975):
Isolation of *Yersinia enterocolitica* from swine
J. Clin. Microbiol. **2**, 478-481

TOORA S., BUDU-AMOAKO A., ABLETT R.F., SMITH J. (1992):
Effect of high-temperature short-time pasteurisation, freezing and thawing and
constant freezing, on survival of *Yersinia enterocolitica* in milk
J. Food Prot. **55**, 803-805

TRAVAGLINI E.C.(1973):
Methods for the extraction and purification of desoxyribonucleic acids from eukaryote
cells
Methods Cell Biol. **7**, 105-127

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

TYAGI S. und KRAMER F.R. (1996):
Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization
Nat. Biotech. **14**, 303-308

TYAGI S., BRATU D.P., KRAMER F.R. (1998):
Multicolor molecular beacons for allele discrimination
Nat. Biotech. **16**, 49-53

TYLER K.D., WANG G., TYLER S.D., JOHNSON A.W. (1997):
Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA
fingerprinting of representative bacterial pathogens
J. Clin. Microbiol. **35**, 339-346

VELAZQUEZ L.D.C., ESCUDERO M.A., DE GUZMAN A.M. (1993):
Biovars, serovars, and phagovars of *Yersinia enterocolitica* isolated from 450
samples of cold food in San Luis, Argentina
J. Food Prot. **56**, 333-335

VISHNUBHATLA A., FUNG D.Y.C., OBERST R.D., HAYS M.P., NAGARAJA T.G.,
FLOOD S.J.A. (2000):
Rapid 5'Nuclease (TaqMan) assay for detection of virulent strains of *Yersinia
enterocolitica*
Appl. Environ. Microbiol. **66**, 4131-4135

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

Evaluation of a 5'nuclease (TaqMan) assay for the detection of virulent *Yersinia enterocolitica* in raw meat and tofu samples

J. Food Prot. **64**, 355-360

VON HAESELER A. und LIEBERS D. (2003):

Fischer Kompakt, Molekulare Evolution

Fischer Taschenbuch Verlag, S. 96

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

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

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

WALL S.J. und EDWARDS D.R. (2002):

Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): a comparison of primer-dropping, competitive, and real-time RT-PCRs

Anal. Biochem. **300**, 269-273

WALLACE D.M. (1987):

Precipitation of nucleic acids

Methods Enzymol. **152**, 41-48

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

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

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

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

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

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

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. (1973):

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

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

WAUTERS G. (1979):

Carriage of *Y. enterocolitica* serotyp 3 in pigs as a source of human infection

Contr. Microbiol. Immunol. **5**, 249-252

WAUTERS, G., KANDOLO K., JASSENS M. (1987):

Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*

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

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

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

Appl. Environ. Microbiol. 1988, 851-854

WAUTERS G., ALEKSIC S., CHARLIER J., SCHULZE G. (1991):

Somatic and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related species

Contrib. Microbiol. Immunol. **12**, 239-243

WEBER A., (1985):

Welche Rolle spielen Hunde und Katzen im Zusammenhang mit *Yersinia enterocolitica*-Infektionen des Menschen?

Öff. Gesundheitswesen **47**, 111-113

WERNARS K., HEUVELMAN C.J., CHAKRABORY T., NOTERMAN S.H.W. (1991):
Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese

J. Appl. Bacteriol. **70**, 121-126

WEYNANTS V., JADOT V., DENOEL P.A., TIBOR A., LETESSON J.-J. (1996):

Detection of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 by a PCR method

J. Clin. Microbiol. **34**, 1224-1227

WHELAN A.C. und PERSING D.H. (1996):

The role of nucleic acid amplification and detection in the clinical microbiology laboratory

Annu. Rev. Genet. **50**, 349-373

WHITCOMBE D., BROWNE J., GILLARD H.L., MCKEENIE D., THEAKER J. (1998):
A homogenous fluorescence assay for PCR amplicons: its application to real-time, single-tube genotyping

Clin. Chem. **44**, 918-923

WHITCOMBE D., THEAKER J., GUY S.P., BROWN T., LITTLE S. (1999)

Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence

Nat. Biotechnol. **17**, 804-807

WILHELM J. und PINGOUD A. (2003):

Real-time polymerase chain reaction

ChemBiochem. **4(11)**, 1120-1128

WILSON I.G. (1997):

Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification

Appl. Environ. Microbiol. **63**, 3741-3751

WILSON I.G., COOPER J.E., GILMOUR A. (1991):

Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes *entB* and *entC1* and the thermonuclease gene *muc*

Appl. Environ. Microbiol. **57**, 1793-1798

WILSON I.G., GILMOUR A., COOPER J.E. (1993):

Detection of enterotoxigenic microorganisms in food by PCR
In: KROLL R.G., GILMOUR A., SUSSMAN M. (Hrsg.): New techniques in food and beverage microbiology
Scientific Publishers, Blackwell Oxford, United Kingdom

WILSON I.G., COOPER J.E., GILMOUR A. (1994):
Some factors inhibiting amplification of the *Staphylococcus aureus* enterotoxin C1 (*sec⁺*) by PCR
Int. J. Food Microbiol. **22**, 55-62

WITTEWER C.T., HERRMANN M.G., MOSS A.A., RASMUSSEN R.P. (1997):
Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification
Biotechniques **22**, 130-138

WITTEWER C.T., HERRMANN, M.G., GUNDRY C.N., ELENITOBA-JOHNSON K.S.J. (2001):
Real-time multiplex PCR assays
Methods **25**, 430-442

WOLFFS P., KNUTSSON R., NORLING B., RÅDSTROM P. (2004):
Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, flotation, prior to real-time PCR
J. Clin. Microbiol. **42(3)**, 1042-1047

WOLFFS P., NORLING B., RÅDSTRÖM P. (2005):
Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells
J. Microbiol. Meth. **60**, 315-323

WREN B.W. und TABAQCHALI S. (1990):
Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction
Lancet **336**, 693

WRIGHT P.A. und WYNFORD-THOMAS D. (1990):
The polymerase chain reaction: miracle of mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research
J. Pathol. **162**, 99-117

YANAGAWA Y., MARUYAMA T., SAKAI s. (1978):
Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from healthy dogs and cats
Microbiol. Immunol. **22**, 643-646

ZHANG Y., TOIVANEN A., TOIVANEN P. (1997):
Experimental *Yersinia* triggered reactive arthritis: effect of a three week course of ciprofloxacin
Brit. J. Rheumatol. **81**, 681-684

SONSTIGE LITERATURQUELLEN

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Dezember 2004

Untersuchung von Lebensmitteln

Horizontales Verfahren zum Nachweis von präsumptiv pathogenen *Yersinia enterocolitica*, L 00.00.90

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (1990):

Yersinia enterocolitica infections during the holidays in black families – Georgia
Morbidity and Mortality Weekly Report **39**, 819-820

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (1991):

Update: *Yersinia enterocolitica* bacteremia and endotoxin shock associated with red blood cell transfusion – United States
Morbidity and Mortality Weekly Report **40**, 176-178

International Organisation for Standardisation (1994):

Microbiology – general guidance for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*. ISO 10273

International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland

NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS, NCFA (1996):

Yersinia enterocolitica – Detection in foods

Method 117, 3rd edition

Nordic committee on food analysis, Oslo

NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS, NCFA (1998):

Pathogenic *Yersinia enterocolitica*. PCR methods for detection in foods

Method Nr. 163, 1998

Nordic committee on food analysis, Oslo

NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS, NCFA (2003):

Yersinia enterocolitica – Detection in foods

Method 117, 4th edition

Nordic committee on food analysis, Oslo

ROBERT KOCH INSTITUT (1999):

Stellungnahme des Arbeitskreises Blut: *Yersinia enterocolitica*

Veröffentlichung aus dem Internet des Robert Koch Institut

(www.rki.de)

ROBERT KOCH INSTITUT (2002a):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002

ROBERT KOCH INSTITUT (2002b):

Bakterielle Gastroenteritiden in Deutschland 2001

Epidemiologisches Bulletin **50**, 442

ROBERT KOCH INSTITUT (2003):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2003

ROBERT KOCH INSTITUT (2004a):

Bakterielle Gastroenteritiden Situationsbericht 2003

Epidemiologisches Bulletin **31**, 253-254

ROBERT KOCH INSTITUT (2004b):
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2004

ROBERT KOCH INSTITUT (2005):
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2005

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Charakteristische Eigenschaften verschiedener <i>Yersinia</i> -Spezies	5
Tabelle 2: Biotypisierung von <i>Y. enterocolitica</i> -Stämmen	6
Tabelle 3: Häufigkeiten und Serotypverteilung gemeldeter <i>Y. enterocolitica</i> - Infektionen beim Menschen	16
Tabelle 4: Nachweis von pathogenen <i>Y. enterocolitica</i> in verschiedenen Fleischprodukten	20
Tabelle 5: PCR-Methoden zum Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> in Lebensmitteln oder Kultur	32
Tabelle 6: Real-Time PCR-Methoden zum Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i>	33
Tabelle 7: Übersicht über kommerziell erhältliche Kits zur Extraktion von DNA aus Lebensmitteln.....	47
Tabelle 8: Methoden der Probenvorbereitung einiger PCR-Methoden zum Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> in Lebensmitteln	48
Tabelle 9: Gliederung der verschiedenen Arbeitsteile mit Zielsetzung	64
Tabelle 10: Pipettierschema für 1x-Mastermix.....	66
Tabelle 11: Pipettierschema für 1,25x-Mastermix.....	67
Tabelle 12: Pipettierschema für 1,5x-Mastermix.....	67
Tabelle 13: Pipettierschema für die SYBR Green Real-Time PCR.....	69
Tabelle 14: Pipettierschema für die TaqMan Real-Time PCR.....	71
Tabelle 15: Pipettierschema für die konventionelle Multiplex-PCR.....	73
Tabelle 16: Berechnung der Keimzahl mittels Tropfplattenverfahren	92
Tabelle 17: Anzahl und niedrigste C_t -Werte <i>ail</i> -positiver Proben nach Aufreinigung mit 6 verschiedenen Methoden und einer Real-Time PCR mit SYBR Green.....	95
Tabelle 18: Anzahl und niedrigste C_t -Werte <i>virF</i> -positiver Proben nach Aufreinigung mit 6 verschiedenen Methoden und einer Real-Time PCR mit SYBR Green.....	95
Tabelle 19: Anzahl und niedrigste C_t -Werte <i>ail</i> -positiver Proben nach Aufreinigung mit 6 verschiedenen Methoden und einer Real-Time PCR mit TaqMan-Sonde.....	97

Tabelle 20: Anzahl positiver Ergebnisse für das <i>ail</i> - und <i>virF</i> -Gen nach Aufreinigung mit 6 verschiedenen Methoden und einer konventionellen PCR	99
Tabelle 21: Kultureller Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> nach Direktausstrich und zwei verschiedenen Anreicherungen auf CIN	100
Tabelle 22: Anzahl (%) von <i>ail</i> -positiven <i>Y. enterocolitica</i> -Proben bei Untersuchung von 150 Fleischproben mit verschiedenen Methoden.....	104
Tabelle 23: C _t -Werte der Proben nach 3 verschiedenen Aufreinigungsmethoden	106
Tabelle 24: Ergebnisse der beimpften Hackfleischproben mit der SYBR Green Real-Time PCR für das <i>ail</i> -Gen	133
Tabelle 25: Ergebnisse der beimpften Hackfleischproben mit der SYBR Green Real-Time PCR für das <i>virF</i> -Gen	134
Tabelle 26: Ergebnisse der beimpften Hackfleischproben mit der TaqMan Real-Time PCR für das <i>ail</i> -Gen	135
Tabelle 27: Ergebnisse der beimpften Hackfleischproben mit der konventionellen PCR für das <i>ail</i> - und <i>virF</i> -Gen.....	136
Tabelle 28: Ergebnisse der Untersuchung von Schweinefleischproben aus dem Handel mittels Kultur, konventioneller PCR, Real-Time PCR mit SYBR Green und Real-Time PCR mit Sonde.....	137

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Untersuchung nach DIN EN ISO 10273	26
Abbildung 2:	Schematische Darstellung einer PCR	36
Abbildung 3:	Darstellung der Fluoreszenzzunahme einer Real-Time PCR.....	50
Abbildung 4:	Darstellung einer Schmelzkurve	51
Abbildung 5:	Markierte Hybridisierungssonde	53
Abbildung 6:	Die Polymerase hydrolysiert die Sonde.	53
Abbildung 7:	Hybridisierungssonde	54
Abbildung 8:	Molecular Beacon.....	55
Abbildung 9:	Sunrise Primer.....	56
Abbildung 10:	Ermittlung des C _t -Wertes..	58
Abbildung 11:	Aufteilung der Probenarten.....	65
Abbildung 12:	Herstellung der Verdünnungsreihe	75
Abbildung 13:	Fließschema zur Vorbereitung.....	77
Abbildung 14:	PCR zur Ermittlung der idealen Mastermix-Konzentration	87
Abbildung 15:	Ermittlung der idealen Primer-Konzentration.....	88
Abbildung 16:	Gradient von 50-60 °C für die <i>ail</i> -Primer in der Real-Time PCR mit SYBR Green.	89
Abbildung 17:	Gradient von 55-60 °C für die <i>virF</i> -Primer in der Real-Time PCR mit SYBR Green.	90
Abbildung 18:	Gradient von 50-60 °C für die Real-Time PCR mit TaqMan-Sonde und Primer <i>ail</i>	91
Abbildung 19:	Real-Time PCR (SYBR Green) des <i>ail</i> -Genes von mit drei verschiedenen Keimzahlen (10 ² , 10 ³ und 10 ⁴ KbE/10 g) beimpften Hackfleischproben, sowie eine nicht-beimpfte Probe, nach 24 h- Anreicherung in TSB und Aufreinigung mit Methode C (Biorad Genomic Tissue Kit).....	96
Abbildung 20:	Konventionelle PCR von mit drei verschiedenen Keimzahlen (10, 10 ² und 10 ³ KbE/10 g) beimpften Hackfleischproben, sowie eine nicht-beimpfte Probe, nach 24 h-Anreicherung in TSB und Aufreinigung mit 6 verschiedenen Methoden	98
Abbildung 21:	Nachweishäufigkeit mittels drei verschiedener kultureller Methoden auf CIN-Agar	100

Abbildung 22: <i>ail</i> -positive Proben (%) mit der SYBR Green Real-Time PCR.....	102
Abbildung 23: <i>ail</i> -positive Proben (%) mit der TaqMan Real-Time PCR	103
Abbildung 24: <i>ail</i> - bzw. <i>virF</i> positive Proben (%) mit der konventionellen PCR.....	104
Abbildung 25: Anteil der verschiedenen Aufreinigungsmethoden an positiven Proben	105
Abbildung 26: Anteil der verschiedenen Aufreinigungsmethoden an mit einer der drei PCR-Methoden positiven rohen bzw. verzehrsfertigen Produkten.....	106

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt:

Vor allem **Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. A. Stolle** für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme am Institut und die jederzeit gewährte Unterstützung und motivierenden Worte bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Frau Dr. M. Fredriksson-Ahomaa** für die Möglichkeit zur Mitarbeit in ihrem Forschungsprojekt und die stets fachkundige und hilfsbereite Betreuung.

Herrn Dr. M. Bucher danke ich für die wertvolle Hilfe, die zahlreichen Ratschläge und die kollegiale Zusammenarbeit, sowie für die fachbezogene Durchsicht meiner Arbeit.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei **Frau Dr. C. Mahler** und **Frau Dr. U. Messelhäuser** (LGL, Oberschleißheim) für die stets freundliche Hilfe und die vielen Ratschläge im Bereich der Molekularbiologie.

Frau H. Dietz, Frau U. Demuth, Frau I. Fitzek, Frau U. Scheffler, Frau S. Holzmann und Frau C. Wendt de la Cruz danke ich ganz herzlich für die Geduld, die jederzeit gewährte Hilfe und die sehr angenehmen Stunden im Bereich der Mikrobiologie.

Allen weiteren **Mitarbeitern des Institutes** danke ich für die stets aufmunternden Worte und die Hilfsbereitschaft bei sämtlichen Fragen.

Herrn G. Stumpp für die große Hilfe bei der Erstellung des Summary, sowie **Herrn R. Arnold** für die Rettung bei diversen Computerproblemen.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinen **Eltern** für die Unterstützung bedanken, ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

LEBENS LAUF

Name	Britta Hartmann
Geburtsdatum	4. März 1979
Geburtsort	Stuttgart
Eltern	Harald Paul Hartmann Helga Hartmann-Claus (geb. Stahl)
Geschwister	Sylvia Fischer

Ausbildung

1985 - 1986	Grundschule Ditzingen
1986 - 1989	Grundschule Laiz
1989 - 1999	Hohenzollern-Gymnasium Sigmaringen
10/1999 - 2/2005	Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
3/2005	Approbation

Berufliche Tätigkeit

4/2005	Beginn der Doktorarbeit am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
11/2005 - 7/2006	Hilfskraft am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
seit 8/2006	Landratsamt Sigmaringen, Fachbereich Veterinärwesen und Verbraucherschutz