

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

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

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

von
Britta Grötzbach
aus Bonn-Bad Godesberg

München 2007

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Stolle
Korreferent: Priv. Doz. Dr. Breuer

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
µM	Mikromol
ail	Attachment invasion locus
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	basepair
bzw.	beziehungsweise
<i>C.</i>	<i>Campylobacter</i>
ca.	circa
CASO	Casein-Sojamehl-Pepton
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
cm	Zentimeter
C _t	Threshold cycle
d	Durchmesser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleicacid
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
et al.	et alli
EFSA	European Food Safety Authority
g	Gramm
GMO	genetically modified organism
H-Antigene	Geißel-Antigene
inv	Invasin-Gen
ITC	Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat
K-Antigene	Kapsel-Antigene
kb	kilobase
KbE	Kolonien bildende Einheiten
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
LPS	Lipopolysaccharide
M	Mol
mg	Milligramm

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	MilliMol
m-TSB	modifizierte Trypton-Soja-Bouillon
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
O-Antigene	Oberflächen-Antigene
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase chain reaction
pYV	plasmid for Yersinia Virulence
r	Radius
rpm	rounds per minute
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
Std	Stunde
T _m	Schmelztemperatur
tPA	Tissue Plasminogen Activator
TSB	Tryptone Soja Nährbouillon
U	Umdrehungen
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>
Yad	<i>Yersinia</i> adhäsion
Yop	<i>Yersinia</i> outer membrane protein
z. B.	zum Beispiel
π	pi

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
LITERATUR	3
1 Molekularbiologischer Nachweis von Bakterien in Lebensmitteln	3
1.1. Kolonie-Hybridisierung.....	4
1.2. PCR.....	8
1.2.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	9
1.2.2 Detektion der PCR-Produkte	13
1.2.3 Vor- und Nachteile der PCR.....	17
1.3. Weitere DNA-basierte Methoden.....	20
2 Allgemeine Eigenschaften von <i>Y. enterocolitica</i>	22
3 Identifikation von pathogener <i>Y. enterocolitica</i>	27
3.1. Bedeutende Virulenzmarker in der molekularbiologischen Diagnostik von pathogener <i>Y. enterocolitica</i>	27
3.2. Einsatz bedeutender Virulenzmarker in der molekularbiologischen Diagnostik von pathogener <i>Y. enterocolitica</i>	29
3.2.1 Kolonie-Hybridisierung	29
3.2.2 PCR.....	33
4 Yersiniose.....	37
4.1. Humane Yersiniosen	37
4.1.1 Epidemiologische Situation der Yersiniose in Deutschland und Europa.....	38
4.1.2 Klinik der Yersiniose	39
4.1.3 Pathogenese der <i>Y. enterocolitica</i> Infektion – Ein Überblick der beteiligten Virulenzfaktoren.....	40
4.2. Yersiniose bei Tieren.....	42
4.2.1 Epidemiologische Situation der Yersiniose bei Nutztieren	42
4.2.2 Yersiniose beim Schwein	43
4.2.3 Yersiniose beim Rind.....	44
4.2.4 Yersiniose bei kleinen Wiederkäuern	44
4.2.5 Yersiniose beim Nutzgeflügel	44
4.2.6 Yersiniose und Epidemiologische Situation bei Haus- und Heimtieren.....	45
5 Verhalten von <i>Y. enterocolitica</i> in Lebensmitteln.....	46

6	Vorkommen von <i>Y. enterocolitica</i> in Lebensmitteln – Situation in Deutschland und Europa	47
6.1.	Prävalenz von pathogener <i>Y. enterocolitica</i> in rohem Schweinefleisch und Rohfleischprodukten.....	50
6.2.	Prävalenz von <i>Y. enterocolitica</i> in rohem Rindfleisch und Rohfleischprodukten.....	52
6.3.	Prävalenz von <i>Y. enterocolitica</i> in rohem Geflügelfleisch und Rohfleischprodukten.....	53
7	Molekularbiologischer Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> in Lebensmitteln .	54
7.1.1	Kolonie-Hybridisierung	54
7.1.2	PCR.....	56
7.1.3	Weitere DNA-basierte Methoden	57
7.1.4	Kultureller Nachweis.....	58
	MATERIAL UND METHODEN	59
8	Material.....	59
9	Methoden.....	60
9.1.	PCR.....	63
9.1.1	SYBR®Green Screening.....	63
9.1.2	Bestätigung mit ailP-Sonde	66
9.2.	Isolierung von <i>Y. enterocolitica</i>	67
9.2.1	Kolonie Hybridisierung.....	67
9.2.2	Kultur	86
	ERGEBNISSE	88
10	Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i>	88
10.1.	Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> in rohem Fleisch und Rohfleischprodukten.....	88
10.2.	Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> bei Rind, Schwein und Geflügel.....	89
10.3.	Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> mit den eingesetzten Untersuchungsverfahren	91
	DISKUSSION	99
11	Prävalenz von <i>Y. enterocolitica</i> in Lebensmitteln in Deutschland und Europa.....	99

12	Prävalenz von <i>Y. enterocolitica</i> in rohem Fleisch und Rohfleisch- produkten.....	102
13	Vergleich der eingesetzten Nachweisverfahren.....	106
14	Falsch positive, falsch negative Ergebnisse	109
	ZUSAMMENFASSUNG.....	113
	SUMMARY	115
	ANHANG	117
15	Arbeitsmaterial und Geräte.....	117
15.1.	Mikrobiologischer Nachweis	117
15.2.	Real-Time PCR	120
15.3.	Kolonie-Hybridisierung.....	121
15.4.	Allgemeine Materialien	128
16	Tabellarische Übersicht der Ergebnisse	131
17	Übersicht der Ergebnisse der Kolonie-Hybridisierungen	143
	LITERATURVERZEICHNIS	145
	TABELLENVERZEICHNIS	166
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	169
	DANKSAGUNG	170
	LEBENS LAUF	171

EINLEITUNG

Yersinia (Y.) enterocolitica ist ein enteropathogener Erreger und verursacht beim Menschen die Yersiniose, eine gastrointestinale Infektion. Sowohl in Deutschland als auch in Europa stand die Yersiniose im Jahr 2005 nach der Campylobacteriose und der Salmonellose auf dem dritten Platz der meldepflichtigen Lebensmittelinfektionen, wobei in 89% der Fälle in Deutschland der pathogene *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 dominierte. Die Symptome der Yersiniose betreffen in der Regel gastrointestinale Beschwerden.

Obwohl die Epidemiologie der *Y. enterocolitica* Infektion noch nicht vollständig geklärt wurde, konnte der bei humanen Yersiniosefällen oft isolierte pathogene Bioserotyp 4/O:3 regelmäßig bei der Tierart Schwein isoliert werden. Aufgrund dessen wird das Schwein als Hauptinfektionsquelle in Zusammenhang mit *Y. enterocolitica* verursachten Lebensmittelinfektionen genannt. Mittels der molekularen Typisierung konnte zudem eine mehr als 80%ige Übereinstimmung zwischen humanen und von Schweinen isolierten Stämmen nachgewiesen werden. Die Prävalenz des Bioserotyps 4/O:3 wird beim Schwein in Süddeutschland mit 60% angegeben.

Daneben wurden pathogene *Y. enterocolitica* Isolate auch bei Geflügel- und Rindfleischproben gefunden. Die Anzahl der Untersuchungen ist allerdings, verglichen zu Prävalenzstudien beim Schwein, weitaus geringer, und die Prävalenzdaten dieser Tierarten wurden meist durch kulturelle Methoden ermittelt. Zudem konnte in Einzelstudien gezeigt werden, dass neuere DNA-basierte Methoden wie z. B. die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) weitaus sensitivere Methoden darstellen als kulturelle Methoden.

Das Ziel dieser Arbeit war, das Untersuchungsspektrum einer bereits entwickelten Real-Time PCR Methode, die mit Schweinefleischproben evaluiert worden war, auf Fleischproben der Tierarten Rind und Geflügel zu erweitern. Die Prävalenz von pathogener *Y. enterocolitica* wurde in unterschiedlichen Schweine-, Rinder- und Geflügelrohfleischstücken und Rohfleischprodukten untersucht. Die Bestätigung der Real-Time PCR Ergebnisse erfolgte durch ein parallel etabliertes

Kolonie-Hybridisierungsverfahren. Beide Verfahren wurden mit einer kulturellen Nachweismethode verglichen.

LITERATUR**1 Molekularbiologischer Nachweis von Bakterien in Lebensmitteln**

Die wichtigsten Mikroorganismen in Lebensmitteln, die humane Infektionen verursachen können, sind: *Y. enterocolitica*, thermotolerante *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, enterohämorrhagische *E. coli* O157:H7 (EHEC) sowie *L. monocytogenes*. Die Detektion von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln ist mit konventionellen Methoden sehr zeitaufwendig (FITTS et al. 1983, VOLLENHOFER-SCHRUMPF et al. 2005), infolgedessen wurden viele wissenschaftliche Untersuchungen durchgeführt, um schnellere molekularbiologische Methoden wie PCR (KAPPERUD et al. 1993), Real-Time PCR (VISHNUBHATLA et al. 2000, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2007), Multiplex-PCR (LANTZ et al. 1998), Kolonie-Hybridisierung (GOVERDE et al. 1993), Microarrays (MYERS et al. 2006) u. a. für die Lebensmitteluntersuchung zu evaluieren. Die molekularbiologischen Methoden werden z. B. zur Identifizierung von Mikroorganismen zu einem bestimmten Taxon eingesetzt. Hierzu gehören auch Methoden zum Nachweis bestimmter Virulenzgene, die Vertreter einer Spezies eindeutig als Pathogene identifizieren (THISTED LAMBERTZ et al. 2005, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2007). Die molekularbiologische Typisierung zielt dagegen auf eine Unterscheidung auf Stammebene ab und wird u. a. zu epidemiologischen Fragestellungen wie etwa Ausbrüchen von Lebensmittelbedingten Infektionen und Verfolgung von Kontaminationswegen eingesetzt (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2006). Das Prinzip der molekularbiologischen Untersuchung liegt im Gegensatz zu konventionellen Verfahren in der Detektion von DNA- oder RNA-Abschnitten der untersuchten Organismen. Fokussierend auf die in dieser Arbeit verwendeten Methoden, sind molekularbiologische Methoden zur Identifizierung der genannten Lebensmittelinfektionserregern anhand von Beispielen in den nachfolgenden Kapiteln erläutert.

1.1 Kolonie-Hybridisierung

Den Vorgang, bei dem sich zwei zueinander komplementäre DNA-Stränge aneinanderlagern, nennt man Hybridisierung. Mit ihrer Hilfe lassen sich zum Beispiel Strukturen und Funktionen bestimmter Gene experimentell ermitteln. Bei der Kolonie-Hybridisierung erfolgt die Hybridisierung zwischen der auf einer Membran gebundenen DNA, die von aufgeschlossenen (lysierten) Bakterienzellen stammt, und einer zugeführten markierten Sonde (HOFF et al. 2002).

Die zu hybridisierende DNA wird wie folgt gewonnen: Bakterienzellen, die zuvor auf einer Agarplatte angezüchtet wurden, werden auf eine Membran aus Nitrocellulose oder Nylon übertragen, indem die Membran auf die Agarplatte aufgelegt und nach einer Einwirkungszeit wieder abgezogen wird. Wird die Membran auf bereits gewachsene Bakterienkolonien gelegt, kann es zur inkompletten Adhäsion der Bakterien an die Membran kommen, daher empfehlen WEAGANT et al. (1999), die Lebensmittelhomogenisate auf bereits mit Nylonmembranen ausgestatteten Agarplatten auszuspateln und dann zu bebrüten. Dabei wird der Einsatz von Nylonmembranen bevorzugt, da sie reißfester sind, eine größere Bindekapazität sowie eine bessere Fixierbarkeit der Nukleinsäure aufweisen. Zudem sind auch positiv geladene Membranen erhältlich. Dadurch ist die Bindekapazität der negativ geladenen Nukleinsäuren stärker (HOFF et al. 2002).

Nach Abziehen der Membranen von den Agarplatten werden die Bakterienzellen mittels verschiedener Lösungen und Waschungen aufgeschlossen (lysiert). Durch das Waschen werden Verunreinigungen entfernt und die DNA freigelegt. Im Anschluss kann die DNA bei Nitrocellulose Membranen durch ultraviolettes (UV) Licht oder Hitze (80°C) und bei Nylonmembranen durch UV-Licht auf der Membran zur nachfolgenden Hybridisierung fixiert werden (BROWN 2002). Nach DNA-Fixation wird die Membran dem Hybridisierungsverfahren zugeführt, indem die markierte DNA-Sonde, die zuvor mittels PCR-Verfahren hergestellt wurde, zugefügt wird. In früheren Experimenten wurden zunächst geklonte Sonden eingesetzt (HILL et al. 1983, JAGOW und HILL 1986, ROBINS-BROWNE et al. 1989), d. h. die zu hybridisierenden DNA-Abschnitte wurden durch Verdauungs-

enzyme (Restriktionsenzyme) aus Bakterienplasmiden herausgeschnitten (HILL et al. 1983) oder Restriktionsfragmente von chromosomalen Abschnitten in sogenannte Vektorplasmide (Träger) eingebaut (ROBINS-BROWNE et al. 1989) und anschließend markiert und hybridisiert. Die dabei gewonnenen DNA-Plasmidfragmente waren sehr groß und schlecht in größeren Mengen zu produzieren und wurden später durch mit PCR hergestellte (synthetische) Sonden abgelöst. Bei den synthetisierten Sonden unterscheidet man Polynukleotid- (etwa 100 bis 600 Basenpaare lang) von Oligonukleotidsonden (weniger als 25 Basenpaare lang). Der Vorteil der Polynukleotidsonden liegt zum einen in der Markierung mit Digoxigenin (DIG) in regelmäßigen Abständen (alle 12 Basenpaare) im Gegensatz zur Endmarkierung der Oligonukleotidsonden, zum anderen sind sie weniger anfällig für Hybridisierungs- und Waschbedingungen (WEAGANT et al. 1999). Die Hybridisierung läuft in einem Hybridisierungssofen ab, in dem die Membranen, in runden Flaschen gelagert, regelmäßig gedreht und dabei mit der Sonde benetzt werden. Ein wesentlicher Beitrag zur Spezifizierung des Verfahrens stellt die richtige Ermittlung der Hybridisierungstemperatur der Sonde dar. Die optimale Hybridisierungstemperatur (T_{Hyb}) liegt 25°C unter der berechneten Schmelztemperatur T_m . T_m ist die Temperatur, bei der die Hälfte der Nukleinsäurestränge aus ihrem Doppelstrang in Einzelstränge gelöst sind. T_{Hyb} kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} - 16,6 (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 41 (G + C) \times 0,63 (\% \text{ Formamid}) - 600/L$$

($[\text{Na}^+]$ = Natriumkonzentration in mol/l, % G+C = Anteil an Guanosin und Cytosin, L = Länge der Sonde in Basen)

In der Praxis wird in der Regel eine Temperatur von 65°C (42°C bei 60% Formamid) für eine spezifische Hybridisierung gewählt (MÜLHARDT 2003a).

Die Markierung der Sonde kann durch Einbau radioaktiver Isotope (z. B. ^{32}P) oder nichtradioaktiv (z. B. mit Digoxigenin, Biotin oder Meerrettichperoxidase) erfolgen (HILL und KEASLER 1991, DURISIN et al. 1998, WEAGANT et al. 1999). Allerdings werden die radioaktiven Markierungsverfahren aufgrund der besonderen Sicherheits- und Schutzmaßnahmen und der kostspieligen und mit Auflagen verbundenen Entsorgung in der Regel nicht mehr eingesetzt. Zudem sind nichtradioaktiv markierte Sonden länger lagerbar (DIG-markierte Sonden

können bis zu einem Jahr gelagert werden, dagegen hat ^{32}P eine Halbwertszeit von 14 Tagen) und eignen sich besser für Arbeiten im Routinelabor (KAPPERUD et al. 1990, WEAGANT et al. 1999, ROCHE DIAGNOSTICS 2000). Die Meerrettichperoxidase ist hitzelabil und kann durch die niedrigeren Temperaturen bei den Wasch- und Hybridisierungsvorgängen zu einer verminderten Spezifität des Hybridisierungsvorgangs führen (GOVERDE et al. 1993, DURISIN et al. 1998). WEAGANT et al. (1999) berichten über ein stärkeres Signal von DIG-markierten Sonden im Vergleich zu Sonden, die mittels Biotin markiert wurden. Ein weiterer Vorteil der DIG-markierten Sonden ist die Lagerungsmöglichkeit bei -20°C sowie die Möglichkeit, die Sonden mehrmals zu benutzen (WEAGANT et al. 1999).

Nach der Hybridisierung werden die Membranen vor der Färbung gewaschen. Optimale Waschbedingungen tragen ebenso zu einer Spezifizierung des Hybridisierungsverfahren bei wie eine optimal ermittelte Hybridisierungstemperatur (MÜLHARDT 2003a). Die Detektion der gebundenen Sonden erfolgt bei radioaktiv markierten Sonden über Autoradiographie und bei nicht radioaktiv markierten Sonden über eine Antigen-Antikörper Reaktion. Bei der DIG-Markierung z. B. funktioniert das Digoxigenin als Antigen. Zur Detektion der gebundenen DIG-markierten Sonden werden Antikörper zugegeben, die an das Digoxigenin binden. Der Antikörper wiederum hat ein Enzym (z. B. Alkalische Phosphatase) gebunden. Dieses Enzym sorgt bei der Zugabe von Farbsubstraten (z. B. Nitroblautetrazolium, 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (NBT/BCIP), Roche Diagnostics) durch die Abspaltung von Phosphatgruppen für die Farbbildung. Die positiven Signale, die bei der Farbreaktion entstehen, können anschließend von den Membranen abgelesen werden. Dabei korreliert die Größe der Signale mit der ursprünglichen Kolonie, während die Signalintensität von der Sondenart und der Expositionszeit anhängig ist (HOFF et al. 2002, MÜLHARDT 2003a).

Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 1) zeigt eine Zusammenfassung von Untersuchungen, in denen die Kolonie-Hybridisierung zur Detektion von *Y. enterocolitica*, thermotoleranten *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, enterohämorrhagischen *E. coli* O157:H7 (EHEC) sowie *L. monocytogenes* eingesetzt wurde.

Tabelle 1: Untersuchung von Lebensmitteln mittels Kolonie Hybridisierung auf *Y. enterocolitica*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, EHEC und *L. monocytogenes*

Keimart	Gen	Sondenart	Proben	Quelle
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>yadA/yopA</i>	Synthetische 19bp Oligonukleotid Sonde, radioaktiv markiert	natürlich kontaminierte Schweineprodukte	Nesbakken et al. (1991)
	<i>virF, yadA</i>	Synthetische DIG-markierte Polynukleotidsonden	Reinkultur, künstlich kontaminierte Lebensmittel	Weagant et al. (1999)
<i>E. coli</i>	<i>stx1, stx2</i> (Shiga Toxin)	Synthetische Polynukleotidsonde, DIG markiert	Reinkultur, künstlich kontaminierte Lebensmittel	Weagant et al. (1999)
	<i>stx1, stx2</i> (Shiga Toxin)	Synthetische Polynukleotidsonde, DIG markiert	Hackfleisch	Amtliche Methode L07.18-1 nach § 64 LFGB (2002)
<i>Salmonella spp.</i>	Plasmid DNA	Restriktionsfragmente, radioaktiv markiert	diverse Lebensmittel	Fitts et al. (1983)
<i>L. monocytogenes</i>	chromosomale Restriktionsfragmente	Synthetische Oligonukleotidsonde, DIG markiert	diverse Lebensmittel	Kim et al. (1991)
<i>C. jejuni</i>	plasmidale Restriktionsfragmente	Oligonukleotidsonde, DIG-markiert	künstlich kontaminierte Milch	Ng et al. (1997)

Der Vorteil der Kolonie-Hybridisierung liegt in der Möglichkeit, die detektierten Kolonien von der Ausgangsplatte isolieren zu können. Zudem erfordert das Verfahren, inklusive Vorschaltung eines Anreicherungsschrittes weniger Zeit als konventionelle Methoden und weist zudem eine höhere Spezifität als kulturelle Methoden auf (KAPPERUD et al. 1990, NESBAKKEN 1991, GOVERDE et al. 1993). Eine quantitative Ermittlung der Kolonie bildenden Einheiten (KbE) ist

möglich, indem die positiven Signale der Kolonien mit der Verdünnungsstufe hochgerechnet werden. In der Regel erfordern Kolonie-Hybridisierungsverfahren 10^5 bis 10^6 Kopien der Zielsequenz (HILL und KEASLER 1991). Bei Gesamtkeimzahlen von 10^6 bis 10^7 pro Gramm der zur Hybridisierung verwendeten Agarplatten wird die Blot-Effizienz reduziert, da die gesuchten Zielzellen die erforderliche Menge von 10^5 bis 10^6 Zellen durch eine hohe Begleitflora nicht komplettieren können (HILL et al. 1985, JAGOW und HILL 1988). Die Benutzung von Selektivagars und Selektivanreicherungen kann die Sensitivität des Hybridisierungsverfahren steigern (HILL et al. 1983, JAGOW und HILL 1986, NESBAKKEN 1991).

1.2 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion, die 1987 von Kary B. Mullis entwickelt wurde, hat die Diagnostik im molekularbiologischen Labor um einen grundlegenden Schritt erweitert. Die Idee von Mullis war, ein Verfahren zu entwickeln, das DNA künstlich vervielfältigen sollte. Dabei wird die DNA mit Hilfe eines Enzyms, der DNA-Polymerase, ähnlich wie bei der natürlichen Replikation durch Verdopplung in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen *in vitro* vermehrt. Der als Amplifikation bezeichnete Vorgang ermöglicht, dass auch sehr geringe Mengen einer DNA-Sequenz nach Vermehrung einer Analyse zugänglich gemacht werden können. Als Anerkennung für diese revolutionäre Entwicklung erhielt Mullis 1993 den Nobelpreis für Chemie (KUBISTA et al. 2006).

Die kontinuierliche Weiterentwicklung dieses Verfahrens bietet heute den Laboratorien eine große Auswahl an verschiedensten PCR-Techniken wie z. B. die Single-PCR (KAPPERUD et al. 1993), Real-Time PCR (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2007) und Multiplex-PCR (LANTZ et al. 1998). Im Lebensmittelbereich wird die Real-Time PCR vor allem zur Detektion von pathogenen Bakterien in Lebensmitteln (MC KILLIP und DRAKE 2004) sowie zur Detektion von genetisch veränderten Organismen (VAITILINGOM et al. 1999) eingesetzt.

1.2.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um eine PCR durchzuführen, braucht man vier Bausteine:

1. Template (Ausgangs-DNA)
2. Taq-Polymerase (aus hitzestabilem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen)
3. Nukleotid-Bausteine (Desoxynukleosidtriphosphate)
4. Primer (synthetische DNA-Oligonukleotide mit einer Länge von 18-35 Basen)

Templateaufbereitung

Als Replikationsmatrize, auch Template genannt, dient in jeder PCR ein einzelsträngiger Nukleinsäureabschnitt (BANGSOW et al. 2002, MÜLHARDT 2003b). Dieser Abschnitt wird jeweils vor der PCR aus einer zu untersuchenden Lebensmittelprobe isoliert und gereinigt. Da die Lebensmittelproben sowie verwendete Anreicherungsmedien hinsichtlich ihrer Matrix sehr komplex sind, dient die Probenvorbereitung sowohl zur Konzentrierung der Zielorganismen (Nukleinsäure) als auch zum Abtrennen von PCR-inhibitorischen Stoffen (ROSSEN et al. 1992, LANTZ et al. 1998). Jede zu untersuchende Probe, ob Lebensmittel oder klinisches Material wie Kot oder Blut, erfordert allerdings aufgrund seiner individuellen Zusammensetzung inklusive inhibitorischer Faktoren wie z. B. Lipide, Proteasen, zweiwertige Kationen, Kohlenhydrate oder weiteres organisches Material eine individuelle Anpassung an die Untersuchungsmethoden. Zur effizienten Probenaufbereitung stehen zahlreiche Methoden und kommerzielle Kits zur Verfügung, da kein universelles Prozedere existiert (MC KILLIP und DRAKE 2004).

Bei der Buoyant density centrifugation (BDC) wird eine Probe zusammen mit Lösungen unterschiedlicher Dichte zentrifugiert. Die verschiedenen Bestandteile der Probe reichern sich je nach Dichte in einer bestimmten Phase des Gemisches an. Dies führt zur Konzentration der Zielorganismen, und Inhibitoren werden entfernt. Da sich nur lebende Bakterien anreichern, soll die Detektion von toten Zellen ausgeschlossen sein. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Separation

biologischer Partikel und Mikroorganismen, der Schnelligkeit und der einfachen Handhabung (WOLFFS et al. 2004). Die Methode ist vor allem für Proben geeignet, die einen hohen Anteil an PCR-Inhibitoren aufweisen, da diese durch den Zentrifugationsschritt abgetrennt werden (LINDQVIST 1997). Die Flotation stellt eine von WOLFFS et al. (2004) beschriebene Abwandlung der Buoyant density centrifugation dar.

Die Immunomagnetische Separation (IMS) arbeitet mit magnetischen Partikeln, die mit entsprechenden Antikörpern ausgestattet sind. Sie ermöglicht über eine Antigen-Antikörper Reaktion die Abtrennung von gesuchten Keimen aus einem Substrat. Mit dem Verfahren kann auch größtenteils Fremd-DNA entfernt werden (NESBAKKEN 1992, KAPPERUD et al. 1993, OLSVIK et al. 1994, JOHANNESSEN et al. 2000).

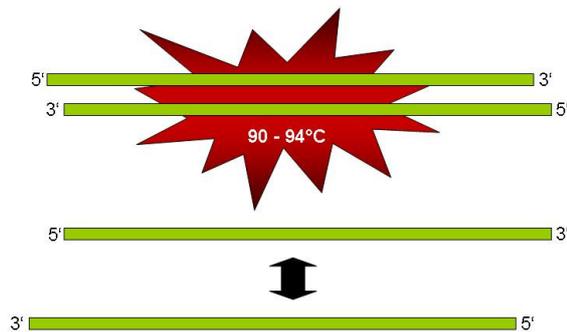
Primer

Die Primer sind kurze, einzelsträngige DNA-Abschnitte, die sich komplementär zu den 3'-Enden des zu amplifizierenden Templates anlagern. Die DNA-Polymerase hat die Aufgabe, die der Reaktion zugesetzten Nukleotid-Bausteine entlang des Templates in Richtung 5'-Ende komplementär anzulagern. Zugesetzt werden der PCR gegenläufig orientierte Primerpaare, so dass die Sequenz zwischen beiden Primerpaaren gezielt sequenziert werden kann. Um für die DNA-Polymerase ein optimales Reaktionsmilieu zu schaffen, wird der Reaktion ein Puffer zugesetzt (MÜLHARDT 2003b). Alle Reaktionspartner werden, bis auf das Template, im Vorfeld in einem Master-Mix zusammengestellt. Dieser besteht aus molekularbiologisch reinem Wasser, Nukleotid-Bausteinen, Primern, Puffer und der DNA-Polymerase. Schließlich gibt man dem Mix noch das Template hinzu. Die Vermehrungszyklen laufen in extra für die PCR entwickelten Thermocyclern ab. Diese Geräte sind in der Lage, die für die Amplifizierungszyklen erforderlichen Temperatureinstellungen in temperierbaren Reaktionsräumen selbständig durchzuführen. Die für die einzelnen PCR Zyklen in den folgenden Abschnitten genannten Zeiten und Temperaturen geben lediglich die Einstellungen eines Standardprogrammes wieder. Auf dem Markt existiert eine Vielzahl an unterschiedlichen Gerätetypen, sodass die PCR Parameter für jedes Gerät und PCR-Produkt individuell optimiert werden müssen.

Ablauf der PCR

Jeder PCR-Zyklus läuft im Thermocycler nach folgendem Schema ab (siehe Abbildung 1-3): Zunächst wird der Zyklus durch einen Denaturierungsschritt initiiert (Abbildung 1). Dabei wird der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang durch Hitzeeinwirkung für 5 Min bei 94 °C aufgeschmolzen (denaturiert). Es entstehen einzelsträngige DNA-Templatemoleküle.

Abbildung 1: Denaturierung



Anschließend erfolgen 30 Zyklen bestehend aus: 1. einer Denaturierung bei 94 °C für 30 Sek, 2. einer Anlagerung der Primer (Primer Annealing) an einem für sie komplementären Ort auf der zu vervielfältigenden DNA-Matrize (Abbildung 2). Dies geschieht bei den meisten PCR Protokollen bei 55 °C und dauert 30 Sek. Der Denaturierungsschritt dauert bei der Real-Time PCR zwischen 0,1 oder 15 Sek und das Annealing wird mit 5 bis 30 Sek angegeben (JACOBSEN et al. 2005, WOLFFS et al. 2005, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2007).

Abbildung 2: Annealing

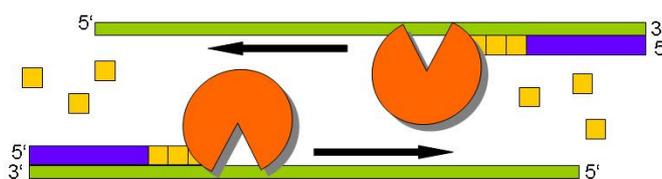


Für die sequenzspezifische Anlagerung der Primer an die Template-DNA muss eine geeignete Temperatur gewählt werden. In der Regel verwendet man eine

Annealing-Temperatur, die etwa 5°C unter der errechneten Schmelztemperatur (T_m) liegt. Die Schmelztemperatur bezeichnet die Temperatur, bei der 50% der DNA-Moleküle in Einzelsträngen vorliegen und wird anhand der Guanosin/Cytosin- und Adenin/Tyrosin-Basenpaarzusammensetzung berechnet ($T_m = 2^\circ\text{C} \times (A+T) + 4^\circ\text{C} \times (G+C)$). Unzureichende Primer-Hybridisierungen kommen bei zu hoch oder zu niedrig gewählten Temperaturen zustande (HOFF et al. 2002). Im Vorfeld einer Versuchsreihe sollten deshalb die optimalen PCR Bedingungen anhand eines Temperatur-Gradienten eingestellt werden. Hier kann man mehrere Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Temperaturen durchlaufen lassen, um die bestmögliche Annealing-Temperatur zu ermitteln (BANGSOW et al. 2002, MÜLHARDT 2003b).

Im dritten Schritt der PCR folgt die Extensionsphase (Elongation) bei 72°C für 90 Sek, bei der die DNA-Einzelstrangmatrizen durch komplementäre Anlagerung der Nukleotid-Bausteine mit Hilfe der Taq-Polymerase verlängert werden (Abbildung 3). Die Extensionsphase liegt bei der Real-Time PCR bei 25 bis 30 Sek. (JACOBSEN et al. 2005, WOLFFS et al. 2005, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2007).

Abbildung 3: Extensionsphase (Elongation)



Nach den 30 Zyklen folgt eine finale Elongation von 5 Min bei 72°C. Im Anschluss wird die Reaktion im Gerät auf 4°C bis zur Weiterverarbeitung gekühlt (MÜLHARDT 2003b).

Durch die mehrfache Ausführung des aus diesen drei Schritten (Denaturierung, Annealing, Extension) bestehenden Amplifikationszyklus kann die vorliegende Template-DNA exponentiell vermehrt werden. Für die folgende Detektion

(Sichtbarmachung) der PCR-Produkte gibt es zwei Techniken: Direkte Nachweisverfahren (Real-Time PCR) und Elektrophoresemethoden.

1.2.2 Detektion der PCR-Produkte

Detektion durch Gelelektrophoresemethoden

Die herkömmliche Detektionsmethode basiert auf der Verwendung von Polyacrylamid- und Agarosegelen. Hierbei werden die PCR-Produkte in einer physikalischen Matrix (Gel) ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Unter einer UV-Lichtquelle können die Banden der PCR-Produkte dann sichtbar gemacht werden (BANGSOW et al. 2002, MC KILLIP und DRAKE 2004). Diese Verfahren sind zwar sehr kostengünstig, bergen aber die Gefahr der Kontamination beim Übertragen des PCR-Produktes in das Gel (WILHELM und PINGOUD 2003, MC KILLIP und DRAKE 2004).

Detektion mit Real-Time PCR

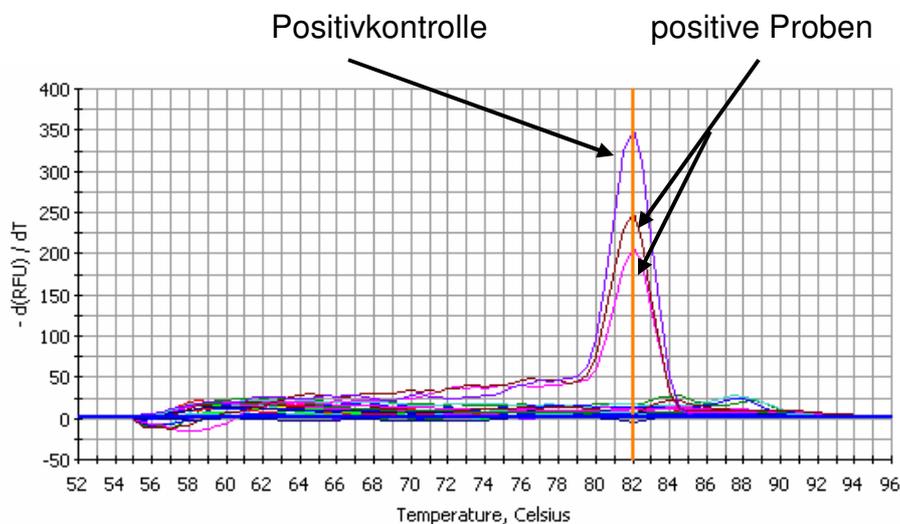
Dem Ablauf der Real-Time PCR liegen die bereits erklärten Prinzipien der herkömmlichen PCR zugrunde. Die Auswertung der Real-Time PCR-Produkte kann aufgrund der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen bereits in jedem Zyklus des PCR-Ablaufs erfolgen. Die Produkte müssen nicht nach der Amplifizierung zur Detektion in ein Gel überführt werden (BUSTIN 2005). Das spart Zeit und verhindert „Carry-Over“ Effekte.

Sequenzunspezifische Farbstoffe

Die einfachste Methode beruht auf der Verwendung von sequenzunspezifisch an Doppelstrang DNA (dsDNA) bindende Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. **Ethidiumbromid** oder der Cyaninfarbstoff **SYBR[®]Green** (MÜLHARDT 2003b), wobei sich SYBR[®]Green in der Vergangenheit durchsetzen konnte. Das Design für eine solche Studie ist vergleichsweise einfach und die Kosten, bis auf das Real-Time-Gerät erschwinglich (BUSTIN 2005). Der gebundene Farbstoff fluoresziert nach Anregung und ist für das Monitoring der Produktanreicherung während des PCR Zyklus gut geeignet. Der Farbstoff reagiert allerdings nicht sequenzspezifisch und kann auch an Primer Dimere (Primer-Primer Verbindung)

und unspezifische Amplifikate binden (BUSTIN 2005). Durch eine anschließende Schmelzkurvenanalyse (Abbildung 4) kann eine Unterscheidung zwischen Primer-Dimeren und den gesuchten DNA-Amplifikaten erfolgen. Hierzu wird die Temperatur im Anschluss der PCR kontinuierlich erhöht. Der Temperaturanstieg führt zum Schmelzen (Denaturierung) der in der Probe befindlichen PCR-Produkte, die folglich als Einzelstränge vorliegen. Dabei besitzt jedes Produkt aufgrund seiner Länge und seines G/C Gehaltes seine individuelle Schmelztemperatur und kann durch die Schmelzkurve von anderen Produkten differenziert werden (MC KILLIP und DRAKE 2004, BUSTIN 2005). Die dabei abnehmende Fluoreszenz wird gemessen. Der Peak entsteht bei der Temperatur, bei der die Fluoreszenz ihren stärksten Abfall aufweist und Primer-Dimere können durch ihren niedrigeren Schmelzpunkt von spezifischen Sequenzen differenziert werden (BANGSOW et al. 2002).

Abbildung 4: Schmelzkurvenanalyse. Hier ist die Temperatur auf der x-Achse gegenüber der relativen Fluoreszenzabnahme auf der y-Achse aufgetragen.



Sequenzspezifische Farbstoffe

Neben sequenzunspezifischen Farbstoffen wie SYBR[®]Green gibt es die Möglichkeit, sequenzspezifische Oligonukleotide oder Polynukleotide als Sonden zu verwenden. Die markierten Sonden können sich sequenzspezifisch an

Zielregionen anlagern. Das Prinzip der fluoreszenzmarkierten Sonden beruht auf der Hybridisierung mit gesuchten DNA-Abschnitten, die während des PCR-Zyklus durch Verwendung genspezifischer Primer amplifiziert werden. Die Sonden sind nach dem Fluoreszenz (oder Förster)-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Prinzip konzipiert. Die verwendeten Fluorophorfarbstoffe besitzen die Eigenschaft, nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge, die aufgenommene Energie wieder abzustrahlen (Emission). Bei Verwendung des sogenannten TaqMan-Assays (**Hydrolysesonde**), kommt eine zweifach markierte Sonde zum Einsatz. Sie ist am 5'-Ende mit einem Reporter (=Donor-Farbstoff) und am 3'-Ende mit einem Quencher (=Akzeptor Farbstoff) markiert. Nach Anregung des Donors, gibt dieser seine Emissionsenergie an den Akzeptor ab. Liegen die beiden Fluorophorfarbstoffe räumlich nah beieinander, wird der Donor durch die Anwesenheit des Quenchers (quench=unterdrücken) unterdrückt. Sobald die räumliche Nähe zwischen den beiden Farbstoffen aufgehoben wird, kann der Reporter seine Emissionsenergie an die Umgebung abgeben. Die räumliche Trennung erfolgt beim TaqMan System, indem die Exonuklease der Polymerase bei der Elongation des neusynthetisierten DNA-Stranges zur Hydrolyse der gebundenen Sonde führt. Die gebildete Fluoreszenz des freigewordenen Reporters ist dabei proportional zur gebildeten Amplifikatmenge und das Fluoreszenzsignal kann auf einer computergenerierten Graphik abgelesen werden (MÜLHARDT 2003b, MC KILLIP und DRAKE 2004, BUSTIN 2005).

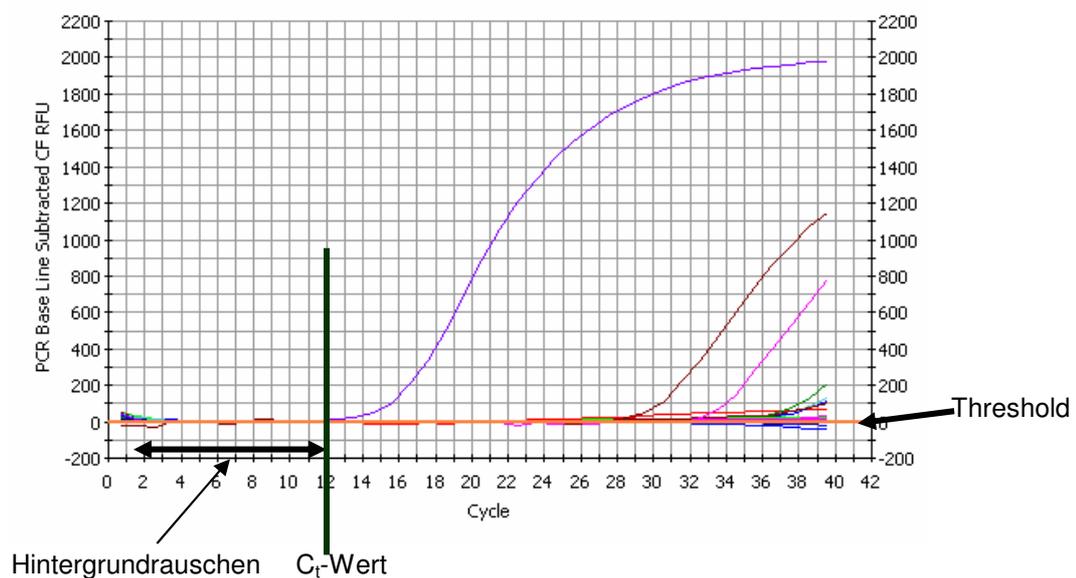
Daneben existieren unterschiedliche Systeme (z. B. Molecular Beacons, Sunrise Primer und Scorpion Primer) im Bereich der **Hybridisierungssonden**. Bei diesen Sonden befinden sich die Farbstoffe Reporter und Quencher im ungebundenen Zustand der Sonde in räumlicher Nähe, sodass kein Fluoreszenzsignal generiert wird. Ihr Prinzip beruht auf der räumlichen Trennung von Reporter und Quencher durch Hybridisierung der Sonde auf sequenzspezifischen Bereichen des gesuchten DNA-Amplifikates. Die Detektion erfolgt hier während der Annealingphase (MC KILLIP und DRAKE 2004).

Auswertung der Real-Time PCR Ergebnisse

Die Auswertung erfolgt über den C_t -(threshold cycle)-Wert (Abbildung 5). Der C_t -Wert gibt die Zyklenzahl an, bei der zum ersten Mal ein Anstieg des

Fluoreszenzsignals des gesuchten Amplifikates gegenüber des Grundrauschens, auch Hintergrundrauschen genannt, zu verzeichnen ist. Die Fluoreszenz des Hintergrundrauschens wird mit dem Threshold angezeigt. Je mehr Template-material zu Beginn der Amplifikation zur Verfügung steht, desto geringer ist die Anzahl der Zyklen, die nötig ist, um eine bestimmte Amplifikatmenge zu produzieren, die das Grundrauschen übersteigt (BUSTIN 2005).

Abbildung 5: Auswertung des C_t -Wertes. Der C_t -Wert gibt den Zyklus an, der zum ersten Mal das Hintergrundrauschen übersteigt.



Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 2) zeigt Beispiele von PCR-Methoden, die zur Detektion von *Y. enterocolitica*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *EHEC* und *L. monocytogenes* in Lebensmitteln eingesetzt wurden.

Tabelle 2: Beispiele von PCR-Methoden, die zur Detektion von *Y. enterocolitica*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *EHEC* und *L. monocytogenes* in Lebensmitteln eingesetzt wurden

Keimart	PCR Methode	Proben	Quelle
<i>Y. enterocolitica</i>	Multiplex PCR	Schweinefleisch	Thisted Lambertz et al. (2005)
	Real-Time PCR	Schweinefleisch	Fredriksson-Ahomaa et al. (2007)
<i>E. coli</i>	PCR	Tofu, Schokoladenmilch	Weagant et al. (1999)
	Real-Time PCR	Hackfleisch	Amtliche Methode L07.18-1 nach § 64 LFGB (2002)
<i>Salmonella spp.</i>	PCR	Geflügelfleisch	Myint et al. (2006)
	Real-Time PCR	Rohwurst	Wang et al. (2004)
<i>L. monocytogenes</i>	Multiplex PCR	Geflügelschlachtkörper	Lindblad et al. (2006)
	Real-Time PCR	Salat	Berrada et al. (2006)
<i>Campylobacter spp.</i>	PCR	Geflügelschlachtkörper und Eingeweide	Bartkowiak-Higgo et al. (2006)
	Real-Time PCR	Geflügelfleisch	Abu-Halaweh et al. (2005)

1.2.3 Vor- und Nachteile der PCR

Im Vergleich zur Kolonie Hybridisierung liefert die PCR schneller die erforderlichen Ergebnisse und ist mit weniger Aufwand im Labor verbunden (KWAGA et al. 1992). Dazu sind die PCR-Methoden sensitiver als kulturelle Methoden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999, JOHANNESSEN et al. 2000, BOYAPALLE et al. 2001, LINDBLAD et al. 2006). Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR können die Ergebnisse der Real-Time PCR während des Amplifikationsablaufes bereits generiert und abgelesen werden (BUSTIN 2005). Ein weiterer Vorteil der Real-Time PCR im Vergleich zur herkömmlichen PCR liegt in der Zeitersparnis und der Vermeidung von carry-over Kontaminationen, da ein Überführen der PCR Produkte in ein Elektrophoresegel aufgrund der Online-Detektion hinfällig ist (WILHELM und PINGOUD 2003).

Sensitivität

Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 3) zeigt die Sensitivitäten, die mit kulturellen, PCR- und Real-Time PCR-Methoden ermittelt wurden. Die kulturellen Verfahren sind mit einer durchschnittlicher Nachweisgrenze von 10^3 - 10^5 KbE/g(ml) weniger sensibel als die herkömmliche PCR-Methode mit einer durchschnittlichen Nachweisgrenze von 10^2 KbE/g(ml) bzw. 10-30 KbE/g bei der Nested PCR. Die Real-Time PCR weist im Vergleich zu den genannten Verfahren mit durchschnittlich 1-10 KbE/g(ml) die höchste Sensitivität auf. Grundsätzlich erhöht ein Anreicherungsschritt in einem Selektivmedium die Sensitivität der einzelnen Verfahren.

Tabelle 3: Vergleich der Sensitivität der Methoden Kultur, PCR, Nested PCR und Real-Time PCR

Methoden	Sensitivität	Proben	Referenz
Kultur	4×10^3 KbE/g	natürlich kontaminierte Schweineproben nach Anreicherung	Boyapalle et al. (2001)
	10^5 KbE/ml	Reinkultur	Vishnubhatla et al. (2001)
	10^6 KbE/ml	künstlich kontaminierte Schweineprodukte nach Anreicherung	
PCR	10^3 - 10^4 KbE/ml	Reinkultur	Nakajima et al. (1992)
	4×10^2 KbE/g	künstlich kontaminierte Schweineprodukte nach Anreicherung	Boyapalle et al. (2001)
	10^2 KbE/ml	natürlich kontaminiertes Geflügelfleisch nach Anreicherung	Myint et al. (2006)
	$2,5 \times 10^3$ KbE/g	Reinkultur	Thisted Lambertz et al. (2007)
Nested PCR	10-30 KbE/g	künstlich kontaminierte Lebensmittelproben vor Anreicherung	Kapperud et al. (1993)
	2 KbE/g	künstlich kontaminierte Lebensmittelproben nach Anreicherung	

Methoden	Sensitivität	Proben	Referenz
Real-Time PCR	1 KbE/g	nach Anreicherung	Jourdan et al. (2000)
	0,4 KbE/g	natürlich kontaminierte Schweineproben nach Anreicherung	Boyapalle et al. (2001)
	10^3 KbE/ml	Künstlich kontaminierte Schweineprodukte nach Anreicherung	Vishnubhatla et al. (2001)
	10^2 KbE/ml	Reinkultur	
	1-10 KbE/g	Reinkultur	Jacobsen et al. (2005)
	10 KbE/g	Reinkultur	Berrada et al. (2006)
	1-10 KbE/g	künstlich kontaminiertes Hackfleisch nach Anreicherung	Fredriksson-Ahomaa et al. (2007)
	10^3 - 10^4 KbE/g	Reinkultur	

Falsch negative Ergebnisse

Falsch negative Ergebnisse der PCR können z. B. durch folgende Faktoren verursacht werden: Inhaltsstoffe der Lebensmittel, zu hohe Bakterienzahlen und Anreicherungs-lösungen können die PCR inhibieren (LANTZ et al. 1998, WEAGANT et al. 1999, KAPPERUD et al. 1993). Eine geringe Anzahl an Krankheitserregern aufgrund einer zu geringen Keimzahl in der Probe oder eine zu hohe Begleitflora (KAPPERUD et al. 1993, BHADURI und COTTRELL 1998, THISTED LAMBERTZ et al. 2007) können ebenfalls falsch negative Ergebnisse generieren. Eine Verdauung der Erreger-Nukleinsäure kann durch eingeschleppte Nukleasen (NAKAJIMA et al. 1994) verursacht werden. Der Einsatz einer internen Amplifikationskontrolle führt zur Detektion falsch negativer Ergebnisse (MACKAY 2004, THISTED LAMBERTZ et al. 2000). Die interne Kontrolle wird in jedes Reaktionsgefäß pipettiert und zeigt durch die Amplifikation eines bekannten Fragments an, ob die PCR erfolgreich war oder inhibiert wurde. In der amtlichen Methode L07.18-1 (N.N. 2002) nach § 64 LFGB ist die Mitführung einer internen Amplifikationskontrolle (pUC 19-DNA) während der PCR vorgeschrieben. Das

System pUC 18/19 wird auch in dem DIN 10135 Verfahren (N.N. 1999) zum Nachweis von Salmonellen mit der Polymerase-Kettenreaktion als interne Amplifikationskontrolle vorgeschrieben.

Falsch positive Ergebnisse

Falsch positive Ergebnisse der PCR können durch Kontaminationen während der PCR Vorbereitung entstehen (MÜLHARDT 2003b). Die Detektion von DNA toter Zellen bringt ebenfalls falsch-positive Ergebnisse hervor. Eine Unterscheidung zwischen DNA-Fragmenten, die von lebenden oder toten Zellen detektiert wurden, ist mit der PCR nicht möglich (WOLFFS et al. 2005). Neuere Studien berichten über die erfolgreiche Anwendung von Probenvorbereitungsmethoden, die zum einen erfolgreich PCR Inhibitoren von der Probe abtrennen können, zum anderen falsch positive Ergebnisse, die durch DNA toter Zellen entstehen können, verhindern. So konnten WOLFFS et al. (2005) die Flotationsmethode erfolgreich bei der Probenvorbereitung einsetzen. Zudem führt eine Anreicherung vor der PCR zu einer Vermehrung von lebenden Zellen, sodass die DNA-Menge von lebenden Zellen die von toten Zellen extrahierte DNA-Menge deutlich übersteigt (WOLFFS et al. 2005). Wichtig ist auch die Auswahl von Spezies-spezifischen Primern, da gesuchte Zielgene durchaus in mehreren Spezies gleichzeitig vorkommen können (THISTED LAMBERTZ et al. 2007).

Aufgrund der genannten Faktoren, die eine PCR beeinflussen können, sind Positiv- und Negativkontrollen bei jedem PCR-Experiment mitzuführen (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003, MÜLHARDT 2003b).

1.3 Weitere DNA-basierte Methoden

Weitere Blotting Methoden

Alternativ zur Kolonie-Hybridisierung kann auch gereinigte DNA oder RNA auf eine Membran aufgetragen und dem Hybridisierungsverfahren zugeführt werden. In diesem Fall spricht man von **Dot-Blot**. Wird der Transfer auf eine Membran im Anschluss an eine gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten durchgeführt, bezeichnet man das Verfahren als **Southern- (DNA) oder Northern (RNA)-Blot** (HOFF et al. 2002).

Microarray:

Bei einem DNA-Microarray oder auch Gen-Chip genannt, handelt es sich um eine systematische Anordnung von markierten DNA-Sonden auf planaren Oberflächen (z. B. Glasplättchen). Bei Exposition mit Nukleinsäureproben hybridisieren die komplementären Nukleinsäureabschnitte an die Festphase-gebundenen Sonden im Sinne eines Dot-Blots. Dabei kann ein einzelner Chip mit mehreren tausenden verschiedenen Sonden bedruckt sein, die ebenso viele komplementäre DNA-Abschnitte erkennen können. Um die Hybridisierungen sichtbar zu machen, liegen die Sonden entsprechend markiert vor. Als Marker werden in der Regel Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Die mittels Fluoreszenz generierten Hybridisierungsmuster können anschließend mit speziellen Geräten ausgelesen werden (MÜLHARDT 2003b).

MYERS et al. (2006) sowie IKEDA et al. (2006) entwickelten DNA Microarray Chips zur Detektion von pathogenen *Y. enterocolitica*-Stämmen in pasteurisierter Milch und frischem Gemüse. Daneben existieren bereits kommerzielle Kits zur Detektion von Salmonellen, EHEC, Listerien und Campylobacter in Lebensmitteln. Beim Microarray Kit EHEC (GeneGen®EHEC) sind z. B. folgende vier Gendetektionen möglich: Shiga-like Toxin, O157-spezifisches Gen und *eeA* (attaching and effacing A). Die diagnostischen Testsysteme der Marke GeneGen® verwenden ein DNA-Nachweissystem basierend auf einer Multiplex-PCR mit anschließender Hybridisierungsreaktion (GeneGen®-Technologie) zur Detektion von pathogenen Mikroorganismen aus Flüssigkulturen (z. B. Anreicherungskulturen) oder aus Plattenkultivierung (Einzelkolonien). Die Nachweisgrenze der Tests wird mit 1-10 Kolonien pro 25 g Lebensmittel angegeben. Die Kits sind für folgende Spezies erhältlich: Nachweis von enterohämorrhagischer *E. coli* (EHEC) Stämmen (GeneGen® EHEC Detection Kit), Nachweis von Salmonellen (GeneGen® Salmonella Detection Kit), Nachweis von *Listeria* (Genus) und *L. monocytogenes* (Spezies) mit GeneGen® *Listeria* Detection Kit sowie kombinierter Nachweis von Salmonella, EHEC, *Listeria monocytogenes* und Campylobacter (GeneGen® Major Food Pathogens Detection Kit) (<http://www.sylab.at/genegen.htm>).

2 Allgemeine Eigenschaften von *Y. enterocolitica*

Die Gattung *Yersinia* gehört nach Bergey's Manual of Determinative Bacteriology zur Familie der *Enterobacteriaceae* und umfasst nach BOTTONE (1997) 11 Arten: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. rohdei*, *Y. aldovae* und der fischpathogenen Art *Y. ruckeri*. Aufgrund jüngster Untersuchungen von SPRAGUE und NEUBAUER (2005) wurden die 11 Arten um die neue Spezies *Y. aleksiciae* ergänzt. Bei *Y. enterocolitica* handelt es sich um ein Gram-negatives, Oxidase-negatives, Katalase-positives, Nitrat-Reduktase-positives, kokkoides bis pleomorphes und fakultativ anaerobes Stäbchen der Größe 0,5 x 0,8 x 1,3 µm (BERCOVIER und MOLLARET 1984). Das Bakterium besitzt keine Kapsel und bildet keine Sporen. Ein wichtiges Merkmal der *Yersinia*-Arten (ausgenommen *Y. pestis*) ist ihre Beweglichkeit bei 22-28 °C, jedoch nicht bei 35-37 °C (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Die optimale Bebrütungstemperatur liegt bei 30-37 °C. *Y. enterocolitica* ist ein psychrotrophes Bakterium und kann in Lebensmitteln selbst bei Kühlschranktemperaturen überleben und wachsen (HANNA et al. 1977, BERCOVIER und MOLLARET 1984). Diese Eigenschaft macht man sich bei der sogenannten „Kälteanreicherung“ zunutze.

Y. enterocolitica, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* sind obligate Krankheitserreger beim Menschen. Von diesen Keimen verursachen *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* vor allem Infektionen des Magen-Darm-Traktes. Die übrigen *Yersinia*-Arten, die vorwiegend in der Umwelt anzutreffen sind, gelten allgemein als Opportunisten. Krankheiten kommen hier vor allem bei immungeschwächten Patienten vor. Da diese apathogenen Arten aber des öfteren in Untersuchungsmaterial detektiert werden, ist eine labordiagnostische Abgrenzung von pathogenen Arten notwendig (ROBINS-BROWNE et al. 1989, BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Die biochemische Differenzierung von *Y. enterocolitica* zu den weiteren apathogenen *Yersinia*-Arten erfolgt mit den in (Tabelle 4) angegebenen biochemischen Reaktionen. Stämme, die zur Spezies *Y. enterocolitica* gehören, sind Urease-positiv und können von anderen *Yersinia*-Spezies durch die positive Fermentation von Sucrose, sowie die negativen

Ergebnisse der Rhamnose- und Melibiose-Fermentation abgegrenzt werden (BERCOVIER et al. 1980).

Tabelle 4: Charakteristische Eigenschaften von *Y. enterocolitica* und verschiedener *Y. enterocolitica*-like Bakterien nach (BERCOVIER et al. 1978, BRENNER 1981, KAPPERUD und BERGAN 1984, ALEKSIC et al. 1987, WAUTERS et al. 1988, BOCKEMÜHL und WONG 2003)

Eigenschaften	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. frederiksenii</i>	<i>Y. kristensenii</i>	<i>Y. intermedia</i>	<i>Y. aldovae</i>	<i>Y. rohdei</i>	<i>Y. mollarretii</i>	<i>Y. bercovieri</i>
Fermentation								
von:								
D-Cellobiose	+	+	+	+	-	+	+	+
D-Melibiose	-	-	-	+	-	+	-	-
Raffinose	-	-	-	+	-	+	-	-
L-Rhamnose	-	+	-	+	+	-	-	-
Sucrose	+	+	-	+	-	+	+	+
L-Sorbose	+	+	+	+	-	-	+	-
Andere Tests:								
α -Methyl-D-glucosid	-	-	-	+	-	-	-	-
Ornithindecaboxylase	+	+	+	+	+	(+)	+	+
Voges-Proskauer	+	+	-	+	+	-	-	-
Harnstoff	+	+	+	+	+	d	+	+

Inkubation bei +28°C für 48h

- + mehr als 90% der Isolate zeigen eine positive Reaktion
- weniger als 10% der Isolate zeigen eine positive Reaktion
- (+) schwach positiv
- d variabel (10-90% positiv)

Zur weiteren Unterscheidung zwischen pathogenen und apathogenen *Y. enterocolitica*-Stämmen hilft die Biotypisierung nach WAUTERS et al. (1987), bei der die Einteilung der unterschiedlichen Biotypen der *Y. enterocolitica*-Bakterien aufgrund zahlreicher biochemischer Reaktionen erfolgt (Tabelle 5). Grundsätzlich werden 6 Biotypen unterschieden. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass nur Stämme von *Y. enterocolitica* Biotyp 1B (Serogruppen O:8, O:13a,13b, O:18, O:20 und O:21 geographisch in Nordamerika dominierend, aber nach SCHUBERT et al. (2003) auch in Japan und Europa gefunden), Biotyp 2 (Serogruppen O:9, O:5,27), Biotyp 3 (Serogruppen O:1,2a,3, O:9, O:5,27), Biotyp 4 (Serogruppe O:3) und Biotyp 5 (Serogruppe O:2a,2b,3) das Virulenzplasmid (pYV) tragen und

obligat pathogen sind (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Der Biotyp 1 wird in den apathogenen Biotyp 1A und in den pathogenen Biotyp 1B eingeteilt. Die Stämme des Biotyps 1A, die in der Umwelt und als Saprophyten vorkommen, tragen jedoch kein Virulenzplasmid und werden als apathogen angesehen. Für ihre Differenzierung sind die Reaktionen Äskulin, Salicin und Pyrazinamidase von besonderer Wichtigkeit, da diese Reaktionen bei diesen apathogenen Stämmen stets positiv ausfallen (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Inzwischen wurde jedoch auch über sporadische Erkrankungen mit Biotyp-1A-Stämmen berichtet. Diese Infektionen sind klinisch kaum von Infektionen mit Virulenzplasmid tragenden Stämmen der übrigen Biotypen zu unterscheiden. Die Pathogenese der beschriebenen Infektionen bedarf allerdings der weiteren Klärung (TENNANT et al. 2003).

Tabelle 5: Biochemische Differenzierung der Biotypen von *Y. enterocolitica* modifiziert nach WAUTERS et al. 1987 (BOTTONE 1999)

Testreaktion	Biotyp					
	1 A	1 B	2	3	4	5
Lipaseaktivität	+	+	-	-	-	-
Äskulin 24h	+/-	-	-	-	-	-
Salicin 24h	+	-	-	-	-	-
Indol Produktion	+	+	d	-	-	-
Xylose Produktion	+	+	+	+	-	d
Ornithin Decarboxylase	+	+	+	+	+	+(+)
Trehalose Produktion	+	+	+	+	+	-
Pyrazinamidase	+	-	-	-	-	-
Sorbose	+	-	-	-	-	-
Inositol	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+(+)
Nitratreduktion	+	+	+	+	+	-

- + mehr als 90% der Isolate zeigen eine positive Reaktion
- weniger als 10% der Isolate zeigen eine positive Reaktion
- (+) schwach positiv
- d variabel (10-90% positiv)

Y. enterocolitica besitzt unterschiedliche Antigene, die neben der Biotypisierung eine Einteilung in sogenannte Serotypen ermöglichen. Unterschieden werden Oberflächen (O)-, Geißel (H)-, und Kapsel (K)- Antigene, wobei die Kapselantigene für die Diagnostik keine Bedeutung besitzen. Zur Charakterisierung der Serotypen werden besonders die sogenannten O-Antigene (spezifische Seitenketten des Lipopolysaccharids) für die Agglutinationsmethode herangezogen, allerdings sind diese nicht spezies-spezifisch im Gegensatz zu den H-Antigenen. Die H-Antigene können, wenn sie in bestimmten, signifikanten Kombinationen vorliegen, für die Unterscheidung zwischen pathogenen und apathogenen Stämmen herangezogen werden. Nach ALEKSIC und BOCKEMÜHL (1990) sind mittlerweile 60 O-Serotypen von *Y. enterocolitica* bekannt. Davon entfallen nur 28 Serotypen auf *Y. enterocolitica*, 12 auf *Y. frederiksenii*, 11 auf *Y. intermedia* und 9 auf *Y. kristensenii*. Aus einer Übersicht nach BOTTONE (1999) geht hervor, dass das Schwein vor allem ein Hauptreservoir bei den humanpathogenen Biotypen 1B, 2, 3 und 4 darstellt. Während in den USA neben dem sich vermehrt verbreiteten Serotyp O:3 besonders der Biotyp 1B mit den Serotypen O:4, O:8, O:13, O:20, O:21 auftritt, sind in Mitteleuropa vor allem die Serotypen O:3 (Biotyp 4), O:9 (Biotyp 2) und O:5,27 (Biotyp 3) von pathologischer Bedeutung.

Die Virulenz bzw. Pathogenität von *Y. enterocolitica*-Stämmen wird sowohl durch plasmidkodierte als auch durch chromosomal determinierte Faktoren bestimmt. Die Ausbildung dieser Faktoren ist temperaturabhängig. Die nach BOTTONE (1997) wichtigsten Pathogenitätsfaktoren sind in Tabelle 6 dargestellt. Alle virulenten Stämme der Gattung *Yersinia* besitzen ein 70 kilobase-Plasmid, das für wichtige Virulenzfaktoren kodiert (HEESEMAN 1990). Das Virulenzplasmid pYV (plasmid for *Yersinia* Virulence), das als unentbehrlich für die *Yersinia*-Virulenz gilt, konnte in den allgemein als apathogen anerkannten 1A Biotypen nicht gefunden werden (ROBINS-BROWNE et al. 1989). Pathogene *Y. enterocolitica* Stämme weisen meist bestimmte phänotypische Merkmale auf, die zur Identifikation in der Diagnostik herangezogen werden können. Beispiele für solche phänotypischen Merkmale, die auf der Anwesenheit des Virulenzplasmids beruhen, sind: Autoagglutination in bestimmten Medien (LAIRD und CAVANAUGH 1980, AULISIO et al. 1983), Calcium-Abhängigkeit des Wachstums

(GEMSKI et al. 1980) und Kristallviolett-Bindung bei 35-37°C (BHADURI et al. 1987), Dissoziation in kleine (Plasmid-positive) und große (Plasmid-negative) Kolonien (ALEKSIC et al. 1988) und Kongorotbindung (PRPIĆ et al. 1983). Unterschiedliche Forschungen haben allerdings zu dem Ergebnis geführt, dass die alleinige Anwesenheit des Plasmids nicht zur Ausbildung der vollen Virulenz von *Yersinien* ausreicht (HEESEMAN et al. 1984, PORTNOY und MARTINEZ, 1985, SCHIEMANN 1989). Diese Beobachtungen initiierten die Suche nach ergänzenden chromosomal kodierten Virulenzfaktoren wie z. B. das *inv*- oder *ail*-Gen, die ebenfalls an der Pathogenese von *Y. enterocolitica* Infektionen beteiligt sind (HEESEMAN et al. 1984, MILLER and FALKOW 1988, ISBERG 1989, MILLER et al. 1989).

Tabelle 6: Zusammenfassung wichtiger Pathogenitätsfaktoren von *Y. enterocolitica* und ihre Temperaturabhängigkeit (nach BOTTONE 1997)

Lokalisation	Pathogenitätsfaktor	Expression bei 37°C	Expression bei ≤25°C
Chromosom	Struktur der Lipopolysachharide (Kolonieform)	Kurzkettig (rauh)	Langkettig (glatt)
	Zellmorphologie	pleomorph	kokkoid
	Bindung an Phagozyten	schwach	stark
	Peritriche Begeißelung / Beweglichkeit	Nein	Ja
	Invasin (<i>inv</i>)	gering	stark
	attachment invasion locus (<i>ail</i>)	hoch	schlecht
	Enterotoxinproduktion	Nein	Ja
	Yersiniabactin	Ja ^a	Nein
Plasmid	Spezifische Proteine der äußeren Membran (YOPs)	Ja	Nein
	Oberflächenhydrophobizität	Ja	Nein
	Calciumabhängigkeit des Wachstums	Ja	Nein
	Autoagglutination	Ja	Nein
	Tyrosinphosphatase	Ja	Nein
	Resistenz gegen Phagozytose	Ja	Nein
	Resistenz gegen Makrophagen	gut	schlecht

Lokalisation	Pathogenitätsfaktor	Expression bei 37 °C	Expression bei ≤25 °C
Plasmid	Resistenz gegen Serumbakterizide ^b	Ja	Nein

^a Serotypen O:4, O:4,32, O:8 und O:21

^b kann je nach Serotyp variieren (z. B. Serotyp O:3 bei ≤25 °C serumresistenter als O:8)

3 Identifikation von pathogener *Y. enterocolitica*

3.1 Bedeutende Virulenzmarker in der molekularbiologischen Diagnostik von pathogener *Y. enterocolitica*

Für die molekularbiologische Identifikation von pathogener *Y. enterocolitica* werden immer häufiger Verfahren eingesetzt, die auf Sequenzdaten von chromosomalen und plasmidalen Virulenzgenen basieren. Tabelle 7 zeigt eine Übersicht wichtiger chromosomal und plasmidal lokalisierter Virulenzfaktoren sowie deren pathogenetischer Eigenschaften. Die Zielgene *yadA*, *virF*, *inv*, *ail* und *ystA* werden in der molekularbiologischen Diagnostik häufig zur Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* eingesetzt (CARNIEL 1995).

Tabelle 7: Bedeutende Virulenzfaktoren von pathogener *Y. enterocolitica* inklusive ihrer pathogenetischen Funktion (CARNIEL 1995)

Genetische Lokalisation	Gen	Virulenzfaktor	Funktion
Plasmid	<i>ysc/yop</i>	Yops	Phagozytoseresistenz
	<i>yadA</i> , <i>virF</i>	YadA, VirF	Adhäsion, Invasion, Serumresistenz
Chromosom	<i>inv</i>	Invasin	Adhäsion, Invasion
	<i>ail</i>	Ail	Adhäsion, Invasion, Serumresistenz
	<i>ystA</i>	YstA	Flüssigkeitssekretion im Darm
	<i>pgm</i>	HPI	Eisenaufnahme

Das Virulenzplasmid pYV kodiert für den Yop (*Yersinia outer membran protein*)-Sekretionsapparat. An der Kodierung sind partiell verschiedene Gene beteiligt, sogenannte *ysc* (*Yop Secretion*)-Gene. Die Yops werden über diesen Apparat in eukaryotische Zellen geschleust und induzieren dort u. a. Phagozytoseinhibition, Entzündungen sowie Apoptose von Makrophagen. Daneben beherbergt pYV das *virF* (*virulence*)-Gen sowie das für das Yersinia Adhäsion (Yad A) kodierende *yadA*-Gen. Dabei stellt *virF* einen bedeutenden Transkriptionsfaktor des ebenfalls auf dem Plasmid gelegenen Yop (*Yersinia outer protein*)-Regulon dar (CORNELIS et al. 1998). Zum Yop-Regulon gehört auch das *yadA*-Gen (*Yersinia Adhäsion*), das für ein Protein kodiert, welches die bakterielle Adhäsion erleichtert (BRUBAKER 1991, CORNELIS et al. 1998). Da in Umweltisolaten, nicht-pathogenen *Y. enterocolitica*-Stämmen und in nicht-pathogenen *Yersinia*-Spezies bisher kein Virulenzplasmid gefunden wurde (SCHIEMANN und DEVENISH, 1982; HILL et al., 1983), spricht die Detektion dieser plasmidalen Zielgene in der Diagnostik für das Vorhandensein von pYV (WEYNANTS et al. 1996, GIERCZYNSKI 2000, ARNOLD et al. 2001, THOERNER et al. 2003) und somit für die Detektion von pathogenen Yersinien.

Bisher wurde das Virulenzplasmid häufig zur Evaluierung der Pathogenität von *Y. enterocolitica* in der Diagnostik eingesetzt (WREN und TABAQCHALI 1990, NAKAJIMA et al. 1992, WEYNANTS et al. 1996, THOERNER et al. 2003). Allerdings kann der Verlust des Plasmids während der Kultivierung zu falsch-negativen Ergebnissen führen (ZINK et al. 1980, PORTNOY et al. 1981b, PORTNOY and FALKOW 1981a, SCHIEMANN 1989, WREN und TABAQCHALI 1990). Aufgrund dieser Tatsache wurden sowohl in PCR Untersuchungen (DELOR et al. 1990, FENWICK und MURRAY 1991, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2007, THISTED LAMBERTZ et al. 2007) als auch in Kolonie-Hybridisierungen (KWAGA et al. 1992, GOVERDE et al. 1993) chromosomale Virulenzfaktoren zur Evaluierung der Pathogenität von Yersinien eingesetzt, da diese plasmid-unabhängigen Faktoren ebenfalls an der Pathogenese von *Y. enterocolitica*-Infektionen beteiligt sind (HEESEMAN et al. 1984, ISBERG 1989, MILLER and FALKOW 1988, MILLER et al. 1989). Von den chromosomal kodierten Virulenzfaktoren sind das *inv*-, *ail*- und *yst*-Gen in der Diagnostik häufig eingesetzte Zielgene. Das *ail*-Gen (*attachment invasion locus*) ist ein

chromosomal lokalisiertes Gen, dem MILLER et al. (1989) eine Rolle als Virulenzfaktor in der *Y. enterocolitica* Pathogenese zusprechen. Das Gen kodiert für das auf der äußeren Membran liegende Ail-Protein, das die bakterielle Invasion in eukaryotische Zellen fördert und an der bakteriellen Resistenz gegenüber komplementären Faktoren beteiligt ist (CARNIEL 1995). Das vom *inv*-Gen kodierte Protein Invasin, ist wie das Ail-Protein ein Faktor, der an der bakteriellen Invasion beteiligt ist. DNA Homologe von *inv* können in allen *Yersinia* Spezies gefunden werden (MILLER et al. 1989, ROBINS-BROWNE et al. 1989), allerdings wird das Invasin-Protein in Umweltisolaten nicht produziert (PIERSON und FALKOW 1990). Yst, ein durch das *yst*-Gen kodiertes Enterotoxin (DELOR et al. 1990) stellt einen Virulenzfaktor dar, der innerhalb von *Y. enterocolitica* Stämmen in unterschiedlicher Form angetroffen wird.

Mit dem Einsatz von ausschließlich chromosomalen Zielgenen in der Diagnostik von pathogenen Yersinien ist im Gegensatz zu plasmidalen Zielgenen die Detektion von potentiell pathogenen Yersinien möglich (ROBINS-BROWNE et al. 1989). Zielführend ist allerdings die Verwendung von sowohl chromosomal kodierten wie auch plasmidal kodierten Genen, da nur Stämme, welche sowohl chromosomale, als auch auf dem Plasmid lokalisierte Virulenzgene besitzen, als vollständig virulent angesehen werden (GRANT et al. 1998, WEAGANT et al. 1999).

3.2 Einsatz bedeutender Virulenzmarker in der molekularbiologischen Diagnostik von pathogener *Y. enterocolitica*

3.2.1 Kolonie-Hybridisierung

Die Kolonie Hybridisierungs-Verfahren wurden schon früh entwickelt, um Mikroorganismen aus Lebensmitteln zu identifizieren. Unter der Verwendung von Digoxigenin(DIG)- oder radioaktiv-markierten Gen-Sonden werden wie in PCR-Untersuchungen sowohl plasmidal (JAGOW und HILL 1986, MILIOTIS et al. 1989) als auch chromosomal (GOVERDE et al. 1993, DURISIN et al. 1998) kodierte Virulenzfaktoren zur Detektion pathogener Keime herangezogen. Eine

Übersicht der am häufigsten in Kolonie-Hybridisierungen untersuchten Zielgene, der eingesetzten Sonden sowie des untersuchten Materials zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8: Übersicht der am häufigsten in Kolonie-Hybridisierungen untersuchten Zielgene, der eingesetzten Sonden und der untersuchten Proben

Genort	Gen	Sondenart	Proben	Quelle
Plasmid	Restriktions-fragmente	Radioaktiv markiert, geklont	Reinkultur	Hill et al. (1983)
Plasmid	Restriktions-fragmente	Radioaktiv markiert, geklont	künstlich kontaminierte Lebensmittel	Jagow und Hill (1986)
Plasmid	Restriktions-fragmente	24bp-Oligonukleotid, radioaktiv markiert, geklont	künstlich kontaminierte Lebensmittel	Miliotis et al. (1989)
Plasmid, Chromosom	Restriktions-fragmente mit 8 Plasmidregionen, Vektorplasmid-fragmente mit <i>ail</i> - und <i>inv</i> -Regionen	radioaktiv markiert, geklont	Reinkultur	Robins-Browne et al. (1989)
Chromosom	Vektorplasmid-fragmente mit <i>ail</i> - und <i>inv</i> -Regionen	radioaktiv markiert, geklont	Reinkultur	Miller et al. (1989)
Plasmid	<i>yopA</i>	Synthetische 19bp Oligonukleotid und geklonte Polynukleotid Sonde, radioaktiv markiert	Reinkultur	Kapperud et al. (1990)
Plasmid	<i>yadA/yopA</i>	Synthetische 19bp Oligonukleotid Sonde, radioaktiv markiert	natürlich kontaminierte Schweineprodukte	Nesbakken et al. (1991)

Genort	Gen	Sondenart	Proben	Quelle
Chromosom	<i>ail, inv, yst</i>	Digoxigenin(DIG)-markierte, Polynukleotidsonde, geklont	Reinkultur	Kwaga et al. (1992)
Chromosom	<i>ail, inv</i>	Oligonukleotid-Sonde, radioaktiv markiert, geklont	Reinkultur	Feng (1992)
Chromosom	<i>ail, inv</i>	DIG-markierte Polynukleotidsonde, geklont	humane Stuhlproben, Schweine- und Schlachthausproben	Goverde et al. (1993)
Chromosom	<i>yst</i>	145 bp-DIG-markierte Sonde, synthetisiert	Reinkultur	Durisin et al. (1998)
Plasmid	<i>virF, yadA</i>	synthetische DIG-markierte Polynukleotidsonden	Reinkultur, künstlich kontaminierte Lebensmittel	Weagant et al. (1999)

Drei radioaktiv-markierte Restriktionsfragmente des *Y. enterocolitica* Plasmids pYV waren die ersten Sonden, die in einer Kolonie-Hybridisierungstechnik zur Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* in künstlich kontaminierten Lebensmittelproben herangezogen wurden (HILL et al. 1983). Weitere Experimente mit pYV-Restriktionsfragmenten wurden von unterschiedlichen Autoren berichtet (JAGOW und HILL 1986, MILIOTIS et al. 1989, ROBINS-BROWNE et al. 1989).

Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* in Reinkulturen

Sowohl in neueren als auch in älteren Untersuchungen wurden allerdings überwiegend Reinstämme zur Spezifitätsprüfung der hergestellten Sonden eingesetzt. ROBINS-BROWNE et al. (1989) präparierten zu den bisher

beschriebenen plasmidal basierenden Sonden zusätzlich Sonden, die auf den chromosomalen Genorten *ail* und *inv* basierten. Dabei erfolgte die Übertragung (Klonen) der chromosomalen Gene in sogenannte Vektorplasmide. Die aus der *ail*-Region präparierten Sonden hybridisierten in diesen Experimenten exklusiv nur mit Reinstämmen von pathogener *Y. enterocolitica*, wohingegen das diagnostische Potential der *inv*-Sonde vom *inv*-Ursprungsort abhängig war. Sonden, die aus der *inv*-Region von *Y. pseudotuberculosis* präpariert worden waren, hybridisierten mit Reinstämmen von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*, und Sonden aus der *inv*-Region von *Y. enterocolitica* hybridisierten mit allen Reinstämmen von *Yersinia* Spezies. Diese Experimente verdeutlichen, wie wichtig eine Spezies-spezifische Auswahl der Sonden und damit der Zielgene zur Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* sind.

Die in den Anfängen oft eingesetzten, geklonten Sonden wurden in späteren Experimenten durch synthetisch hergestellte Sonden ersetzt. KAPPERUD et al. (1990) berichteten über den Vergleich einer synthetisierten Oligonukleotid- mit einer geklonten Polynukleotidsonde. Beide Sonden identifizierten korrekt alle *Yersinia* Reinstämme mit bekannten Plasmidprofil.

Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln

MILIOTIS et al. (1989) kombinierten ihre Hybridisierungsexperimente mit den Invasivität induzierenden Genen *ail* und *inv* mit in vitro Zellkultur-Invasionstesten. Im Gegensatz zu ROBINS-BROWNE et al. (1989) testeten sie die Spezifität der Sonden mittels artifiziell kontaminierten Lebensmitteln. Sie fanden heraus, dass eine der beiden klonierten *ail*-Sonden (*ailC*) exklusiv in Zellkultur-invasiven Stämmen (TCI^+) gefunden werden konnte. Zudem hybridisierten sie die *inv*- und *ail*-Sonden mit plasmidalen und chromosomalen Genabschnitten und konnten die Lokalisation des *inv* und *ail* Genes auf dem Chromosom bestätigen, da keine der beiden Sonden in zusätzlich durchgeführten Hybridisierungsexperimenten mit plasmidalen Genabschnitten hybridisierte. NESBAKKEN et al. (1991) verwendeten die gleiche 19-basepair große Sonde wie in dem vorangegangenen Experiment und setzten sie erstmalig zur Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* in natürlich kontaminierten Schweineprodukten ein. Dabei

verglichen sie die Sonde mit kulturellen Methoden. Sie konnten zeigen, dass die Kombination von kulturellen Methoden mit Kolonie Hybridisierung eine deutlich höhere Detektionsrate erbrachte als mit kulturellen Methoden alleine.

Die in den vorab beschriebenen Experimenten verwendeten Sonden waren zunächst alle radioaktiv markiert. In folgenden Experimenten wurden zunehmend mit dem Enzym Digoxigenin (DIG) markierte Sonden eingesetzt (KWAGA et al. 1992, GOVERDE et al. 1993, DURISIN et al. 1998, WEAGANT et al. 1999). GOVERDE et al. (1993) führten z. B. Untersuchungen von Reinstämmen, Stuhlproben des Menschen und von Schweineproben durch, um pathogene *Y. enterocolitica* mittels DIG-markierter *ail*- und *inv*-Gensonden zu detektieren.

3.2.2 PCR

Da die Hybridisierungsexperimente eine Präsenz von ca. 10^5 bis 10^6 Bakterien in den untersuchten Proben erfordern (HILL und KEASLER 1991) und das Verfahren sehr viel Zeit in Anspruch nimmt, wurden zunehmend PCR-Techniken etabliert, die eine Amplifikation der geforderten DNA-Menge innerhalb von 2 bis 3 Stunden gewährleisten. Die PCR-Methoden wurden im Gegensatz zu den Hybridisierungsverfahren vermehrt dazu eingesetzt, pathogene *Y. enterocolitica* aus natürlich kontaminierten Proben zu detektieren. Tabelle 9 liefert eine Übersicht der PCR-Methoden, die zur Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* in Reinkulturen, Lebensmitteln und klinischem Material entwickelt wurden. Obwohl die PCR Methoden zur Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* sensitiver sind als kulturelle Methoden (BOYAPALLE et al. 2001, JOHANNESSEN et al. 2000, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999), liegt ihr Nachteil in der möglichen DNA-Detektion von toten Zellen (WOLFFS et al. 2005). Bei der Detektion von toten Zellen mittels PCR können folglich, im Gegensatz zur Kolonie-Hybridisierung, keine Keime zur weiteren Untersuchung isoliert werden.

Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* in Reinkulturen

Die erste PCR-Methode zur Detektion pathogener *Y. enterocolitica* wurde 1990 durch WREN und TABAQCHALI entwickelt. WREN und TABAQCHALI (1990) und

NAKAJIMA et. al (1992) untersuchten Reinkulturen auf *virF/lcrF*-Gen basierenden Methoden. Da sowohl *Y. enterocolitica* (*virF*) als auch *Y. pseudotuberculosis* (*lcrF* von *Y. pseudotuberculosis* ist homolog zu *virF* von *Y. enterocolitica*) diesen Genlocus beherbergen, war eine Unterscheidung zwischen den Spezies nicht möglich. THOERNER et al. (2003) untersuchten mit einer PCR-Methode auf das Vorhandensein der als Virulenzmarker geltenden Gene *ystA*, *ystB*, *ail*, *inv*, *yadA* und *virF* in *Yersinia* Reinkulturen (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*), die sie aus humanen, tierischen, Umwelt- und Lebensmittelquellen isoliert hatten. Alle Stämme waren für das *Yersinia*-speziesspezifische Gen *inv* (ROBINS-BROWNE et al. 1989) positiv. Die Präsenz des *inv*-Gens in allen untersuchten *Yersinia* Reinkulturen konnte auch durch Untersuchungen von FALCÃO et al. (2006) bestätigt werden. Das chromosomal gelegene Gen *ystB* konnte nur in als apathogen geltenden Stämmen des Biotyp 1A gefunden werden, was sich mit den Untersuchungen von PLATT-SAMORAJ et al. (2006) deckte. Für die restlichen Zielgene *ystA*, *ail* und *virF* waren die untersuchten 1A Stämme negativ. Für *Y. enterocolitica* der Biotypen 1B sowie 2 bis 4 waren die Gene *ystA* und *ail* positiv. PLATT-SAMORAJ et al. (2006) untersuchten *Y. enterocolitica*-Stämme, die von Abort Material (Plazenta, Fetus) von Sauen isoliert worden waren, auf die Präsenz von *ail*-Gen sowie unterschiedliche *yst*-Gene. Wie erwartet, konnte in den pathogenen Bioserotypen 4/O:3 das *ail*- und *ystA*-Gen nachgewiesen werden. Bei apathogenen Stämmen des Biotyp 1A konnte nur das *ystB*-Gen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse deckten sich mit den Untersuchungen von SINGH und VIRDI (2004) und GIERCZYNSKI (2000). Das *ail*-Gen, das in vielen Publikationen als spezifisch für pathogene *Y. enterocolitica* Stämme beschrieben wird (MILLER et al. 1989, ROBINS-BROWNE et al. 1989), konnte auch bei allen 14 untersuchten *Y. pseudotuberculosis* Stämmen von THISTED LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM (2005) gefunden werden. Untersuchungen von FALCÃO et al. (2006) und GRANT (1998) konnten zudem das *ail*-Gen in als bisher apathogen anerkannten *Y. enterocolitica* Biotyp 1A Stämmen nachweisen. GRANT et al. (1998) war es in diesem Zusammenhang allerdings nicht möglich, das Vorhandensein des Virulenzplasmids pYV nachzuweisen, obwohl alle *ail*-positiven 1A-Stämme auch *inv* positiv, und somit *Yersinia*-Spezies waren. Die

vorangegangenen Untersuchungen zeigen, wie wichtig die Auswahl von Spezies-spezifischen Primern aus konservierten Regionen zur Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* sind.

Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln

THISTED LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM (2005) war es möglich, aufgrund der Kombination der Zielgene *yst*, *rbcC*, *ail* und *virF* in einer Multiplex-PCR-Untersuchung, die aus Lebensmitteln isolierten Yersinien anschließend in vier Gruppen einzuteilen: 1. pathogene *Y. enterocolitica* Serotyp O:3, 2. pathogene *Y. enterocolitica* andere Serotypen als O:3, 3. *Y. pseudotuberculosis* und 4. nicht-pathogene *Yersinia*-Stämme. Das *yadA*-Gen, obwohl es in unterschiedlichen *Yersinia*-Spezies gefunden wurde, bietet den Vorteil, dass es konservierte Sequenzen beherbergt, die ausschließlich in pathogenen *Y. enterocolitica*-Isolaten vorkommen (KAPPERUD et al. 1993, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999). FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999) untersuchten Schweinezungen und Schweinehackfleisch auf die Prävalenz von *yadA*-positiver *Y. enterocolitica*. Mit der PCR konnten sie eine Prävalenz von 92% in Schweinezungen und im Hackfleisch eine Prävalenz von 25% *yadA*-positiver *Y. enterocolitica* nachweisen. Die Prävalenz mit einer zum Vergleich durchgeführten kulturellen Methode fiel geringer aus: 78% positive Schweinezungen und 2% positive Hackfleischproben. BOYAPALLE et al. (2001) untersuchten artifiziell kontaminierte Schweinekot- und Schweinefleischproben auf *ail*-Gen tragende *Y. enterocolitica* Spezies. Wie FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999) stellten sie fest, dass die PCR Untersuchung im Vergleich zur kulturellen Methode die sensitivere Methode darstellte. Dazu konnten sie zeigen, dass die Sonden (TaqMan)-Real-Time PCR die sensitivste Methoden im Vergleich zu Kultur und Multiplex PCR war.

Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* in klinischem Material

SEN (2000) entwickelte auf Basis des 16S rRNA Gens ein Real-Time PCR Verfahren zur Detektion von *Y. enterocolitica* in Blutproben. Da *Y. enterocolitica* aufgrund ihres psychrotrophen Verhaltens zum Wachstum in gekühlten Transfusionsproben fähig und zu 50% an durch kontaminierten Blut-Transfusionsproben verursachten Sepsis Episoden beteiligt ist (KLEIN et al.

1997), stellt dieses Verfahren einen wichtigen Schritt zur Kontrolle von potentiell kontaminiertem Transfusionsmaterial dar. ZHENG et al. (2006) etablierten erfolgreich eine *yst*-Gen-Sonden Real-Time PCR zur Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* in humanen Stuhlproben.

Tabelle 9: PCR-Methoden, die zur Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* in Reinkulturen, Lebensmitteln und klinischem Material entwickelt wurden

Methoden	Zielgen	Untersuchte Proben	Referenz
PCR	<i>virF^P</i>	Reinkultur	Wren und Tabaqchali (1990)
PCR	<i>ail^C</i>	Reinkultur	Nakajima et al. (1992)
PCR	<i>virF^P, ail^C</i>	Zungenabstrich/Schwein, künstlich kontaminierte Lebensmittel	Bhaduri und Cottrell (1997)
PCR	<i>yst^C</i>	Reinkultur	Ibrahim et al. (1997)
PCR	<i>yadA^P</i>	Schweinezungen, Schweinehackfleisch	Fredriksson-Ahomaa et al. (1999)
PCR	<i>ail^C, virF^P</i>	Lebensmittel	Thisted-Lambertz (2000)
Real-Time PCR	<i>yst^C</i>	Schweinefleisch	Vishnubhatla et al. (2000)
Real-Time PCR	16s rRNA	Blut	Sen (2000)
Real-Time PCR	<i>ail^C</i>	Schweinefleisch, Kotproben	Boyapalle et al. (2001)
Multiplex-PCR	<i>ystA^C, ystB^C, ail^C, yadA^P, virF^P</i>	Reinkultur	Thoerner et al. (2003)
PCR	<i>yopT^P</i>	Reinkultur	Arnold et al. (2001)
Multiplex-PCR, PCR	<i>rfbC^C, ail^C, virF^P, yst^C</i>	Schweinefleisch	Thisted Lambertz und Danielsson-Tham (2005)
PCR, Duplex-PCR	<i>inv^C</i>	Reinkultur	Bhagat und Viridi, (2007)
PCR	<i>inv^C, ail^C, virF^P, ystA^C</i>	Reinkultur	Falcão et al. (2006)
Real-Time PCR	<i>yst^C</i>	Stuhlproben	Zheng et al. (2006)
Multiplex-PCR	<i>ail^C, ystA^C, ystB^C</i>	Reinkultur	Platt-Samoraj et al. (2006)

Methoden	Zielgen	Untersuchte Proben	Referenz
PCR	<i>ail^C</i>	Schweinefleisch	Thisted Lambertz et al. (2007)
Real-Time PCR	<i>ail^C</i>	Schweinefleischprodukte	Fredriksson-Ahomaa et al. (2007)

P: Lokalisation auf Plasmid

C: Lokalisation auf Chromosom

4 Yersiniose

4.1 Humane Yersiniosen

Zoonosen sind Erkrankungen, die vom Tier auf den Menschen übertragen werden. Dabei kann die Übertragung direkt vom Tier auf den Menschen oder indirekt durch die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln oder Trinkwasser (BOTTONE 1997) erfolgen. Um die Erkrankungen verhindern zu können, ist es wichtig zu eruieren, welches Tier oder Lebensmittel die Hauptquelle der verursachten Infektion ist. In Europa wird die Yersiniose hauptsächlich durch *Y. enterocolitica* verursacht, wobei *Y. pseudotuberculosis* ebenfalls ein enteropathogener Keim ist. Bei der durch *Y. enterocolitica* verursachten Yersiniose sind in den vergangenen Jahren zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden, um die verantwortliche Infektionsquelle zu hinterfragen. Das Schwein wird in diesem Zusammenhang häufig als mögliche Hauptinfektionsquelle genannt, da es in seinen Tonsillen pathogene *Y. enterocolitica* beherbergt, die beim Schlachtprozess auf den Schlachtkörper und somit auf das Lebensmittel Schweinefleisch übertragen werden können (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a). Zudem ergab die molekulare Typisierung von *Y. enterocolitica* O:3 Isolaten in Deutschland und Finnland eine mehr als 80%ige Übereinstimmung der humanen Stämme mit von Schweinen isolierten Stämmen (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2006). Neben dem Schwein kommen allerdings auch Nutz- und Haustiere als mögliche Infektionsquellen in Betracht, da auch hier humanpathogene *Y. enterocolitica* Stämme gefunden wurden (FANTASIA et al. 1985, WEBER 2004, HARTUNG 2006, LINDBLAD et al. 2006).

4.1.1 Epidemiologische Situation der Yersiniose in Deutschland und Europa

Y. enterocolitica ist nach *Campylobacter* und *Salmonella* der dritthäufigste bakterielle Erreger, der in Deutschland beim Menschen in Zusammenhang mit Darmerkrankungen registriert wird (RKI 2006). Seit der Einführung des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) am 1.1.2001 werden in Deutschland Meldedaten für viele Bakterienspezies, die an Infektionen beteiligt sind, zusammengeführt. Aufgrund dieser Meldepflicht konnten in 2005 in Deutschland 5.624 durch *Yersinia* Spezies verursachte Erkrankungen verbucht werden, gefolgt von Schweden und Finnland, die über 744 und 638 Fälle berichteten (EFSA 2006). Allerdings ist trotz der Einführung des IfSG von einer deutlichen Untererfassung auszugehen, da zum einen nicht jeder bei einer kurzen gastrointestinalen Symptomatik einen ärztlichen Rat hinzuzieht, zum anderen werden nicht immer alle Erkrankungen gemeldet. Die durch *Yersinia* Spezies verursachten Infektionen lagen 2005 in Europa (EU) mit 9.630 Erkrankungsfällen nach den Erkrankungen Campylobacteriose (197.363 Fälle) und Salmonellose (176.395) wie in Deutschland auf Platz 3 der durch Bakterien hervorgerufenen gastrointestinalen Erkrankungen (EFSA 2006). Davon waren 58,4% deutsche Fälle. Die Mehrzahl (89%) der Infektion verursachenden *Yersinia* Spezies waren *Y. enterocolitica*-Stämme mit O:3 als vorherrschenden Serotyp (EFSA 2006). Der Serotyp O:3 dominierte auch in Deutschland. Die Inzidenz der Erkrankungsfälle in Deutschland betrug 6,8 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner. Europaweit konnte eine Inzidenz von 2,6 pro 100.000 Einwohner beobachtet werden. Sowohl in Deutschland als auch in den insgesamt 21 untersuchten Mitgliedsländern der EU war kein saisonaler Zusammenhang mit dem Auftreten der Infektionen zu erkennen. Das durchschnittliche Alter der infizierten Personen lag bei 0 bis 4 Jahren, gefolgt von einem Altersdurchschnitt von 5 bis 14 Jahren, wobei Finnland mit einem durchschnittlichen Alter von 25 bis 64 Jahren eine Ausnahme darstellte. Litauen war in 2005 mit 14,6 Fällen pro 100.000 Einwohnern das EU-Land mit der höchsten Inzidenz von humanen Yersiniosen (EFSA 2006). Die Nachfolgende Tabelle (Tabelle 10) zeigt den Vergleich der *Yersinia* Epidemiologie in Deutschland und Europa im Jahr 2005.

Tabelle 10: Vergleich der *Yersinia* Epidemiologie in Deutschland (D) und Europa (EU) im Jahr 2005

Land	Yersiniose-Fälle	Inzidenz pro 100.000 Einwohner	dominierende <i>Yersinia</i> -Spezies	dominierender Serotyp	Ø Alter in Jahren	saisonale Häufung
D	5.624	6,3	<i>Y. enterocolitica</i>	O:3	0-4	nein
EU	9.630	2,6	<i>Y. enterocolitica</i>	O:3	0-4	nein

4.1.2 Klinik der Yersiniose

Nach Übertragung von *Y. enterocolitica* kommt es in der Regel nach einer Inkubationszeit von 7 bis 10 Tagen zur klinischen Yersiniose (BOTTONE 1997, HOOBKAMP-KORSTANJE und DE KONING 1990). Die enterale Yersiniose äußert sich in drei klinisch unterschiedlichen Formen: 1. Enteritis (u. a. mit Bauchschmerzen, Fieber, wässrigem Durchfall und Erbrechen), 2. terminale Ileitis oder mesenteriale Lymphadenitis, die gelegentlich mit den Symptomen einer Pseudoappendizitis einhergeht und 3. Septikämie (BOCKEMÜHL und WONG, 2003). In den meisten Fällen verläuft die Erkrankung selbstlimitierend. In seltenen Fällen kann es jedoch zu einem septischen Verlauf mit Abszessbildung in Leber und Milz kommen. Diese Form tritt vor allem bei Menschen mit geschwächter Immunabwehr und bei Patienten mit Eisenüberladung durch eine Desferal® (Eisenkomplexon) Behandlung auf und kann letal verlaufen (RABSON et al. 1975). Als postinfektiöse Komplikation kann es zum Erythema nodosum und bei Trägern des sogenannten HLA (Human Leucocyte Antigen)-B27-Gewebeantigens zur reaktiven Arthritis kommen (DEQUEKER et al. 1980, WINBLAD, 1969). Bei dem Erythema nodosum, auch Knotenrose genannt, handelt es sich um eine Entzündung der Subkutis mit Beteiligung der Kapillarwände. Patienten mit reaktiver Arthritis weisen Antigene der Erreger, nicht aber lebende Yersinien oder deren DNA-Bestandteile in den entzündeten Gelenken auf (GRANFORS et al. 1998). Gleichzeitig werden im Blut erhöhte ImmunglobulinA-Titer festgestellt, was auf eine mögliche Persistenz der Erreger in der Darmmukosa oder in den mesenterialen Lymphknoten zurückzuführen ist (DE KONING et al. 1989).

4.1.3 Pathogenese der *Y. enterocolitica* Infektion – Ein Überblick der beteiligten Virulenzfaktoren

Durch in Mausmodellen experimentell erzeugten Yersinioseerkrankungen konnte die Pathogenese der *Y. enterocolitica* verursachten Infektionen in den vergangenen Jahren ausführlich untersucht werden. Dabei wurden Krankheitsbilder erzeugt, die den humanen Infektionen sehr ähneln. *Y. enterocolitica* wird durch die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln und Trinkwasser übertragen (BOTTONE 1997). Nach Ingestion der Keime kommt es durch die Wirkung der von *Y. enterocolitica* produzierten Virulenzfaktoren, die durch chromosomale und plasmidale Gene transkribiert werden, zu folgenden Vorgängen im Organismus: Die Bakterien sind in der Lage, das intestinale Epithel mittels Invasion in die sogenannten M(Microfold)-Zellen (spezialisierte Zellen im follikelassoziierten Epithel der Peyer-Plaques) zu betreten und die im terminalen Ileum reichlich vorhandenen Lymphfollikel, die sogenannten Peyerschen Plaques (PP) zu besiedeln. Die Adhärenz an die M-Zellen der Darmmukosa und die Invasion in das darunterliegende Gewebe wird von dem äußeren Membranprotein Invasin vermittelt, das durch das chromosomale **inv**-Gen kodiert wird. Das Invasin interagiert mit dem β 1-Integrin der M-Zellen und löst den Transzytoseprozess der Yersinien aus (BRETT et al. 1993, AUTHENRIETH und FIRSCHING 1996, HUECK 1998, SCHULTE et al. 2000). Daneben existiert noch ein plasmidal kodiertes Adhäsion **YadA** (CORNELIS et al. 1998), das an der Anheftung beteiligt ist sowie das chromosomal kodierte **Ail-Protein**, dem ebenfalls eine Beteiligung an der Zelladhärenz und Invasion zugesprochen wird (CARNIEL 1995, BOTTONE 1997).

Nachdem die Yersinien die intestinalen Zellen besiedelt haben, kommt ihr **Yop** (Yersinia outer protein)-Proteinsekretionsapparat zum Einsatz. Das Virulenzplasmid **pYV** besitzt einen Yop-Proteinsekretionsapparat, dessen Untereinheiten aus verschiedenen **ysc** (yersinia secretion)-Genen bestehen. Diese im Sekretionsapparat enthaltenen ysc-Gene kodieren für bestimmte Effektorproteine, die **Yops** (Yersinia outer proteins). An der Yop-Transkription ist der Transkriptionsfaktor **virF** beteiligt. Die Yop-Effektorproteine werden nach Kontaktaufnahme in die Wirtszelle injiziert. Ihre zytotoxische Wirkung besteht in

der Paralyse von Makrophagen und Induktion der Apoptose von Phagozyten (CORNELIS et al. 1998). Durch die Schädigung dieser in der Immunabwehr primär vorkommenden Abwehrzellen, kommt es zur Verhinderung der Phagozytose. Durch die verminderte Abwehr können sich die Yersinien lokal in den PP sowie in den regionären Lymphknoten vermehren und erreichen hohe Keimzahlen (HUECK 1998).

Ausgehend von den PP können die Yersinien zu den mesenterialen Lymphknoten (MLN) gelangen und von dort aus eine systemische Infektion etablieren (CARTER 1975). Dabei kann den Yersinien ihre Serumresistenz helfen, d.h. sie werden z. B. nicht von dem Membranangriffskomplex (MAC) während der Komplementaktivierung lysiert. Die Serumresistenz von *Y. enterocolitica* wird durch die bereits genannten Virulenzfaktoren **yadA** und **ail** vermittelt (BLISKA und FALKOW 1992, PILZ et al. 1992). Bestimmte *Y. enterocolitica* Stämme (v. a. Biotyp 1B mit den Serotypen O:8, O:13a,13b und O:20) sind zudem in der Lage, mittels eines chromosomal lokalisierten „High Pathogenicity Island“ (**HPI**), das für die Bildung des Eisen-bindenden Siderophors „Yersiniabactin“ (Eisenbindeprotein) kodiert, besonders schwere Verläufe der Yersinioseerkrankung zu verursachen. Die Siderophore helfen bestimmten *Y. enterocolitica* Stämmen, den Bedarf an Eisen durch die Bildung eines Eisen-Siderophor-Komplexes zu decken. Yersinien können aber auch exogen vorhandene Siderophore benutzen, wie zum Beispiel das Ferrioxamin, das unter dem Namen Desferal[®] zur Behandlung bei Patienten mit Eisenüberschuss eingesetzt wird. Patienten, die aufgrund von hämolytischen Anämien, chronischen Niereninsuffizienzen, häufigen Bluttransfusionen durch den Zerfall von Erythrozyten vermehrt Eisen im Blut aufweisen, können ebenfalls eine systemische Infektion entwickeln, ohne dass hochpathogene Yersiniabactin-haltige Stämme beteiligt sind (CHIU et al. 1986, HEESEMANN et al. 1993, CARNIEL 1995, BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Die ohne Siderophore ausgestatteten *Y. enterocolitica* Stämme (Serotypen O:3, O:9 und O:5,27) können nämlich ihren Eisenbedarf auch in Form des aus dem Hämoglobin freiwerdenden Hämins decken (BOTTONNE 1997, BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Das Enterotoxin **Yst**, das durch das chromosomale **yst**-Gen kodiert wird, ist strukturell und funktionell dem Enterotoxin von *E. coli* ähnlich (DELOR und CORNELIS

1992). Die Rolle von Yst beim Durchfallgeschehen von Yersinioseerkrankungen muss wissenschaftlich weiter untersucht werden, da es nur bei Temperaturen unter 30 °C gebildet wird (BOYCE et al. 1979).

4.2 Yersiniose bei Tieren

Y. enterocolitica kommt bei nahezu allen warmblütigen Wild-, Nutz- und Heimtieren vor und wurde darüber hinaus auch bei Reptilien, Fischen, Muscheln und Insekten nachgewiesen (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Allerdings ist die Mehrzahl der Nachweise bei Tieren nicht mit der Angabe von Krankheitssymptomen verknüpft. Die Stämme mit besonders pathogenem Potential für Tiere sind die Serogruppen O:1,2a,3 (Biotyp 3) für Chinchillas, und Serogruppe O:2a,2b,3 (Biotyp 5) für Hasen, Kaninchen, Ziegen, und andere Großtiere. In der Regel verlaufen die Infektionen von Tieren mit pathogener *Y. enterocolitica* symptomlos. Ausscheidungen von pathogener *Y. enterocolitica* stellen allerdings eine potentielle Kontaminationsquelle dar. (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004).

Yersiniosen entstehen sowohl bei wilden als auch bei domestizierten Tieren in der Regel durch *Y. pseudotuberculosis*. Die Erkrankung verläuft akut septikämisch oder chronisch mit Fieber, Abmagerung, Schwäche, respiratorischen Symptomen, Lähmungen und Durchfall. Als Reservoir werden Nager, Hasenartige und Wildvögel aufgeführt. (DEDIÉ et al. 1993). Unterschiedliche Studien haben ferner gezeigt, dass auch das Schwein ein wichtiges Reservoir für *Y. pseudotuberculosis* darstellt und vermutlich an der Epidemiologie von humanen, durch *Y. pseudotuberculosis* verursachten Infektionen beteiligt ist (SHIOZAWA et al. 1988).

4.2.1 Epidemiologische Situation der Yersiniose bei Nutztieren

Unter den Nutztieren wurde *Y. enterocolitica* 2005 hauptsächlich bei Rindern und Schweinen in den einzelnen Bundesländern nachgewiesen. Dabei wurden Rinder im Vergleich zum Vorjahr mit der fast doppelten Anzahl untersucht, Schweine etwa 10% häufiger. *Y. enterocolitica* wurde zu 0,91% weniger gefunden als im Vorjahr (2003: 1,14%). Die Nachweisrate beim Schwein ging auf 0,3% zurück. Die

festgestellten Serotypen waren beim Rind O:9 und beim Schwein O:3 und O:6. Bei Ziegen, Schafen und Hühnern wurde kein *Y. enterocolitica*-Stamm nachgewiesen (HARTUNG 2006). Inwieweit Geflügel eine Rolle bei der Infektion des Menschen durch pathogene Yersinien spielt bleibt offen, da die Untersuchungsergebnisse zur Prävalenz von pathogener *Y. enterocolitica* beim Geflügel sehr unterschiedlich ausfallen. In 1.890 Einzeltieruntersuchungen, die in 7 unterschiedlichen deutschen Bundesländern in 2004 durchgeführt wurden (HARTUNG 2006), sowie in Untersuchungen von Schnabelhöhlen und Fäzes (BUCHER et al. 2002b) konnten keine pathogenen *Y. enterocolitica* Stämme gefunden werden. Allerdings war es LINDBLAD et al. (2006) möglich, pathogene *Y. enterocolitica* in gekühlten Hähnchen-Schlachtkörpern mittels PCR-Untersuchung mit einer Prävalenz von 9% nachzuweisen. Die 636 Proben wurden aus 10 unterschiedlichen Schlachthäusern in Schweden entnommen und untersucht.

4.2.2 Yersiniose beim Schwein

Das Schwein gilt allgemein als asymptomatischer Träger und Reservoir für humane Yersiniosen. Erkrankungsfälle treten in der Regel bei Jungtieren auf. SHIOZAWA et al. (1991) konnten bei einer Untersuchung der Tonsillen bei klinisch gesunden, aber *Y. enterocolitica* tragenden Schlachtschweinen eine Tonsillitis mit kleinen Abszessen mittels Gewebeuntersuchungen feststellen. NATTERMANN et al. (1986) konnten bei erkrankten Ferkeln den Serotyp O:3 Biotyp 4 anzüchten. Die Symptome der untersuchten Herdentiere reichten von katarrhalischen Enteritiden, Serositiden bis zu Arthritiden. Dazu beschrieben NATTERMANN et al. (1986) durch experimentelle Infektionen verursachte Epiphysiolysen sowie dem humanen Erythema nodosum ähnliche Hautveränderungen mit Juckreiz und Rauschestörungen. BRUGMANN et al. (2001) identifizierten *Y. enterocolitica* Serotyp O:3 Biotyp 4 als den Verursacher einer letalen Enteritis mit Septikämie bei einem Minipig.

4.2.3 Yersiniose beim Rind

Rinder können Träger pathogener *Y. enterocolitica* sein und diese mit den Fäzes ausscheiden. Dabei kann die ermolkene Milch mit humanpathogenen Serotypen kontaminiert werden (DEDIÉ et al. 1993). Der vorherrschende Serotyp war nach Untersuchungen in Deutschland beim Rind O:9. Bei den zu den Rindern genannten Zahlen ist allerdings zu beachten, dass die hohen Untersuchungszahlen auf den Routineuntersuchungen auf Brucellose basieren (HARTUNG 2006). Zudem kann es zu Kreuzreaktionen zwischen Brucellen und *Y. enterocolitica* O:9 kommen (MITTAL et al. 1985). Yersiniosen können beim Rind klinische Komplikationen wie z. B. Aborte und Fruchtbarkeitsstörungen (NATTERMANN et al. 1986) verursachen.

4.2.4 Yersiniose bei kleinen Wiederkäuern

Yersiniosen bei kleinen Wiederkäuern scheinen wie bei Rind und Schwein Faktoren bedingte Krankheiten zu sein. Zum einen tritt die Erkrankung überwiegend bei Lämmern auf, zum anderen konnte ein Zusammenhang mit Stressoren wie Futterumstellung, Absetzen, Scheren, Aufzucht, sehr feuchtem Klima und Parasiteninfestationen hergestellt werden (NEUBAUER et al. 2001). In Europa kommt bei kleinen Wiederkäuern (Schaf, Ziege) hauptsächlich der *Y. enterocolitica* Typ Serotyp O:2a,2b,3b,c Biotyp 5 vor (WUTHE und ALEKSIC 1997).

4.2.5 Yersiniose beim Nutzgeflügel

NATTERMANN et al. (1986) berichteten über die Isolierung von pathogener *Y. enterocolitica* des Serotyps O:3 und O:9 bei zur Sektion gelangten Hühnern. Aufgrund der Keimisolate und der dazugehörigen pathologisch-anatomischen Befunde schlossen sie auf eine Beteiligung der isolierten *Y. enterocolitica* an Erkrankungen der untersuchten Hühner.

4.2.6 Yersiniose und Epidemiologische Situation bei Haus- und Heimtieren

Chinchilla

In Europa wurde bisher über zahlreiche Infektionen durch die Serotypen O:1,2a,3 Biotyp 3 von *Y. enterocolitica* bei Chinchillas berichtet, wobei sich der Erreger in den Zuchten subklinisch zu halten scheint und gelegentlich Ausbrüche verursacht. Die Yersiniose äußert sich hier als fibrinöse Enterocolitis mit Granulombildung in Leber, Milz, Lunge und intestinaler Mukosa. Die Veränderungen können mit der Pseudotuberkulose der Nagetiere (Rodentiose) verwechselt werden (WUTHE und ALEKSIC 1992). Des Weiteren findet man septische Verläufe in der Literatur (NEUBAUER et al. 2001).

Hund und Katze

Der *Y. enterocolitica* Serotyp O:3 konnte in 2005 bei Hund und Katze in Deutschland nachgewiesen werden (EFSA 2006). Bei Hunden ergaben die Untersuchungen mit 1,12% einen Anstieg der *Y. enterocolitica* Fälle verglichen zum Jahr 2003 mit 0,52% (HARTUNG 2006). Durch die in weltweit verschiedenen Ländern durchgeführten bakteriologischen Untersuchungen konnten für die Tierarten Hund und Katze für die als humanpathogen geltenden Serotypen von *Y. enterocolitica* folgende Nachweisquoten ermittelt werden: Hunde wiesen eine Prävalenz 0 bis 1% auf und Katzen eine Prävalenz von 0 bis 2,2% (WEBER 2004). Die Infektkette Hund/Katze-Mensch konnte allerdings bislang weder durch kulturelle noch durch serologische Untersuchungen bestätigt werden. Man kann jedoch nicht ausschließen, dass für Mensch und Heimtiere möglicherweise die gleichen Infektionsquellen existieren. FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001b) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass rohes Schweinefleisch eine wichtige Infektionsquelle für *Y. enterocolitica* 4/O:3 Infektionen bei Hund und Katze darstellt. Im allgemeinen sind von den Erkrankungen eher junge Hunde betroffen (FUKUSHIMA et al. 1984). Kommt es dennoch zur Infektion, können klinisch abdominale Zysten, blutig-schleimiger Durchfall, Infektion der Anldrüsen und mesenteriale Adenitis beobachtet werden (NEUBAUER et al. 2001). Katzen können asymptomatische Träger von pathogener *Y. enterocolitica* sein. Dennoch wurde über sporadische Fälle von Durchfallerkrankungen berichtet, bei denen der Serotyp O:9 isoliert werden konnte (WEBER und LEMBKE 1981).

Pferd

In 1.623 Einzeltieruntersuchungen konnte beim Pferd im Jahr 2004 in Deutschland kein *Y. enterocolitica*-Stamm nachgewiesen werden (HARTUNG 2006). NATTERMANN et al. (1986) war es möglich, in Abortmaterial von 9 Pferden *Y. enterocolitica* Spezies nachzuweisen. Diese Ergebnisse lassen eine Beteiligung an möglichen Fruchtbarkeitsstörungen vermuten. KATAYAMA et al. (2001) berichteten über eine mit Histoplasmose vergesellschaftete Yersinioseerkrankung bei einem Pferd. *Y. enterocolitica* Keime konnten durch immunhistochemische Untersuchungen in Makrophagen aus Granulomen von Duodenum, Lunge, Leber und abdominalen Lymphknoten detektiert werden.

5 Verhalten von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln

Y. enterocolitica ist ein psychrotrophes Bakterium und kann in Lebensmitteln selbst bei **Kühlschranktemperaturen** überleben und wachsen (HANNA et al. 1976; BERCOVIER und MOLLARET 1984). Auch eine Lagerung in **tiefgekühltem Zustand** können die Bakterien überdauern (SCHIEMANN 1989). *Y. enterocolitica* ist nicht sehr hitzestabil. Nach HEIM et al. (1984) genügte eine 15minütige Erhitzung bei +57°C oder eine 5minütige Erhitzung bei +60°C zur Inaktivierung der Keime. Die bei der Herstellung von Koch- und Brühwürsten angewendeten Temperaturen müssten zur Abtötung von *Y. enterocolitica* in diesen Produkten in der Regel ausreichen, da der Keim die Pasteurisierung nicht überlebt (HANNA et al. 1977, SWAMINATHAN et al. 1982). *Y. enterocolitica* kann bei einem **ph-Wert** von 4.0 bis 10.0 wachsen. Der optimale ph-Wert für ihr Wachstum liegt allerdings bei 7.2 bis 7.4. (BERCOVIER und MOLLARET 1984). Für eine Vermehrung benötigen Bakterien eine bestimmte Menge an zur Verfügung stehendem Wasser (**a_w-Wert**). *Y. enterocolitica* benötigt wie andere *Enterobacteriaceae* für ihr Wachstum einen a_w-Wert von mindestens 0,95 (FEHLHABER und JANETSCHKE 1992). Steigende **Nitritsalzkonzentrationen** hemmen die Vermehrung von *Y. enterocolitica*, vor allem bei gleichzeitig erhöhtem **Kochsalzgehalt** und einem sauren ph-Wert (HEIM et al. 1984). Die Bakterien können zudem in vakuumverpacktem Fleisch und Fleischprodukten und bei **Verpackung** unter CO₂-modifizierter Atmosphäre im Kühlschrank überleben und sich vermehren

(HARTUNG und GERIGK 1991, HUDSON et al. 1994, BODNARUK und DRAUGHON 1998)

6 Vorkommen von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln – Situation in Deutschland und Europa

Nach dem Bundesinstitut für Risikobewertung (HARTUNG 2006) wurde *Y. enterocolitica* 2004 in Lebensmittel-Planproben nur in Schweinefleisch gefunden. Hier konnte *Y. enterocolitica* in einem Fall (Serotyp O:3 Biotyp 4) mit einer Prävalenz von 1,85% nachgewiesen werden (HARTUNG 2006). Allerdings ist die Anzahl der gezogenen Planproben nach Angaben des BfR erheblich zurückgegangen. In weiteren Rohfleisch- und Rohfleischerzeugnissen wurde *Y. enterocolitica* 2004 im Gegensatz zum Vorjahr (6%) nicht mehr nachgewiesen.

Laut der European Food Safety Authority (EFSA 2006) wurden von vier europäischen Mitgliedsländern Daten zu Prävalenzen von *Y. enterocolitica* in Lebensmittelproben im Jahr 2005 übermittelt. Schweineprodukte waren hier dominierende Proben, aus denen *Y. enterocolitica* isoliert werden konnte. Dabei konnten auf Einzelhandelsebene Prävalenzen zwischen 0 bis 16,7% ermittelt werden und auf Verarbeitungsebene Prävalenzen von 0 bis 5,6%. Italien wies dabei die höchste Prävalenz auf Verarbeitungsebene auf. Die nachfolgende Tabelle 11 zeigt die Prävalenz von *Y. enterocolitica* in Schweinefleisch und -Produkten auf Einzelhandels- und Verarbeitungsebene in Europa noch einmal in zusammengefasster Form.

Tabelle 11: Prävalenz von *Y. enterocolitica* in Schweinefleisch und -Produkten auf Einzelhandels- und Verarbeitungsebene in Europa

Land	Produkt	Probenanzahl	Positive Proben	Prävalenz in %
Verarbeitung				
Belgien	Hackfleisch	293	2	0,7
Italien	Produkte ^a	197	11	5,6

Land	Produkt	Probenanzahl	Positive Proben	Prävalenz in %
Einzelhandel				
Belgien	Hackfleisch	155	1	0,7
Italien	Fleisch	250	3	1,2
unbekannt				
Deutschland	Fleisch	48	8	16,7
	Hackfleisch	71	7	9,9

a: keine weitere Differenzierung angegeben

Drei Mitglieder der EU (EFSA 2006) berichteten über die Prävalenz von *Y. enterocolitica* in Rindfleisch, Milch und Molkereierzeugnissen (Tabelle 12). Dabei reichte die Prävalenz von *Y. enterocolitica* in frischem Rindfleisch von 0 bis 4,4%. Allerdings wurden keine Daten zur Pathogenität der detektierten Keime angegeben. Spanien war das Land, das über die höchste Prävalenz von positiven Proben auf Einzelhandelsebene berichtete. In Deutschland konnte *Y. enterocolitica* in einer Rohmilch-Probe detektiert werden.

Tabelle 12: Prävalenz von *Y. enterocolitica* in Rindfleisch, -Produkten, -Milch und Molkereierzeugnissen auf Einzelhandelsebene in Europa

Land	Produkt	Probenanzahl	Positive Proben	Prävalenz in %
Einzelhandel				
Spanien	Fleisch	46	2	4,4
unbekannt				
Italien	Fleisch	207	1	0,5
Deutschland	Rohmilch	85	1	1,2

2 Mitglieder (Spanien, Italien) berichteten über Untersuchungen zur Prävalenz von *Y. enterocolitica* in Geflügelfleisch (Tabelle 13). In Spanien konnte eine Prävalenz

von 7,6% auf Einzelhandelsebene und eine Prävalenz von 20,5% auf Verarbeitungsebene erhoben werden (EFSA 2006). Auch hier wurden keine Daten zur Pathogenität der detektierten Keime angegeben.

Tabelle 13: Prävalenz von *Y. enterocolitica* in Geflügelfleisch und -Produkten auf Einzelhandelsebene in Europa

Land	Produkt	Probenanzahl	Positive Proben	Prävalenz in %
Verarbeitung				
Spanien	Fleisch	39	8	20,5
Einzelhandel				
Spanien	Fleisch	172	13	7,6

Darüber hinaus berichtete Finnland über eine Prävalenz von 8% (12 von 150) bei *Y. enterocolitica* in Gemüseproben auf Verarbeitungsebene. Die Prävalenz auf Einzelhandelsebene war mit 86% (31 von 36) deutlich höher. Allerdings waren die Isolate alle vom nicht-pathogenen Biotyp 1A.

Generell sind die Zusammenträge aus den EU-Mitgliedsländern noch sehr spärlich und bedürfen einer Intensivierung in den Untersuchungen zur Verteilung von *Y. enterocolitica* in Lebensmittelproben. Zudem fehlen in vielen Fällen die Angaben zum Serotyp bzw. zu vorhandenen Virulenzfaktoren und damit über das pathogene Potential dieser Isolate. Die Tatsache, dass die durch *Yersinia* Spezies verursachten Lebensmittel-bedingten Infektionen sowohl in Deutschland als auch in Europa an dritter Stelle stehen, bekräftigt den Bedarf nach weitergehenden Untersuchungen in den einzelnen Ländern.

Neben den Daten, die in der EU aufgrund von Planproben zusammengetragen wurden, gibt es viele Einzelstudien zur Prävalenz von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln. Fokussierend auf die in dieser Arbeit untersuchten Proben, sind Ergebnisse von unterschiedlichen Autoren zu den Prävalenzen von *Y. enterocolitica* in rohem Fleisch und Rohfleischprodukten der Tierarten Schwein,

Rind und Geflügel in den nachfolgenden Kapiteln aufgeführt. Diese Ergebnisse geben ebenfalls Anlass zu intensiveren Untersuchungen der europäischen Länder, da die Prävalenzen in den genannten Untersuchungen nicht durchgehend mit dem Zusammentrag der EU im Einklang stehen. Zudem wurden hier in einigen Studien DNA-basierte Methoden wie z. B. die PCR eingesetzt. Diese Verfahren sind viel sensitiver als klassische Kultivierungsmethoden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999, JOHANNESSEN et al. 2000, BOYAPALLE et al. 2001) und könnten in weitergehenden Untersuchungen in den Mitgliedsländern eingesetzt werden. Zudem ermöglichen sie zur Detektion von pathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen den Einsatz von bestimmten Zielgenen (Virulenzgene). Dies kann die bisher eingesetzte Bio- und Serotypisierung im Vorfeld zur Detektion potentiell pathogener Stämme ersetzen.

6.1 Prävalenz von pathogener *Y. enterocolitica* in rohem Schweinefleisch und Rohfleischprodukten

Aufgrund des vermuteten Zusammenhangs von mit pathogener *Y. enterocolitica* kontaminierten Schweinefleisches und dadurch verursachten Lebensmittelbedingten Infektionen des Menschen, wurden zahlreiche Studien zur Ermittlung der Prävalenz in Schweineprodukten durchgeführt (Tabelle 14). In vielen Proben konnte ein Nachweis von pathogener *Y. enterocolitica* geführt werden. Anhand der nachfolgenden Zusammenfassung von unterschiedlichen Untersuchungen zur Prävalenz von pathogener *Y. enterocolitica* in rohem Schweinefleisch und Rohfleischprodukten kann beobachtet werden, dass der Anteil an pathogener *Y. enterocolitica*, abgesehen von Zungen und Innereien, bei durchschnittlich 8,0% liegt, wenn die Proben mittels kulturellen Verfahren untersucht wurden. Die Prävalenz mittels PCR Untersuchung liegt bei 17,0%. Tendenziell ist die Kontamination der Hackfleischproben (Kultur: 13,6%; PCR: 24,3%) höher als die der Fleischstücke (Kultur: 2,5%; PCR: 13,5%). Bei Rohwurstproben wird in der Regel keine pathogene *Y. enterocolitica* gefunden, wohingegen THISTED-LAMBERTZ et al. (2007) mittels PCR Methode in 11 von 97 untersuchten Proben (11%) *ail*-positive *Y. enterocolitica* detektierten.

Tabelle 14: Prävalenz von *Y. enterocolitica* in rohem Fleisch und Rohfleischprodukten vom Schwein

Produkt	Probenanzahl	Anzahl an pathogener <i>Y. enterocolitica</i>	Anteil in %	Kultur	PCR	Quelle
Zunge	29	28	97%	X		Wauters et al. (1988)
Zunge	99	79	80%	X		Fredriksson-Ahomaa et al. (2001a)
Zunge	20	15	75%	X		Bucher (2001)
Innereien	34	17	50%	X		Fredriksson-Ahomaa et al. (2000)
Innereien	100	46	46%	X		Bucher (2001)
Hackfleisch	12	1	8%	X		Nesbakken et al. (1985)
Hackfleisch	50	12	24%	X		Wauters et al. (1988)
Hackfleisch	255	63	25%		X	Fredriksson-Ahomaa et al. (1999)
Hackfleisch	178	16	9%	X		Hank (2003)
Hackfleisch	70	9	13%		X	Hartmann (2006)
Hackfleisch	100	35	35%		X	Thisted Lambertz et al. (2007)
Fleisch	91	2	2%	X		Schiemann (1980)
Fleisch	1278	37	3%	X		Fukushima et al. (1997)
Fleisch	300	50	17%		X	Johannessen et al. (2000)
Fleisch	30	3	10%		X	Hartmann (2006)
Mettwurst	200	0	0%	X		Velazquez et al. (1993)
Salami	51	0	0%	X		Nortje et al. (1999)
Salami	8	0	0%	X		Hank (2003)
Wurst, kalt geräuchert	97	11	11%		X	Thisted Lambertz et al. (2007)

6.2 Prävalenz von *Y. enterocolitica* in rohem Rindfleisch und Rohfleischprodukten

Rindfleischprodukte wurden auch in einigen Studien auf die Anwesenheit von *Y. enterocolitica* untersucht (Tabelle 15). Meist überwiegt hier der Anteil an Umweltisolaten von *Y. enterocolitica*. Einige Autoren konnten dennoch den Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen führen. Vermutlich wurden die Proben durch die gemeinsame Verarbeitung mit Schweinefleisch im nachhinein kontaminiert, da ein Nachweis von *Y. enterocolitica* beim lebenden Rind in der Regel nicht geführt werden kann (BUCHER et al. 2002a, BAILEY et al. 2003). Dennoch wurde über die Möglichkeit der Ausscheidung auch von pathogener *Y. enterocolitica* beim Rind berichtet. Hierbei handelt es sich vor allem um den Serotyp O:9 (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1996).

Tabelle 15: Prävalenz von *Y. enterocolitica* in rohem Fleisch und Rohfleischprodukten vom Rind

Produkt	Probenanzahl	Anzahl von <i>Y. enterocolitica</i>	Anteil in %	Anzahl an pathogener <i>Y. enterocolitica</i>	Anteil in %	Kultur	PCR	Quelle
Fleisch	120	116	96,6	0	0%	X		Fukushima et al. (1987)
Fleisch	102	27	26,0	0	0%	X		De Boer (1995)
Fleisch	40	35	87,5	0	0%	X		Logue et al. (1996)
Fleisch	612	k. A.	k. A.	2 (4/O:3)	0,3	X		Fukushima et al. (1997)
Fleisch	51	8	15,7	k. A.	k. A.	X		Nortje et al. (1999)
Fleisch	100			31	31%		X	Vishnubhatla et al. (2001)

6.3 Prävalenz von *Y. enterocolitica* in rohem Geflügelfleisch und Rohfleischprodukten

Wie beim Rindfleisch, wurden in einigen Untersuchungen überwiegend nicht-pathogene *Y. enterocolitica* Stämme in Geflügelproben nachgewiesen (Tabelle 16). BUCHER et al. (2002b) konnten bei einer kulturellen Untersuchung von 100 Puten (Schnabelhöhle und Kot) keine pathogenen *Y. enterocolitica* Stämme finden. Dennoch gelang einigen Autoren der Nachweis pathogener Stämme in Lebensmitteln. Ob auch hier wie zwischen Rind und Schwein eine Kreuzkontamination stattgefunden hat, ist schwer zu belegen. Durchaus möglich ist eine Kontamination auf Einzelhandelsebene (LOGUE et al. 1996). Auf Schlachtebene ist eine Kontamination eher unwahrscheinlich, da die Schlachtung von Rind/Schwein und Geflügel in getrennten Betrieben erfolgt.

Tabelle 16: Prävalenz von *Y. enterocolitica* in rohem Fleisch und Rohfleischprodukten vom Geflügel

Produkt	Probenanzahl	Anzahl von <i>Y. enterocolitica</i>	Anteil in %	Anzahl an pathogener <i>Y. enterocolitica</i>	Anteil in %	Kultur	PCR	Quelle
Rohfleisch	82	20	24,5	1	1,2	X		Norberg (1981)
Rohfleisch	120	114	95	0	0	X		Fukushima et al. (1987)
Innereien, Haut, Muskel	600	21	3,5	k. A.	k. A.	X		Khalafalla (1990)
Fleisch	390	26	7	0	0	X		De Boer (1995)
Rohfleisch	20	11	55	3	15	X		Logue et al. (1996)

Produkt	Probenanzahl	Anzahl von <i>Y. enterocolitica</i>	Anteil in %	Anzahl an pathogener <i>Y. enterocolitica</i>	Anteil in %	Kultur	PCR	Quelle
Schlachtkörper	615			2	0,3	X		Fukushima et al. (1997)
Fleisch	51	8	15,7	k. A.	k. A.	X		Nortje et al. (1999)
Schlachtkörper	636			57	9		X	Lindblad et al. (2006)

7 Molekularbiologischer Nachweis von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln

7.1.1 Kolonie-Hybridisierung

Herkömmliche Methoden benötigen zur Isolierung von *Y. enterocolitica* Spezies lange Inkubationszeiten. Zudem sind die Ergebnisse nicht immer zuverlässig (KAPPERUD et al. 1990, KWAGA et al. 1992). Der Vorteil der Kolonie-Hybridisierung liegt in der höheren Spezifität im Vergleich zur kulturellen Methode, da sie unmittelbar zwischen pathogenen und nicht-pathogenen *Y. enterocolitica* Spezies unterscheiden kann (KAPPERUD et al. 1990, NESBAKKEN et al. 1991, GOVERDE et al. 1993). Einige Kolonie Hybridisierungsverfahren sind zur Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* entwickelt worden (Tabelle 8). Pathogene *Y. enterocolitica* Stämme wurden in diesen Verfahren durch die Verwendung von Pathogenität bestimmenden chromosom- (GOVERDE et al. 1993, DURISIN et al. 1998) oder plasmid-kodierten Zielgenen (NESBAKKEN et al. 1991, WEAGANT et al. 1999) detektiert (Tabelle 9), wobei die Untersuchung von natürlich kontaminierten Lebensmittelproben selten beschrieben wurde. So konnten NESBAKKEN et al. (1991) mit auf dem *yadA*-Gen basierenden Gensonden pathogene *Y. enterocolitica* in natürlich kontaminierten

Schweineprodukten detektieren. Alle Proben, die mit kultureller Methode positiv ausgefallen waren, generierten auch mit der Hybridisierung ein positives Signal. Ferner stellten sie fest, dass mit einer Voranreicherung der Proben mehr *Y. enterocolitica* positive Proben detektiert werden konnten, und dass mit der Sonden Untersuchung mehr Proben als positiv befundet wurden als mit den kulturellen Verfahren. Die mit der Sonde als positiv bewerteten Ergebnisse konnten durch eine Isolierung der Keime nochmals bestätigt werden. Die Ergebnisse deckten sich mit denen von GOVERDE et al. (1993), die natürlich kontaminierte Schweineproben mit auf dem *ail*- und dem *inv*-Gen basierenden DNA-Sonden untersuchten. Alle Proben, die mit kultureller Methode positiv ausgefallen waren, generierten auch mit der Hybridisierung ein positives Signal, wohingegen 2% der Proben, die mit der kulturellen Methode als negativ befundet worden waren, in der Sondenhybridisierung ein deutlich positives Ergebnis hervorbrachten. Der CIN Selektivagar stellte sich in vielen Untersuchungen als ein geeignetes Medium zur Kolonie Hybridisierung dar (KAPPERUD et al. 1990, NESBAKKEN et al. 1991, GOVERDE et al. 1992) und konnte sich gegenüber des SSDC Selektivmediums durchsetzen (NESBAKKEN et al. 1991, GOVERDE et al. 1992). GOVERDE et al. (1993) vermuteten, dass Inhaltsstoffe des SSDC Agars die Hybridisierung der DNA Sonde während der Untersuchung inhibierten, da die Ergebnisse des CIN Agars mit biochemischen Ergebnissen besser korrelierten. Der Einsatz des selektiven MacConkey Agars erwies sich bei den Untersuchungen von JAGOW und HILL (1986) bis zu einer Begleitflora von 3×10^7 KbE/g als geeignet.

Die genannten Untersuchungen zeigen, dass die Kolonie-Hybridisierung eine spezifische Detektion pathogener *Y. enterocolitica* ermöglicht, ohne dass Einzelkolonien isoliert werden müssen (HILL und KEASLER 1991). Allerdings behindert eine hohe Begleitflora das Wachstum der zu detektierenden Keime (JAGOW und HILL 1986, NESBAKKEN et al. 1991), was zu falsch negativen Ergebnissen führt. Eine Selektivanreicherung der zu untersuchenden Proben im Vorfeld der Hybridisierung kann die Sensitivität des Verfahrens steigern (HILL et al. 1983, JAGOW und HILL 1986).

Eine ausführliche Darstellung der Vor- und Nachteile des Verfahrens sowie die Grundzüge der Methode sind im Kapitel 1 dargestellt.

7.1.2 PCR

Die PCR liefert ein schnelleres Ergebnis als die Kolonie-Hybridisierung (KWAGA et al. 1992). Zwar ist mit dem Verfahren eine direkte Isolierung der gesuchten Keime nicht möglich, aber das Verfahren kann spezifisch zwischen pathogenen und nicht-pathogenen *Y. enterocolitica* Spezies unterscheiden. FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999) untersuchten Schweinezungen und Schweinehackfleisch auf die Prävalenz von *yadA*-positiver *Y. enterocolitica*. Mit der PCR konnten sie eine Prävalenz von 92% in Schweinezungen und im Hackfleisch eine Prävalenz von 25% *yadA*-positiver *Y. enterocolitica* nachweisen. Die Prävalenz mit einer zum Vergleich durchgeführten kulturellen Methode fiel mit 78% positiven Schweinezungen und 2% positiven Hackfleischproben vergleichsweise geringer aus. Sie konnten mit den Untersuchungen zeigen, dass das PCR Verfahren im Vergleich zur kulturellen Untersuchungen sensitiver ist. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von BOYAPALLE et al. (2001). Sie untersuchten artifiziell kontaminierte Schweinekot- und Schweinefleischproben auf *ail*-Gen tragende *Y. enterocolitica* Spezies. Wie FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999) stellten sie fest, dass die PCR Untersuchung im Vergleich zur kulturellen Methode die sensitivere Methode darstellte. Dazu konnten sie zeigen, dass die Sonden (TaqMan)-Real-Time PCR Untersuchung die sensitivste Methode im Vergleich zu Kultur und Multiplex PCR war. Die TaqMan Sonden PCR war 100 bis 1000 mal sensitiver als die herkömmliche PCR, und 10000 mal sensitiver als die Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* mittels kultureller Untersuchung.

Da das Schwein als Reservoir von pathogener *Y. enterocolitica* gilt und rohes oder nicht durcherhitztes Schweinefleisch eine mögliche Ursache für humane Yersiniose Erkrankungen darstellt (NESBAKKEN et al. 1991, BHADURI und COTTRELL 1997, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999, JOHANNESSEN et al. 2000, BOYAPALLE et al. 2001, VISHNUBHATLA et al. 2001, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2007), wurde die Prävalenz von pathogener *Y. enterocolitica* in

Schweineprodukten in mehreren Einzelstudien mittels moderner molekularbiologischer Methoden untersucht (Tabelle 14). Pathogene *Y. enterocolitica* kann in den Untersuchungen beim Schwein regelmäßig gefunden werden. Die Prävalenzen sind bei den untersuchten Fleischstückproben im Vergleich zu Untersuchungen von Zungenproben und Innereien eher gering (Tabelle 14). Im Gegensatz dazu existieren für Geflügel- und Rinderproben wenige Daten (Tabelle 15, Tabelle 16). Die bestehenden Daten basieren meist auf kulturell ermittelten Ergebnissen. Obwohl in Geflügel- und Rinderkot und Tonsillenproben keine pathogene *Y. enterocolitica* gefunden wurde (BUCHER 2002a,b), konnten VISHNUBHATLA et al. (2001) mit einer Real-Time PCR Methode eine Prävalenz von 31% in Rinderhackfleischproben ermitteln. LINDBLAD et al. (2006) war mit einer PCR Methode die Detektion von pathogener *Y. enterocolitica* mit einer Prävalenz von 9% bei Geflügelschlachtkörpern möglich.

Vor- und Nachteile sowie Grundprinzipien der PCR Methode sind im Kapitel 1 ausführlich beschrieben.

7.1.3 Weitere DNA-basierte Methoden

IKEDA et al. (2006) entwickelten ein DNA Microarray Verfahren zur Detektion von pathogener *Y. enterocolitica*, *S. enterica* und *Bacillus cereus* in artifiziell kontaminierten Gemüse. Alle Bakterien konnten spezifisch auf dem DNA-Chip detektiert werden. Das Verfahren bietet die Möglichkeit, sowohl mehrere Gene einer Spezies als auch mehrere Spezies gleichzeitig auf dem DNA-Träger innerhalb eines Tages zu detektieren. Allerdings erfordert das Verfahren eine Ausstattung an kostspieligen Detektionsgeräten und stellt somit nicht die erste Wahl für kleinere Laboratorien dar.

HONG et al. (2004) konnten als Alternative ein Verfahren entwickeln, das die Detektion gebundener DNA-Sonden über eine Antigen-Antikörper Reaktion erlaubt und das Ergebnis im Gegensatz zu dem von IKEDA et al. (2006) beschriebenen Verfahren mit dem bloßen Auge abgelesen wird. 9 Spezies konnten mit ihrer Microarray Technik sicher identifiziert werden, wobei *Y.*

enterocolitica mit *E. coli* kreuzreagierte. Ferner setzten sie zur Detektion von *Y. enterocolitica* keine Virulenzgene ein, die zur Unterscheidung zwischen pathogenen und nicht-pathogenen *Y. enterocolitica* Spezies notwendig sind. Durch die eingesetzte 23S rRNA als Zielsequenz war somit lediglich eine genuspezifische Detektion möglich.

Dagegen konnten MYERS et al. (2006) durch den Einsatz von Virulenzgenen als Zielsequenzen pathogene *Y. enterocolitica* durch eine Microarraytechnik erfolgreich in Milchproben detektieren. Das Detektionslimit der Untersuchung lag bei 1000 KbE/Hybridisierungsvorgang.

7.1.4 Kultureller Nachweis

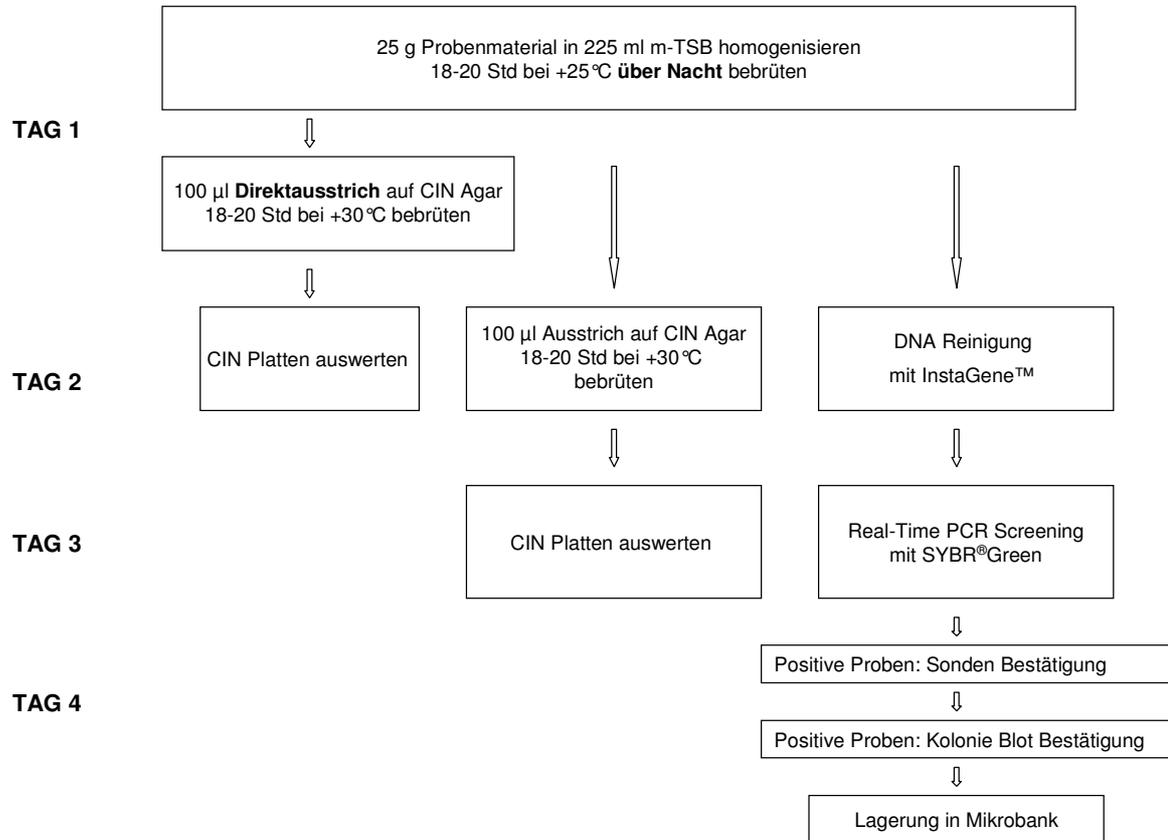
In Europa existieren derzeit zwei standardisierte Methoden in der *Y. enterocolitica* Diagnostik. Das sind die ISO/DIS 10273 (ISO, 1993) und die Methode des nordischen Komitees für Lebensmitteluntersuchung (NCFA 1996). Die Methoden des § 64 LFGB orientieren sich ebenfalls an der ISO/DIS 10273. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden erstgenannten Methoden ist die Verwendung von unterschiedlichen Selektiv-Anreicherungsmedien. Die ISO/DIS 10273 verwendet das Irgasan- Ticarcillin-Kaliumchlorat (ITC)-Medium zur Anreicherung der Keime. Daneben werden die Proben auch in einer gering selektiven Lösung angereichert und anschließend aus beiden Medien auf Selektivagarplatten ausgestrichen. Dagegen ist in der NCFA-Methode die Verwendung der modifizierten Rappaport-Bouillon (MRB) aufgeführt. Hier wird eine 3-Stufen-Methode angewendet, die aus der Kälteanreicherung, sowie der Anreicherung in einem gering selektiven und einem stark selektiven Medium (MRB) besteht. Die aus den Selektionsverfahren gewonnenen verdächtigen Kolonien werden im Anschluss zur Identifizierung und Isolierung Biochemie- und Pathogenitätstesten zugeführt.

MATERIAL UND METHODEN**8 Material**

In der Zeit von März 2006 bis Februar 2007 wurden am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München 479 unterschiedliche Rohfleischstücke und Rohfleischprodukte vom Schwein, Rind und Geflügel auf die Prävalenz von pathogener *Y. enterocolitica* untersucht (Tabelle 17). Die Untersuchung beinhaltete sowohl frische Proben als auch Material, das auf Mindesthaltbarkeit im Routinelabor geprüft wurde. Das Untersuchungsschema der Proben ist in Abbildung 6 dargestellt.

Tabelle 17: Unterschiedliche Rohfleischprodukte vom Schwein, Rind und Geflügel, die auf die Prävalenz von pathogener *Y. enterocolitica* untersucht wurden

Proben		Gesamt	Schwein	Rind	Geflügel
Fleisch	Hackfleisch	55	31	24	0
	Fleischstücke	288	109	77	102
Wurst	Rohwurst	136	75	55	6
	Gesamt	479	215	156	108

Abbildung 6: Allgemeiner Ablauf der Probenuntersuchung

9 Methoden

Die zu untersuchenden Proben wurden steril entnommen und in sterile Kunststoffbeutel verpackt. Die Untersuchung wurde entweder am gleichen Tag begonnen oder nach einer Lagerung bei -20°C. Dabei durchliefen die Proben folgendes Schema:

Tag 1:

1. Anreicherung

Die Proben wurden zu je 25 g in 225 ml in modifizierte Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (modifizierte Tryptic-Soy-Broth/m-TSB, Merck, Darmstadt, Deutschland) gegeben und anschließend 30 Sekunden (Sek) im Stomacher homogenisiert. Die Modifikation bestand aus der Zugabe von 1,5 g Gallesalzen (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) in 1000 ml TSB.

2. Ausstrich auf Selektivagar

Es erfolgte ein 3-Ösen-Direktausstrich von 100 µl der homogenisierten Lösung auf Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN)-Selektivagar (Merck). Der CIN Agar wurde über Nacht für 18-20 Stunden (Std) bei +30 °C bebrütet und die Anreicherung für 18-20 Std bei +25 °C.

Tag 2:

1. DNA Reinigung

Von der über Nacht bebrüteten m-TSB-Bouillon wurden 100 µl entnommen und mit der InstaGene™ Matrix (BioRad, Hercules, CA) eine DNA-Reinigung für das Real-Time Screening durchgeführt. Das Prinzip der InstaGene™ Matrix beruht auf einem Anionenaustauscherharz, der Chelex®-Matrix, mit einer anschließenden Lysierung der Zellen durch Hitze (+99 °C).

Methode

Um die Probe vor Nuclease Kontamination zu schützen, wurde das Verfahren mit Handschuhen durchgeführt. 100 µl m-TSB wurden zunächst für 1 Minute (Min) bei 13000 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet in 50 µl InstaGene™ resuspendiert (vorher InstaGene™ Matrix durch Schütteln in Suspension bringen). Anschließend erfolgte eine Inkubation von 15 Min bei +56 °C im Thermomixer (Schüttelrate 300). Nach der Inkubation wurde die Probe für 10 Sekunden (Sek) gevortext. Im Thermomixer folgte eine 8-minütige Inkubation bei +99 °C (Schüttelrate 300). Anschließend wurde die Probe ein weiteres mal für 10 Sek im Vortexer gemixt und dann für 2 Min bei 13000 U/Min zentrifugiert. 2 µl des Überstandes wurden als Template im Real Time-PCR Screening eingesetzt.

2. Ausstrich auf Selektivagar

Desweiteren wurden 100 µl von der Bouillon entnommen und mit einem 3-Ösen Ausstrich auf CIN Selektivagar ausgestrichen.

Inkubation: über Nacht für 18-20 Std bei +30 °C

3. Rückstellen der Anreicherung für Kolonie-Blot

1,5 ml der Anreicherung wurden bei jeder Probe in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß pipetiert und für die Kolonie-Hybridisierung bei -20 °C zurückgestellt.

4. Auswertung der CIN-Platten vom Vortag

Die Auswertung der CIN-Platten vom Vortag erfolgte durch die Beurteilung der Koloniegröße und -farbe. Verdächtige, ca. 1mm große Kolonien mit dunkelila Zentrum, sogenannte „Kuhaugen“, wurden ausgewählt, auf CIN Agar subkultiviert und zur weiteren Differenzierung auf Plate Count Agar (PCA, Merck, Darmstadt, Deutschland) ausgestrichen.

Tag 3:

1. Auswertung der CIN-Platten vom Vortag

Die Auswertung der CIN-Platten vom Vortag erfolgte durch die Beurteilung der Koloniegröße und -farbe. Verdächtige Kolonien wurden ausgewählt, auf CIN Agar subkultiviert und zur weiteren Differenzierung auf Plate Count Agar (PCA, Merck, Darmstadt, Deutschland) ausgestrichen.

2. Real-Time PCR Screening mit SYBR[®]Green

Die gereinigte Proben-DNA wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und mit einer Real-Time PCR-Methode nach HARTMANN (2006) auf pathogene *Y. enterocolitica* untersucht. Bei dem Verfahren diente SYBR[®]Green als Fluoreszenzfarbstoff, und als Zielgen diente das 170 basepair (bp) große Fragment des *ail*-Genes (NAKAJIMA et al. 1992), amplifiziert durch die Primer *ail1* und *ail2*. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes iCycler iQ[™] System Software Version 3.1 (BioRad, Hercules, CA) anhand des C_t-Wertes sowie Kontrolle der Schmelzkurve.

3. Real-Time PCR mit Taqman-Sonde (5' Nuclease PCR-Assay)

Bei den Proben, welche bei der Real-Time PCR-Methode mit SYBR[®]Green ein positives Ergebnis erbrachten, erfolgte anschließend die Untersuchung mit der TaqMan Real-Time PCR-Methode nach FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2007). Verwendet wurden dieselben Primer *ail1* und *ail2* für das 170 bp-Fragment des *ail*-Genes wie beim SYBR[®]Green Real-Time PCR Screening. Als Sondensystem

wurde eine TaqMan-Sonde verwendet. Die Auswertung erfolgte auch hier mit Hilfe des Computerprogrammes iQ™5 (BioRad, Hercules, CA) anhand der ermittelten C_t-Werte.

Tag 4/5:

Kolonie Hybridisierung

Die Isolierung von pathogener *Y. enterocolitica* mit der Kolonie Hybridisierung erfolgte aus den Proben, die sowohl mit der SYBR®Green als auch mit der Sonden-Methode als *ail*-positiv befundet wurden. Zur Herstellung der Hybridisierungs-Sonde wurden die gleichen Primer *ail1* und *ail2* für das 170 bp-Fragment des *ail*-Genes wie bei der Real-Time PCR verwendet. Als Grundlage für die Aufstellung der Hybridisierungsbedingungen diente das DIG Application Manual for Filter Hybridization (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

9.1 PCR

9.1.1 SYBR®Green Screening

Real-Time PCR Screening mit SYBR®Green

Die gereinigte Proben-DNA wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und mit der Real-Time PCR-Methode mit SYBR®Green nach HARTMANN (2006) als Fluoreszenzfarbstoff untersucht. Als Zielgen diente das 170 bp große Fragment des *ail*-Genes (NAKAJIMA et al. 1992), amplifiziert durch die Primer *ail1* und *ail2*.

Bei jedem PCR-Lauf wurde eine Positiv-, sowie eine Negativkontrolle mitgeführt. Der in der Mikrobank gelagerte *Y. enterocolitica*-Stamm MYT 13.1D wurde als Positivkontrolle in der Real-Time PCR verwendet. Dabei handelt es sich um einen 2004 aus Schweinetonsillen isolierten Stamm des Bioserotyps 4/O:3, bei dem das Virulenzplasmid pYV nachweisbar ist. Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz, der nur die Reagenzien des Master-Mixes ohne Template enthielt.

Herstellung der Positivkontrolle für die Real Time-PCR

Der *Y. enterocolitica*-Stamm MYT 13.1D wurde aus der Mikrobank (-80 °C) entnommen und unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitsbank auf Blutagar (Columbia Agar mit Schafblut, Oxoid, Hampshire, United Kingdom) ausgestrichen (3-Ösenausstrich) und bei +30 °C für 24-48 Std bebrütet. Die Entnahme erfolgte im dicht bewachsenen Bereich durch Antippen mit einer Pipettenspitze. Die entnommenen Kolonien wurden in 100 µl Nuclease-freiem Wasser (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß suspendiert und für 10 Min bei +99 °C erhitzt. Nach Zentrifugation bei 13200 U/Min für 3 Min wurde der Überstand in ein neues 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die freie DNA diente als Template für die Real-Time PCR und wurde bis zum Einsatz bei -20 °C gelagert.

Primer

Die verwendeten Primer ail1 und ail2 amplifizieren ein 170 bp großes Fragment des *ail*-Genes. Ihre Nukleotidsequenz ist in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 18: Nukleotidsequenz der in der Real Time-PCR verwendeten Primer

Primer	Sequenz 5' → 3'	Lokalisation <i>ail</i> -Gen	T _m (°C)
ail1 forward	ACT CGA TGA TAA CTG GGG AG	664 bis 683	57,3
ail2 reverse	CCC CCA GTA ATC CAT AAA GG	814 bis 833	57,3

T_m = Schmelztemperatur

PCR-Bedingungen

Die Zusammenstellung des PCR-Ansatzes erfolgte unter einer Sterilbank. Zum Einsatz kam der iQTMSYBR[®]Green Supermix (BioRad, Hercules, CA). Der verwendete Mastermix hatte ein Volumen von 23 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 19: Reaktionsmix für die SYBR[®] Green-PCR zur Detektion *ail*-positiver *Y. enterocolitica*

Substanz	Konzentration	Menge	Endkonzentration
H ₂ O		8 µl	
iQ [™] SYBR Green 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
Summe Mastermix:		23 µl	
Template:		2 µl	
Gesamtvolumen:		25 µl	

Das Programm des Thermocyclers bestand aus folgenden Schritten:

Zyklus 1: Denaturierung

Step 1: 95°C 3 Min

Zyklus 2: (40x) Amplifikation (Denaturierung/Annealing/Extension)

Step 1: 95°C 10 Sek

Step 2: 52°C 20 Sek

Step 3: 72°C 10 Sek

Zyklus 3: Denaturierung

Step 1: 95°C 1 Min

Zyklus 4: (1x) Annealing/Extension

Step 1: 52°C 1 Min

Zyklus 5: (96x)

Step 1: 52°C Schmelzkurve in 0,5°C-Schritten

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Computerprogrammes (BioRad, Hercules, CA) 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. Alle Proben mit einem C_T-Wert unter 40 wurden als positiv bewertet.

9.1.2 Bestätigung mit ailP-Sonde

Real-Time PCR mit Taqman-Sonde (5' Nuclease PCR-Assay):

Bei den Proben, die bei der Real-Time PCR-Methode mit SYBR[®]Green ein positives Ergebnis erbrachten, erfolgte die Untersuchung mit einer Sonden-Real-Time PCR-Methode. Als Detektionssystem wurde eine für *Y. enterocolitica* spezifische TaqMan-Sonde, die von FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2007) entwickelt wurde, eingesetzt.

Primer

Verwendet wurden dieselben Primer ail1 und ail2 für das 170 bp-Fragment des *ail*-Genes wie beim SYBR[®]Green Real-Time PCR Screening.

Sonde

Als Sondensystem wurde eine TaqMan-Sonde verwendet. Diese Sonde, ailP, wurde mit Hilfe des Programms Beacon Designer 4 (Biosoft International, Palo, Alto, CA) hergestellt. Sie ist am 5'-Ende mit dem FAM-6-Reporterfarbstoff und am 3'-Ende mit dem TAMRA-6-Quencher markiert (MWG, Ebersberg, Deutschland). Die Fluoreszenz wurde mit dem optischen Detektionssystem iQTM5 Multicolor Real-Time PCR Gerät (BioRad) gemessen. Die folgende Tabelle gibt Aufschluss über die Nukleotidsequenz des 24 bp-langen Fragments.

Tabelle 20: Nukleotidsequenz der in der Sonden PCR verwendeten ailP-Sonde

Sonde	Sequenz 5' → 3'	Lokalisation <i>ail</i> -Gen	T _m (°C)
ailP	TCG TTT GCT TAT ACT CAT CAG GGA	692 bis 715	59,3

T_m = Schmelztemperatur

PCR-Bedingungen

Eingesetzt wurde der 2x ready-to-use iQTMSupermix (BioRad). Der Mastermix hatte ein Volumen von 23 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 21: Reaktionsmix für die Sonden-PCR zur Detektion *ail*-positiver *Y. enterocolitica*

Substanz	Konzentration	Menge	Endkonzentration
H ₂ O		7,0 µl	
iQ™-Supermix	2x	12,5 µl	1x
Magnesium	6 mM		3 mM
dNTPs	je 400 µM		je 200 µM
Taq-Polymerase	50 U/ml		1,25 U
Primer <i>ail</i> 1+2	2 µM	2,5 µl	200 nM
TaqMan-Sonde <i>ailP</i>	2 µM	1,0 µl	80 nM
Summe Mastermix:		23 µl	
Template:		2 µl	
Gesamtvolumen:		25 µl	

Der Thermocycler wurde folgendermaßen programmiert:

Zyklus 1: (1x)	Denaturierung	
Step 1:	95°C	10 Sek
Zyklus 2: (45x)	Amplifikation	
Step 1:	95°C	10 Sek
Step 2:	52°C	30 Sek

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Computerprogrammes (BioRad) anhand der ermittelten C_t-Werte. Alle Proben mit einem C_t-Wert unter 40 wurden als positiv bewertet.

9.2 Isolierung von *Y. enterocolitica*

9.2.1 Kolonie Hybridisierung

Die Proben, die sowohl mit der SYBR®Green als auch mit der *ailP*-Sondenuntersuchung positiv ausfielen, wurden einer Kolonie-Hybridisierung zur Keimisolation unterzogen. Die dazu benötigte Sonde wurde mittels einer PCR hergestellt. Zur Herstellung der Sonde wurden dieselben Primer *ail1* und *ail2* für

das 170 bp-Fragment des *ail*-Genes wie bei der Real-Time PCR verwendet. Als Grundlage für die Aufstellung der Hybridisierungsbedingungen diente das DIG Application Manual for Filter Hybridization (ROCHE DIAGNOSTICS 2000). Die Etablierung der Kolonie-Hybridisierung gliederte sich in folgende Aufgabenbereiche:

a) Sondenherstellung mit PCR

- ⇒ Vorversuche zur Ermittlung der Template-DNA-Menge
- ⇒ Vorversuche zur Ermittlung der optimalen DNA-Reinigungsmethode
- ⇒ Optimierung der PCR-Parameter mit Gradienten vor Sondenmarkierung
- ⇒ Markierung der Sonde mit PCR

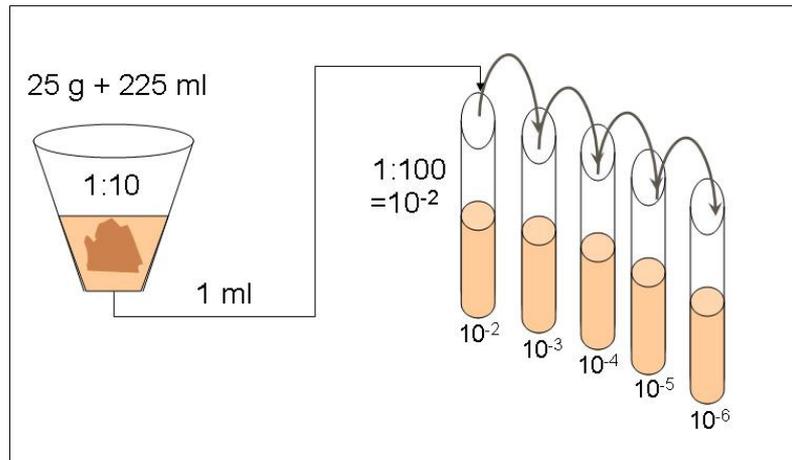
1. Vorversuche zur Ermittlung der Template-Menge

Als Template diente der in der Mikrobank gelagerte *Y. enterocolitica*-Stamm MYT 13.1D, der auch als Positivkontrolle im Real-Time Verfahren verwendet wurde. Für die Sondenherstellung war laut dem DIG Application Manual for Filter Hybridization (ROCHE DIAGNOSTICS 2000) eine Template-DNA Menge zwischen 10 und 50 ng DNA gefordert. Um die Ausgangssumme der Bakterien für die geforderte DNA Menge zu ermitteln, wurden verschiedene Ansätze durchgeführt.

Verdünnungsreihe

Über eine Verdünnungsreihe (Abbildung 7) wurde die Ausgangsbakterienzahl für die gesuchte DNA-Menge ermittelt.

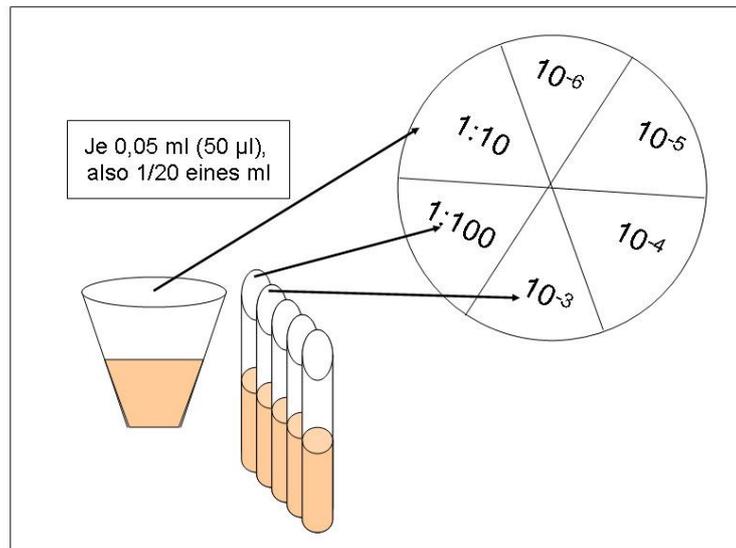
- Tag 1: Der Referenzstamm MYT 13.1D wurde über Nacht 18-20 Std bei +30°C auf Blutagar (Oxoid) bebrütet
- Tag 2: 5 Kolonien wurden in 5 ml Peptonwasser-Lösung (PW, Merck) gegeben und für 16-20 Std bei +30°C bebrütet
- Tag 3: Eine Verdünnungsreihe wurde nach folgendem Schema erstellt:

Abbildung 7: Erstellung einer Verdünnungsreihe

Von der Über-Nacht-Anreicherung (0-Lösung) wurde 1 ml in eine vorgelegte Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-9}), mit je 9 ml einer Peptonwasser Lösung ohne Agar pipettiert. Diese Verdünnungsreihe diente der photometrischen Bestimmung der Bakterienzeldichte. Parallel dazu wurde zum Vergleich der photometrischen Bestimmung das Tropfplattenverfahren (N.N. 1984) durchgeführt, um am Tag 4 die photometrischen Ergebnisse mit den gewachsenen Bakterienzahlen direkt vergleichen zu können.

Tropfplattenverfahren (Abbildung 8)

Von der 0-Lösung wurde 1 ml in eine vorgelegte Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-9}), mit je 9 ml einer Peptonwasser Lösung mit Agar pipettiert. Beschriftete PCA-Platten wurden im Doppelansatz mit je 6 Verdünnungsstufen (insgesamt 10^{-1} bis 10^{-9}) beschriftet, und jeweils 50 μl aus jeder Verdünnungsstufe mit Agar pro Feld nach folgendem Schema pipettiert:

Abbildung 8: Tropfplattenverfahren

Die Platten wurden über Nacht (18-20 Std) bei +30 °C bebrütet.

Photometrische Bestimmung der Bakterienzeldichte:

Mittels BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und UVette® (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde die Bakterienzeldichte der einzelnen Verdünnungsstufen gemessen. Als Leerwert dienten 50 µl Peptonwasser ohne Agar. Die UVette® (Eppendorf) wurde pro Messung mit 50 µl der zu untersuchenden Probe gefüllt.

Tabelle 22: Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm:

Probe/Verdünnungsstufe	Extinktion
Leerwert	0.000
-9	-0.013
-8	-0.013
-7	-0.012
-6	-0.012
-5	-0.011
-4	-0.011

Probe/Verdünnungsstufe	Extinktion
-3	-0010
-2	-0.004
-1	+0.030
1:1 (0-Lösung)	+0.207

Anschließend wurden alle Verdünnungsstufen mit einem positiven Extinktionswert zur Bestimmung der Bakterienzeldichte mittels McFarland Standard (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) berücksichtigt (Tabelle 23).

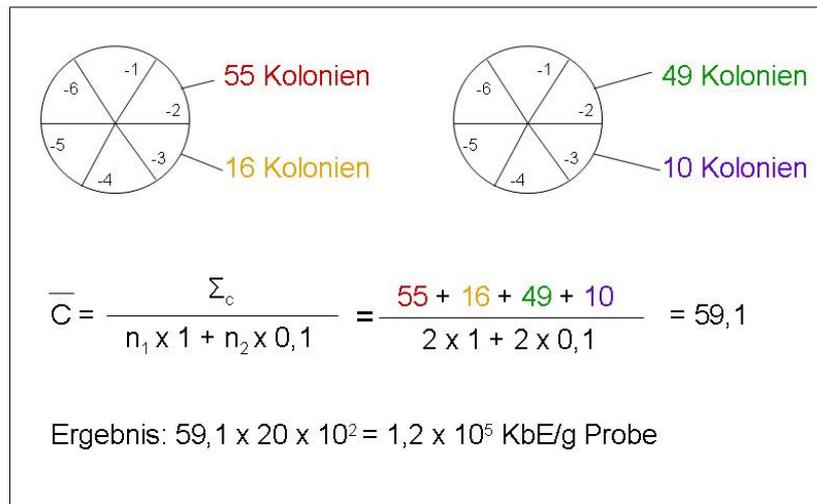
Tabelle 23: Ermittlung der Bakterienzeldichte anhand des McFarland Standards

Probe/Standard	Bakterienzeldichte	Extinktion	Optische Dichte (OD)
<i>Standard (0,5)</i>	<i>1,50 x 10⁸/ml</i>	<i>0,125</i>	<i>550</i>
Probe mit -1 Verdünnung	3,6 x 10⁷/ml	0,030	600
Probe 1:1 (0-Lösung)	2,5 x 10⁸/ml	0,207	600

Aufgrund des Vergleichs mit dem McFarland Standard konnte für die Über-Nacht-Anreicherung (0-Lösung) eine Bakterienzellmenge von: **2,5 x 10⁸ KbE/ml** ermittelt werden.

Tag 4: Auswertung der Tropfplatten und Vergleich mit McFarland Standard-Auswertung

Die Platten wurden nach folgendem Beispiel ausgewertet:

Abbildung 9: Beispielrechnung für TropfplattenauswertungTropfplattenergebnisse im Doppelansatz:

Platte 1.1 und 2.1: Verdünnungsstufen -1 bis -6

Platte 1.2 und 2.2: Verdünnungsstufen -4 bis -9

Von jeder Platte wurden die Felder/Verdünnungsstufen -6 ausgezählt.

Die Plattenauswertung lieferte folgende Gesamtkeimzahlen:

Ergebnis Gesamtkeimzahl Platten Gruppe 1: $3,2 \times 10^8$ KbE/ml

Ergebnis Gesamtkeimzahl Platten Gruppe 2: $1,2 \times 10^8$ KbE/ml

Die Ergebnisse der Gesamtkeimzahlbestimmung deckten sich mit der McFarland Auswertung ($2,5 \times 10^8$ KbE/ml). Folglich wurde beim Einsatz der Über-Nacht-Anreicherung für die unterschiedlichen DNA-Reinigungen aufgrund der Vorversuche von einer Ausgangsbakterienmenge von 10^8 KbE/ml ausgegangen.

Anschließend erfolgte die DNA Reinigung und Bestimmung der gewonnenen DNA-Menge mittels Photometer. Bei der DNA Reinigung wurden unterschiedliche Verfahren verwendet, um eine möglichst gründliche Reinigungsmethode für die PCR zu ermitteln.

2. Vorversuche zur Ermittlung der optimalen DNA-Reinigungsmethode

In den Vorversuchen wurden zur Ermittlung der optimalen DNA-Reinigungsmethode unterschiedliche DNA-Reinigungsansätze getestet. Im Anschluss erfolgte jeweils eine Messung der gereinigten DNA mittels Photometer. Zielmenge als Templateinsatz für die Sondenherstellung mittels PCR war eine DNA-Menge zwischen 10 bis 50 ng/µl.

Methode 1

DNA-Reinigung mit InstaGene™ Matrix (BioRad) aus Anreicherung:

1 ml der Peptonwasser (PW)-Anreicherung (10^8 KbE/ml) wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß für 5 Min bei 13000 U/Min zentrifugiert, der Überstand im Anschluss verworfen und das Pellet in 200 µl InstaGene™ Matrix resuspendiert. Vor und nach der Inkubation für 10 Min bei +99°C im Heizblock wurde das Gefäß kurz gevortext. Schließlich erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 Min bei 12000 U/Min. Der Überstand wurde in eine Uvette® (Eppendorf) überführt und die gereinigte DNA Menge im Photometer bestimmt (Tabelle 24). Als Leerprobe diente während der photometrischen Messung PW-Lösung.

Tabelle 24: Ergebnisse der photometrischen DNA-Messung

Extinktion	Sollwert	Istwert
Leerprobe	0,000A	0,000A
A260	> 0,1	1,406
Quotient 260/280	> 2,0	1,95
Quotient 260/230	> 2,0	1,20
DNA-Menge	10-50 ng/µl	70 ng/µl

Sollwerte übernommen von JARRIN, 2002)

A260: Absorption bei einer Extinktion von 260 nm

260/280: Quotient der Extinktionen, die bei 260 und 280 nm gemessen wurden

260/230: Quotient der Extinktionen, die bei 260 und 220 nm gemessen wurden

Methode 2**DNA-Reinigung mit InstaGene™ (BioRad) aus Bakterienkolonien:**

5 Kolonien einer auf PCA angezüchteten Reinkultur des bereits in der Real-Time PCR verwendeten *Y. enterocolitica*-Stammes MYT 13.1D wurden in 100 µl Nuclease-freiem Wasser (Eppendorf) suspendiert und 1 Min bei 13000 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 µl InstaGene™ Matrix resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei +56 °C für 15 Min. Vor und nach der folgenden Inkubation für 8 Min bei +99 °C erfolgte jeweils ein Vortexschritt. Schließlich wurde für 2 Min bei 13000 U/Min zentrifugiert und der Überstand im Photometer gemessen (Tabelle 25). Als Leerprobe diente während der photometrischen Messung Nuclease-freies Wasser (Eppendorf).

Tabelle 25: Ergebnisse der photometrischen DNA-Messung

Extinktion	Sollwert	Istwert
Leerprobe	0,000A	0,000A
A260	> 0,1	0,953
Quotient 260/280	> 2,0	1,90
Quotient 260/230	> 2,0	1,21
DNA-Menge	10-50 ng/µl	48 ng/µl

Sollwerte übernommen von JARRIN, 2002)

A260: Absorption bei einer Extinktion von 260 nm

260/280: Quotient der Extinktionen, die bei 260 und 280 nm gemessen wurden

260/230: Quotient der Extinktionen, die bei 260 und 220 nm gemessen wurden

Methode 3

Reinigung nach Amtlicher Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFBG: (Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin bildender Escherischia Coli (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA Hybridisierungstechnik BVL L 07.18-1):

1 ml der PW-Anreicherung (10^8 KbE/ml) wurden für 10 Min bei 10000 U/Min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Nuclease-freiem Wasser (Eppendorf) resuspendiert. Anschließend erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt für 10 Min bei 10000 U/Min. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 250 µl Nuclease-freiem Wasser resuspendiert. Dann wurde die Suspension für 15 Min bei +99°C gekocht. Die gereinigte DNA-Menge wurde aus dem Überstand abschließend photometrisch bestimmt (Tabelle 26). Als Leerprobe diente während der photometrischen Messung PW-Lösung.

Tabelle 26: Ergebnisse der photometrischen DNA-Messung

Extinktion	Sollwert	Istwert
Leerprobe	0,000A	0,000A
A260	> 0,1	1,661
Quotient 260/280	> 2,0	1,38
Quotient 260/230	> 2,0	0,95
DNA-Menge	10-50 ng/µl	83 ng/µl

Sollwerte übernommen von JARRIN, 2002)

A260: Absorption bei einer Extinktion von 260 nm

260/280: Quotient der Extinktionen, die bei 260 und 280 nm gemessen wurden

260/230: Quotient der Extinktionen, die bei 260 und 220 nm gemessen wurden

Methode 1 und 2 erbrachten beide annähernd gute DNA-Reinheitswerte. Da mit der **Methode 2** durch Auswahl von Einzelkolonien eine gezieltere Dosierung der Ausgangsbakterienmenge für die Gewinnung der erforderlichen DNA-Menge von 10 bis 50 ng/µl möglich war, wurde diese Methode zur Reinigung der Template-DNA für die nachfolgende Sondenherstellung gewählt.

3. Optimierung der PCR-Parameter mit Gradienten vor Sondenmarkierung

Die optimale Annealing Temperatur der ail 1+2 Primer wurde im Vorfeld mittels eines Temperatur-Gradienten Programms (BioRad, Hercules, CA) ermittelt. Das Programm generierte zwischen der Ober- und Untergrenze des gewählten Gradienten (+55 bis +60 °C) 8 Temperaturschritte: +55 °C; +55,5 °C; +56,1 °C; +57,0 °C; +58,3 °C; +59,2 °C; +59,8 °C; +60 °C. Die benötigten Reagenzien (Tabelle 27) für die PCR wurden dem Dig Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) entnommen.

Tabelle 27: Master Mix die für Ermittlung der Annealing Temperatur

Substanz	Konzentration	Menge	Endkonzentration
H ₂ O		17,875 µl	
PCR Puffer mit MgCl ₂ (Flasche 3), 10x	10x	2,5 µl	0,5x
dNTP Stammlösung (Flasche 4), 10x	10x	2,5 µl	100 µM
Primer ail1+2, 2 µM	2µM	1,25 µl	0,1 µM
Enzym Mix (Flasche 1), 105 U/30 µl	105 U/30µl	0,375 µl	1,31 U
Summe Mastermix:		24,5 µl	
Template:		0,5 µl	
Gesamtvolumen:		25 µl	

(halbe Menge der im Roche Manual angegebenen Werte)

Programmierung des Thermocyclers:

<u>Zyklus 1:</u>	Denaturierung	
Step 1:	94°C	1 Min
<u>Zyklus 2:</u> (30x)	Amplifikation (Denaturierung/Annealing/Extension)	
Step 1:	94°C	30 Sek
Step 2:	55-60°C	1 Min
Step 3:	70°C	2 Min
<u>Zyklus 3:</u> (1x)	Annealing/Extension	
Step 1:	70°C	5 Min

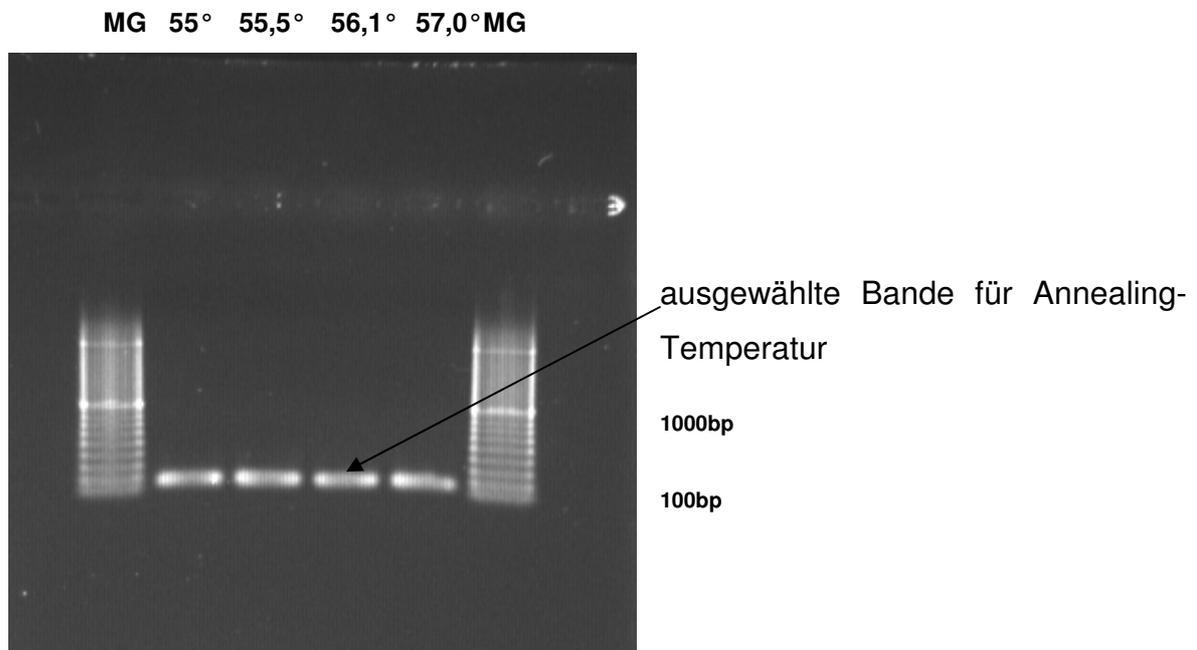
Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1%igem Mini-Agarose-Gel. Dazu wurden 0,3 g Agarose (BioRad) mit Tris/Boric Acid/EDTA Puffer (TBE, BioRad) (1,5 ml 10x TBE + 28,5 ml Aqua bid.) im Mikrowellenherd gelöst und in die Gelkammer mit den bereits eingesetzten Kämmen gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde es in die Laufkammer, welche 260 ml 0,5x TBE-Puffer enthielt (13 ml 10x TBE + 247 ml Aqua bid.), überführt.

Zum Auftragen der PCR-Produkte wurden 1 µl Sample Acid Loading Buffer (BioRad) pro PCR-Probe auf ein Stück Parafilm pipettiert und anschließend mit 5 µl des Amplifikates vermischt. 5 µl der Proben und jeweils 5 µl 100 bp-Längenstandard (BioRad) wurden in die Taschen des Gels überführt und bei 120 Volt (V) in 20 Min aufgetrennt. Nach Färbung des Agarosegels für 15 Min im Ethidiumbromid-Bad (25 µl Ethidiumbromid (BioRad) (10 mg/ml) pro 500 ml Aqua bidest) und anschließendem Wässern für 5 Min in Aqua bidest, wurden die DNA-Fragmente mit UV-Licht (BioRad) in einem Geldokumentationssystem (BioRad) sichtbar gemacht und dokumentiert. Durch Vergleich mit dem 100 bp-Längenstandard konnte die Länge der DNA-Fragmente bestimmt werden. Die nachfolgende Abbildung (Abbildung 10) zeigt die Banden der Gelelektrophorese. Aufgrund der guten Bandenzeichnung bei einer Temperatur von 56,1°C, wurde diese Temperatur (56°C) als Annealing Temperatur bei der nachfolgenden PCR-Sonden-Markierung eingesetzt.

Abbildung 10: Optimierung der PCR-Parameter mit Gradienten

PCR Gradient 55 - 60°C, Datum: 03.11.2006

Erwartetes Molekulargewicht (MG) des *ail*-Gens: 170 bp



4. Markierung der Sonde mit PCR

Die Reagenzien des Dig Probe Synthesis Kits (Roche Diagnostics) wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut. In der Reaktion wurden neben der markierten Sonde eine unmarkierte Sonde sowie eine tPA (tissue Plasminogen Activator)-Sonde als Kontrolle mitgeführt. Der Reaktionsansatz wurde nach folgendem Schema (Roche Diagnostics) unter einer Sterilbank pipettiert:

Tabelle 28: Reaktionsansatz für die Sondenmarkierung mit Digoxigenin (DIG) nach dem DIG Application Manual for Filter Hybridization (ROCHE DIAGNOSTICS 2000)

Reagenz	DIG-gelabelte Sonde	ungelabelte Sonde	DIG-gelabelte tPA* Kontroll-Sonde	Endkonzentration
steriles, gereinigtes Wasser	35,75 µl	35,75 µl	29,25 µl	-
PCR Puffer mit MgCl ₂ , 10x konz. (Flasche 3)	5 µl	5 µl	5 µl	1x
PCR DIG Mix, 10x konz. (Flasche 2)	5 µl	-	5 µl	200 µM
dNTP Stammlösung, 10x konz. (Flasche 4)	-	5 µl	-	200 µM
Primer (ail1+2)	2,5 µl	2,5 µl	5 µl (Flasche 6)	0,2 µM
Enzym Mix (Flasche 1)	0,75 µl	0,75 µl	0,75 µl	2,6 U
Mastermix	49 µl	49 µl	45 µl	
Template DNA	1 µl	1 µl	5 µl (Flasche 5)	48 ng/µl
Reaktionsvolumen	50 µl	50 µl	50 µl	

*tPA: tissue Plasminogen Activator

5 µl der Reaktionen wurden anschließend in einem Mini-Gel (Methode siehe unter: 3. Optimierung der PCR-Parameter mit Gradienten vor Sondenmarkierung) überprüft. Der Rest wurde bei +4 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Waren die nachfolgend aufgeführten Parameter der Gelelektrophorese (Tabelle 29) erfüllt, galt das Labeling als erfolgreich, und die Sonde konnte bei einer Konzentration von 2 µl/ml (25 ng/ml) Hybridisierungslösung DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics) eingesetzt werden. War die Bande der gelabelten Sonde sehr stark, wurden 0,5 -1 µl der Sonde/ml Hybridisierungslösung verwendet. Bei schwachem Signal wurden bis zu 4 µl Sonde/ml Hybridisierungslösung verwendet.

Tabelle 29: Gelelektrophorese-Parameter für ein erfolgreiches Dig-Labeling

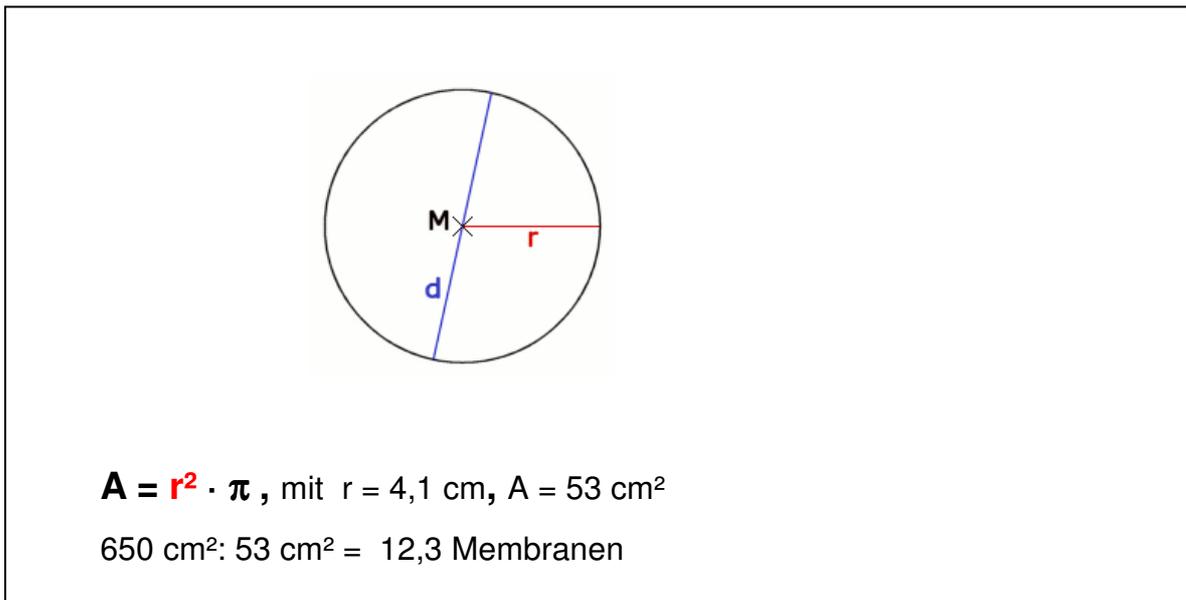
✓	die tPA Kontrollprobe hat normalerweise eine Größe von 500-550 bp, das DIG-Labeling verlangsamt die Wanderung im Gel, so dass die Größe des Amplikons bei etwa 442 bp liegt
✓	beide Sonden, ungelabelt und gelabelt, sollten auf dem Gel klar erkennbar sein
✓	ungelabelte Sonde muss bei 170 bp liegen (NAKAJIMA et al., 1992)
✓	die gelabelte Sonde wandert langsamer als die ungelabelte
✓	Die Ethidiumbromidfärbung der gelabelten Sonde ist gleich/etwas schwächer als die ungelabelte Sonde

Die gelabelte Sonde wurde bis zum Verwenden bei -20 °C gelagert. Die Sonde kann bis zu einem Jahr bei -20 °C gelagert werden (ROCHE DIAGNOSTICS 2000).

Sondenertrag

Bei Einsatz von 10 ng DNA im Sonden-Labeling Durchlauf, können 650 cm² Membranfläche der in der Hybridisierung verwendeten Nylonmembranen (PALL, Ann Arbor, MI, USA) analysiert werden (Roche Diagnostics). Das heißt, dass bei einem Membranradius von $r = 4,1$ nach allgemeiner Kreisflächenformel 12,3 Membranen untersucht werden können.

Abbildung 11: Sondenertragsberechnung mit Kreisflächenformel



b) Ablauf der Kolonie Hybridisierung

- ⇒ Vorbereitung der Nylonmembranen für die Hybridisierung
- ⇒ Lyse der Bakterien
- ⇒ Fixation der DNA auf Nylonmembran
- ⇒ Prä-Hybridisierung
- ⇒ Hybridisierung
- ⇒ Chromogene Farbreaktion/Detektion
- ⇒ Auswertung und Dokumentation

Tag 1:

Die für die Kolonie-Hybridisierung bei -20°C zurückgestellten Anreicherungen der Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Es wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe ($100 \mu\text{l}$ Probe in $900 \mu\text{l}$ Hirn-Herz-Glucose-Bouillon (BHI, Oxoid) erstellt und $100 \mu\text{l}$ der jeweiligen Verdünnung auf CIN-Agar gespatelt. Der Agar wurde über Nacht bei $+30^\circ\text{C}$ und 18-20 Std bebrütet.

Tag 2:

Vorbereitung der Nylonmembranen für die Hybridisierung

Von den bebrüteten CIN Platten wurden die Platten mit Einzelkolonien ausgewählt und 30 Min bei +4°C vorgekühlt. Unter DNA-Kontaminationsschutz wurde der Arbeitsplatz mit Whatman Filterpapier (Carl Roth GmbH) ausgelegt. Anschließend wurden die Nylonmembranen (PALL) inklusive ihrer 2 Schutzblätter mit Pinzette fixiert und mit Bleistift (!) am Filterranda (inkl. Probennummer) zur späteren Identifizierung mit der Mutterplatte markiert. Dann wurde die Nylonmembran mit Pinzette blasenfrei auf die zuvor ausgesuchte Nähragarplatte (CIN) aufgelegt (mit Beschriftung zum Agar) und vorsichtig angedrückt. Die Position der Membran (Randmarkierung) wurde nun auch zur späteren Identifizierung der Kolonien auf der Mutterplatte am Rand der Petrischale gesetzt. Nach Optimierung des Hybridisierungsablaufes wurden die 100 µl der Anreicherung direkt auf die Nylonmembran, die zuvor auf den Agar gelegt wurde, aufgespaltet. Anschließend wurde der Agar über Nacht bei +30°C und 18-20 Std bebrütet. Nach 1-2 Min wurde der Filter zügig abgezogen und auf das Whatman-Filterpapier auf dem Arbeitsplatz gelegt. Der Rand der Membran erhielt während des Verweilens der Membranen auf dem Filterpapier eine Markierung (+) für die Positivkontrolle. Die Reinkulturplatte des auch in den PCR-Durchläufen verwendeten MYT13.1D-Stammes wurde aus dem Kühlschrank entnommen. Der Stamm war zuvor aus der Mikrobank (-80°C) auf Blutplatte über Nacht inkubiert worden. Eine Kolonie wurde mit einer sterilen Öse auf der Membran an der Markierung aufgetragen. Die Mutterplatten wurden für den nächsten Tag im Kühlschrank aufbewahrt.

Lyse der Bakterien

1 ml der Denaturierungslösung wurden pro Membran auf Whatman Filterpapier gegeben und die Membranen mit der Kolonieseite nach oben auf das Papier gelegt. Einwirkungszeit: 15 Min. Nach einer Trocknungszeit der Membranen für 5 Min auf frischem Filterpapier wurden die Membranen auf mit Neutralisierungslösung (1 ml pro Membran) getränktem Filterpapier inkubiert. Einwirkzeit: 15 Min. Nach einer weiteren Trocknungszeit für 5 Min auf frischem Filterpapier, wurden die Membranen mit 2X SSC (40 ml pro Membran) auf dem Rüttler bei Raumtemperatur gewaschen. Waschzeit: 10 Min

Anschließend erfolgte wiederum eine Trocknung der Membranen auf trockenem Whatman Filter (1-5 Min).

Fixation der DNA auf Nylonmembran:

Zur Fixation der DNA auf den Nylonmembranen wurden diese für 30 Min bei +80 °C im Hybridisierungsofen gebacken. Wegen der Umluft und der damit verbundenen Austrocknungsgefahr, wurden die Membranen einzeln in sterile Petrischalen gegeben und zusätzlich in sterile Plastiktüten gepackt.

Entfernen der Zellreste

Proteinase K (>600 U/ml, 14-22 mg/ml/QIAGEN) wurde 1:10 mit 2X SSC verdünnt. Anschließend wurden die Membranen (pro Membran 0,5 ml der verdünnten Lösung) in sterile Petrischalen eingelegt und für 1 Std bei +37 °C im Hybridisierungsofen inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Entfernung der Zellreste durch mit Aqua bidest (A. bid.) benetztes Filterpapier. Die Membranen wurden dafür auf frisches Whatman Filterpapier kurz zum Trocknen gelegt (1-5 Min). Im Anschluss wurde das mit A. bid. benetzte Filterpapier auf die Membranen positioniert und mit einer Rolle (steriles Hybridisierungsglas/SCHOTT, Mainz, Deutschland,) gleichmäßig auf alle Membranen leicht angedrückt. Wenn danach noch Zellreste vorhanden waren, wurde der Vorgang wiederholt.

Prä-Hybridisierung

Die verwendete Hybridisierungstemperatur wurde aufgrund der im Roche Diagnostics Manual (ROCHE DIAGNOSTICS 2000) angegebenen Formel berechnet. Die optimale Hybridisierungstemperatur (T_{hyb}) liegt +20 °C bis +25 °C unter der kalkulierten Schmelztemperatur (T_m). T_m ergibt sich aus der Formel:

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

l = Länge der *ail*-Sonde in Basenpaaren

$\% G+C$ = G/C Gehalt der *ail*-Sonde

Bei einem GC-Gehalt der 170 bp-langen *ail*-Sonde von 68 (= 40%) ergibt das folgendes Ergebnis für T_{hyb} :

T_{hyb} für *ail*-Sonde: $T_m = 49,82 + 0,41 (40\%) - 600/170\text{bp} = 63^\circ\text{C}$ (gerundet)

$T_{\text{hyb}} = 63^\circ\text{C} - (20^\circ\text{C} \text{ bis } 25^\circ\text{C}) = 43\text{-}38^\circ\text{C}$

Nachfolgend wurden die Membranen mit einer sterilen Pinzette in die Hybridisierungs-Flaschen (SCHOTT) gegeben (Kolonieseite nach innen). Je 20 ml DIG Easy Hyb (Roche) wurden pro Membran in die Flaschen gefüllt und bei $+42^\circ\text{C}$ 1 Std im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Die Prähybridisierung sorgt dafür, dass unspezifische Bindungen abgesättigt und äquilibriert werden. Zusätzlich schafft sie einen pH-Wert, der optimale Sondenbindung gewährleistet.

Hybridisierung

Die Sonde (25 ng/ml) wurde 5 Min bei $+99^\circ\text{C}$ im Heizblock denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Anschließend wurde die denaturierte Probe mit vorgewärmten DIG Easy Hyb (auf Hybridisierungstemperatur vorgewärmt) gemixt. Wenn die Sonde bereits mit DIG Easy Hyb gemixt war, wurde die Sonde bei $+65^\circ\text{C}$ für 5 Min erhitzt. Das Mischungsverhältnis von Sonde zu DIG Easy Hyb ist unter 4. Markierung der Sonde mit PCR beschrieben.

Nachdem die Prähybridisierungslösung entfernt und verworfen war, wurden 2 ml des Sonden/DIG Easy Hyb Mixes pro Hybridisierungsflasche zugegeben und über Nacht (12-16 Std) bei $+42^\circ\text{C}$ im Hybridisierungssofen hybridisiert.

Tag 3

Nach der Hybridisierung erfolgte ein Auffangen der Sonde in sterilen Röhrchen (Blue Max™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Die Sonde kann bis zu 10 mal wieder verwendet werden und ist bei -20°C etwa 1 Jahr lagerbar. Dann wurden die Filter mit einer sterilen Pinzette aus den Flaschen genommen und bei Raumtemperatur 2 x 5 Min im Low stringent Waschpuffer (2X SSC + 0,1% SDS) in einer Plastikschale bei Raumtemperatur auf dem Rüttler gewaschen. Der spezifische Waschschrift (High stringent Waschpuffer = 0,5X SSC+0,1% SDS), der Basenpaarungen bei weniger als 95% Homologie zwischen der Sonde und der Membran-DNA verhindert, erfolgte anschließend für 2 x 15 Min bei $+68^\circ\text{C}$ im Hybridisierungssofen. Dafür wurden Hybridisierungs-Flaschen mit 40 ml des

Waschpuffers gefüllt und vor Einfügen der Membranen auf die gewünschte Waschttemperatur vorerwärmt.

Chromogene Farbreaktion/Detektion

Die Filter wurden zur Vorbereitung 1-5 Min in Waschpuffer (DIG Wash and Block Buffer Set, Roche Diagnostics) auf dem Rüttler bei Raumtemperatur gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation der Membranen in Blockinglösung (DIG Wash and Block Buffer Set, Roche Diagnostics, fertige 250ml Portionen bei -20°C aufbewahren) für 30 Min auf dem Rüttler bei Raumtemperatur. Verwendet wurden 40 ml der Blockinglösung pro Membran. Die Blockinglösung blockiert unspezifische Bindungen, an die der Antikörper der nachfolgenden Farbreaktion sonst binden würde. Nach der Inkubation wurde die Antikörperkonjugatlösung (DIG Nucleic Acid Detection Kit, Roche Diagnostics) im Verhältnis 1:10000 mit der Blocking Lösung verdünnt (je Membran 15 ml Blocking Lösung + 3 µl Antikörper Konjugat). Inkubationszeit: 30 Min auf Rüttler bei Raumtemperatur. Bemerkung: Die Sonde ist mit Digoxigenin markiert. Der Anti-Digoxigenin-Antikörper bindet an die entsprechenden Stellen. Er trägt ein Enzym (alkalische Phosphatase), das das Farbreagens (NBT/BCIP ready-to-use tablets, Roche Diagnostics) „BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)“ in der nachfolgenden Reaktion spaltet, was zum dunkelblauen Farbniederschlag führt. „NBT (Nitro blue tetrazolium chloride)“ verstärkt diese Reaktion.

Währenddessen wurde die Färbelösung hergestellt: Pro Filter 1 NBT/BCIP Tablette in 10 ml A. bid. lösen oder 200 µl der NBT/BCIP Stammlösung (DIG Nucleic Acid Detection Kit, Roche Diagnostics) in 10 ml Detektionpuffer (DIG Wash and Block Buffer Set, Roche Diagnostics) lösen, und lichtgeschützt aufbewahren. Anschließend wurden die Membranen 2 x 15 Min bei Raumtemperatur in Waschpuffer (40 ml pro Membran) auf dem Rüttler gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurden die Membranen 2 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rüttler im Detektionspuffer (20 ml pro Membran) äquilibriert.

Die Farbreaktion erfolgte schließlich durch die Zugabe von 10 ml pro Membran der zuvor hergestellten Färbelösung. Jede Membran wurde separat in einer

sterilen Petrischale inkubiert. Die Inkubation (nicht rütteln) wurde im Dunkeln (Schublade) über 1-16 Std durchgeführt. (Bemerkung: Die Farbreaktion ist nach 16 Stunden abgeschlossen, kann aber zwischendurch kontrolliert und vorzeitig mit TE-Puffer beendet werden. Nach Sichtbarwerden der Färbereaktion wurde diese durch kurzes Waschen mit TE-Puffer (50 ml pro Membran) auf dem Rüttler gestoppt. Waschzeit: 5 Min bei Raumtemperatur.

Dokumentation

Die Membranen wurden nach Lufttrocknung für längere Zeit in einer Schublade aufbewahrt. Die Ergebnisse (Membran) wurden fotografiert und archiviert. Das Verblässen der gefärbten Membranen kann bei Bedarf mit TE-Puffer Tränkung wieder aufgefrischt werden.

Auswertung

Bei *Y. enterocolitica* positiven Membranen wurde die Mutterplatte aus dem Kühlschrank entnommen und die Nylonmembran an die zuvor gesetzten Markierungen an der Petrischale vor eine Lichtquelle gehalten. Die positiven Kolonien wurden von der Mutterplatte mit einer sterilen Öse gepickt und auf CIN Agar neu ausgestrichen. Nach Subkultivierung auf PCA und anschließender DNA Reinigung von 5 Kolonien der Platte mit InstaGene™, erfolgte eine Bestätigungs-PCR mit den zuvor beschriebenen Real-Time Verfahren. Bei positivem Ausfall wurden die Kolonien in der Mikrobank gelagert.

9.2.2 Kultur

Die zu untersuchenden Proben wurden steril entnommen und in sterile Kunststoffbeutel verpackt. Die Untersuchung erfolgte entweder am gleichen Tag oder nach einer Lagerung bei -20°C. Dabei durchliefen die Proben folgendes Schema:

Tag 1:

1. Anreicherung

Die Proben wurden zu je 25 g in 225 ml in m-TSB gegeben und anschließend 30 Sek im Stomacher homogenisiert.

2. Direktausstrich auf Selektivagar

Es erfolgte ein 3-Ösen-Direktausstrich von 100 µl der homogenisierten Lösung auf CIN Selektivagar. Der CIN Agar wurde über Nacht für 18-20 Std bei +30°C bebrütet und die Anreicherung für 18-20 Std bei +25°C.

Tag 2:

1. Ausstrich der Über-Nacht-Anreicherung auf Selektivagar

Desweiteren wurden 100 µl von der Bouillon entnommen und mit einem 3-Ösen Ausstrich auf CIN Selektivagar ausgestrichen. Der Agar wurde wiederum über Nacht für 18-20 Std bei +30°C inkubiert.

2. Auswertung der CIN-Platten vom Vortag (Direktausstrich)

Die Auswertung der CIN-Platten vom Vortag erfolgte durch die Beurteilung der Koloniegröße und -farbe. Verdächtige Kolonien, < 1 mm groß mit dunkellila Zentrum, sogenannte „Kuhaugen“, wurden ausgewählt, auf CIN Agar subkultiviert und zur weiteren Differenzierung auf PCA ausgestrichen.

Tag 3:

1. Auswertung der CIN-Platten vom Vortag (Über-Nacht-Anreicherung)

Die Auswertung der CIN-Platten vom Vortag erfolgte durch die Beurteilung der Koloniegröße und -farbe. Verdächtige Kolonien wurden ausgewählt, auf CIN Agar subkultiviert und zur weiteren Differenzierung auf PCA ausgestrichen.

ERGEBNISSE

10 Nachweis von *Y. enterocolitica*

10.1 Nachweis von *Y. enterocolitica* in rohem Fleisch und Rohfleischprodukten

In den unterschiedlichen Rohfleisch- und Rohfleischprodukt-Proben von Rind, Schwein und Geflügel konnte mit dem Real-Time Verfahren, das auf der Verwendung der *ailP*-Sonde basierte, bei 14 der 479 untersuchten Proben (3,0%) *ail*-positive *Y. enterocolitica* detektiert werden (Tabelle 30). Unter den 14 Proben waren 12 Fleischstücke und 2 Hackfleischproben. Der Anteil der positiven Proben der insgesamt 55 untersuchten Hackfleischproben belief sich auf 3,6% und bei den 288 untersuchten Fleischstücken entsprachen die 12 positiven Proben einem Anteil von 4,2%. Der Anteil der positiven Proben an den insgesamt 343 untersuchten Rohfleischproben belief sich auf 4,1%. In keiner der 136 untersuchten Rohwürste konnten *ail*-positive Yersinien detektiert werden konnten.

Tabelle 30: Nachweis von pathogener *Y. enterocolitica* in rohem Fleisch und Rohfleischprodukten

Proben		Gesamt	positive Proben	Anteil in %
Fleisch	Hackfleisch	55	2	3,6%
	Fleischstücke	288	12	4,2%
	Gesamt	343	14	4,1%
Wurst	Rohwurst	136	0	0,0%
	Gesamt	479	14	3,0%

10.2 Nachweis von *Y. enterocolitica* bei Rind, Schwein und Geflügel

Die Prävalenz von *ail*-positiver *Y. enterocolitica* bei den untersuchten Tierarten Rind, Schwein und Geflügel lässt sich wie folgt zusammenfassen:

Tabelle 31: Prävalenz von pathogener *Y. enterocolitica* bei den untersuchten Tierarten

Tierart	untersuchte Proben	positive Proben	Anteil der positiven Proben in %
Schwein	215	13	6,0%
Rind	156	0	0,0%
Geflügel	108	1	0,9%

Für die einzelnen Tierarten konnten folgende Ergebnisse festgehalten werden:

Schwein

13 der insgesamt 215 untersuchten Proben (6,0%) waren positiv. Davon waren 2 bei 31 untersuchten Hackfleischproben (6,5%) und 11 bei 109 untersuchten Fleischstücke (10,1%) positiv. Der Anteil der positiven Proben an den insgesamt untersuchten Rohfleischproben belief sich auf 9,3%.

Tabelle 32: Prävalenz von pathogener *Y. enterocolitica* in rohem Fleisch und Rohprodukten vom Schwein

Proben		Gesamt	positive Proben	Anteil in %
Fleisch	Hackfleisch	31	2	6,5%
	Fleischstücke	109	11	10,1%
Wurst	Rohwürste	75	0	0,0%
	Gesamt	215	13	6,0%

Rind

Bei den insgesamt 156 untersuchten Rinderproben konnten weder unter den 101 Rohfleischproben noch unter den 55 untersuchten Rohwurstproben *ail*-positive Yersinien gefunden werden.

Tabelle 33: Prävalenz von pathogener *Y. enterocolitica* in rohem Fleisch und Rohprodukten vom Rind

Proben		Gesamt	positive Proben	Anteil in %
Fleisch	Hackfleisch	24	0	0,0%
	Fleischstücke	77	0	0,0%
Wurst	Rohwürste	55	0	0,0%
	Gesamt	156	0	0,0%

Geflügel

Der Anteil an positiven Proben an den insgesamt 108 untersuchten Proben belief sich auf 0,9%. 1 (1,0%) von 102 untersuchten Fleischstücken und damit Rohfleischproben wurde als *ail*-positiv befundet. Keine der 6 untersuchten Rohwürste war positiv.

Tabelle 34: Prävalenz von pathogener *Y. enterocolitica* in rohem Fleisch und Rohprodukten vom Geflügel

Proben		Gesamt	positive Proben	Anteil in %
Fleisch	Rohfleisch	102	1	1,0%
Wurst	Rohwürste	6	0	0,0%
	Gesamt	108	1	0,9%

10.3 Nachweis von *Y. enterocolitica* mit den eingesetzten Untersuchungsverfahren

Tabelle 35: Vergleich der Untersuchungsverfahren zur Ermittlung der Prävalenz von pathogener *Y. enterocolitica* in rohem Fleisch und Rohfleischprodukten von Schwein, Rind und Geflügel

Untersuchungs- verfahren	positive Proben			
	Schwein	Rind	Geflügel	Gesamt
SYBR [®] Green	15	3	3	21
ailP-Sonde	13	0	1	14
Kolonie Hybridisierung	0	0	0	0
Kultur	0	0	0	0

SYBR[®]Green

Mit dem Real-Time Verfahren, das auf dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®]Green basierte, konnten im Gegensatz zur ailP-Sonde (3,0%) bei 21 der 479 untersuchten Proben (4,4%) *ail*-positive Yersinien detektiert werden. Davon waren 15 Proben der Tierart Schwein positiv, 3 beim Rind und beim Geflügel konnten ebenfalls 3 Proben mit SYBR[®]Green als positiv detektiert werden.

ailP-Sonde

Mit dem Real-Time Verfahren, das auf der ailP-Sonde basierte, konnten bei 14 der 479 (3,0%) untersuchten Proben pathogene Yersinien gefunden werden. Davon waren 13 Proben der Tierart Schwein *ail*-positiv und beim Geflügel konnte mit der ailP-Sonde 1 Probe als positiv befundet werden.

Als positiv befundet wurden allerdings abschließend nur Proben, die sowohl mit SYBR[®]Green als auch mit der ailP-Sonde ein positives Ergebnis hervorbrachten. Die nachfolgende Tabelle 36 zeigt eine Übersicht, der mit der Real-Time PCR generierten C_t-Werte. Bei der SYBR[®]Green Methode reichten die C_t-Werte von

26,7 bis 37,3 und bei der ailP-Sondenuntersuchung von 32 bis 38. Im Schnitt waren die Proben mit dem Sondensystem positiv, welche bei der SYBR®Green Real-Time PCR Untersuchung einen C_t-Wert unter 35 ergaben.

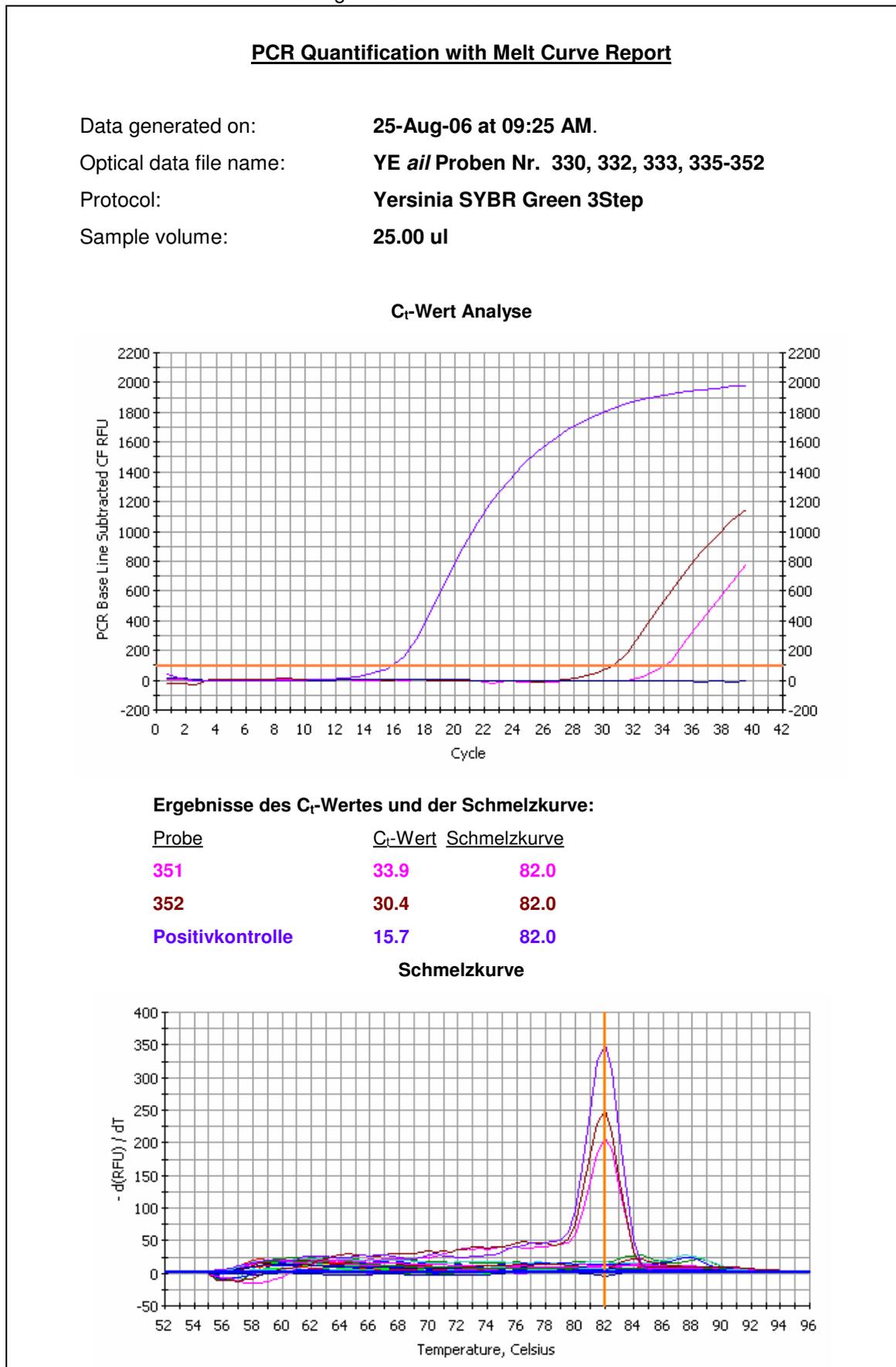
Tabelle 36: C_t-Werte der mit SYBR®Green und ailP-Sonde untersuchten Proben

Tierart	Probe	Produkt	C _t -Wert		Bewertung
			SYBR®Green	ailP-Sonde	
Schwein	13	Fleischstück	34,5	> 40	-
	38	Fleischstück	34,4	38	+
	78	Fleischstück	28,7	32	+
	83	Fleischstück	30,4	35	+
	114	Fleischstück	32	> 40	-
	126	Fleischstück	30,1	35	+
	132	Fleischstück	29,4	33	+
	226	Fleischstück	29,1	34	+
	227	Fleischstück	27,6	32	+
	407	Fleischstück	31,7	34	+
	441	Fleischstück	30,5	36	+
	351	Fleischstück	33,9	37	+
	352	Fleischstück	30,4	35	+
	82	Hackfleisch	28,3	33	+
	230	Hackfleisch	35,1	> 40	-
262	Hackfleisch	32,3	37	+	
Rind	30	Fleischstück	35,1	> 40	-
	104	Fleischstück	32	> 40	-
	149	Hackfleisch	36	> 40	-
Geflügel	436	Fleischstück	36,3	> 40	-
	278	Fleischstück	26,7	32	+
	421	Fleischstück	37,3	> 40	-

Beispiel eines Computer-generierten SYBR[®]Green Real-Time PCR Reports

Die nachfolgende Abbildung (Abbildung 12) zeigt beispielhaft einen Report des Computerprogrammes, mit dem die untersuchten Proben ausgewertet wurden. Bei der Auswertung wurden die Parameter C_t -Wert und die Schmelzkurve berücksichtigt. Allgemein wurden alle Proben, deren C_t -Wert unter 40 war und die Schmelzkurve des 170 bp großen Fragmentes des *ail*-Genes bei 81,5 -82°C lag, als positiv bewertet. In dem folgenden Report sind die Proben Nr. 351, 352 sowie die Positivkontrolle abgebildet. Die Proben Nr. 351, 352 und die Positivkontrolle wiesen einen C_t -Wert unter 40 auf und die ausgewertete Schmelzkurve lag bei 82,0°C. Somit konnten beide Proben als positiv gewertet werden und der Durchlauf war erfolgreich, da die Positivkontrolle positiv war und die Negativkontrolle keine Produkte enthielt, die eine Schmelzkurve oder einen C_t -Wert generierten.

Abbildung 12: Beispiel eines Computer generierten Reports für die Ergebnisse einer Real-Time PCR Untersuchung mit SYBR[®]Green



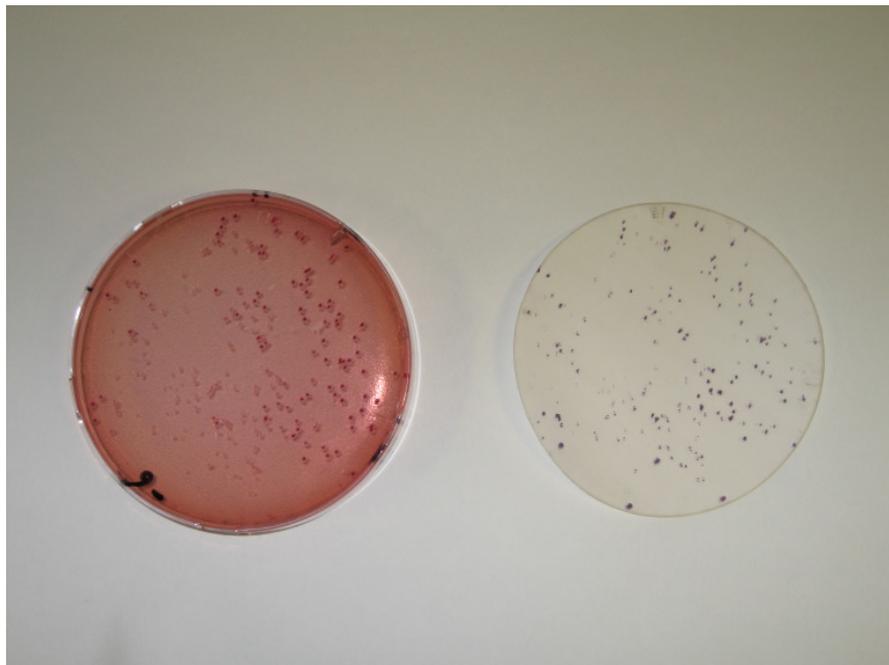
Kolonie Hybridisierung und Kultur

Mit der Kolonie Hybridisierung und dem kulturellen Verfahren konnten keine pathogenen Yersinien aus den untersuchten Proben isoliert werden.

Testdurchlauf der Kolonie Hybridisierung

Beim Testdurchlauf mit dem Reinstamm MYT 13.1D konnten positive Hybridisierungssignale auf der Nylonmembran abgelesen werden. Die nachfolgende Abbildung 13 zeigt die positive Nylonmembran inklusive der dazugehörigen Mutterplatte. Die positiven Signale der Nylonmembran konnten den entsprechenden Bakterienkolonien auf der Mutterplatte zugeordnet werden.

Abbildung 13: Mutterplatte mit Kolonien des Reinstammes MYT 13.1D (links) und die dazugehörige Nylonmembran mit positiven Signalen (rechts)

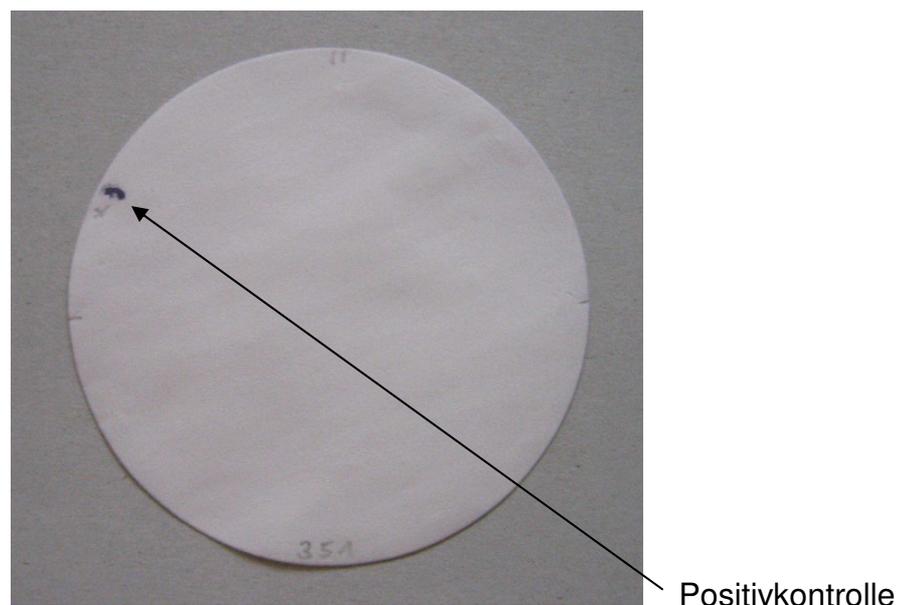


Untersuchung der Proben mit Kolonie Hybridisierung

Alle 14 Proben, die in der Real-Time-aiP-Sondenuntersuchung positiv ausgefallen waren, wurden mit dem Kolonie Hybridisierungs-Verfahren untersucht. Bei 9 von 14 zu untersuchenden Proben konnte kein Keim mit der Koloniehybridisierung isoliert werden. Eine Kolonie Hybridisierung der restlichen 5 Proben konnte nicht durchgeführt werden, da eine Anzucht der Bakterien aus der zurückgestellten Anreicherung (-20°C) nicht möglich war.

Die nachfolgende Abbildung 14 zeigt beispielhaft für alle Proben das Ergebnis einer untersuchten Probe. Hier ist die Nylonmembran einer Probe abgebildet, die mit der Kolonie Hybridisierung untersucht wurde. Alle Proben, die mit der Hybridisierung untersucht wurden, fielen negativ aus, da außer der Positivkontrolle keine weiteren positiven Signale auf der Membran detektiert wurden. Der abgebildete Pfeil zeigt auf die Positivkontrolle. Alle Nylonmembranen der untersuchten Proben sind im Anhang gesamthaft dargestellt.

Abbildung 14: Beispiel einer Nylonmembran einer Probe, die mit dem Kolonie Hybridisierungsverfahren untersucht wurde



Vergleich der zur Hybridisierung eingesetzten Agarplatten

Beim Einsatz von CIN-Selektivagar konnte aus der zurückgestellten Anreicherung (-20 °C) grundsätzlich mehr Bakterienwachstum beobachtet werden, wenn der Agar kein Yersinia-Selektivsupplement enthielt. Hier konnten aus der unverdünnten Anreicherung etwa 10 bis 30 Kolonien angezüchtet werden. Mehr Wachstum wurde auf CASO-Agar beobachtet. Etwa 20 bis 50 Kolonien wuchsen auf der unverdünnten Anreicherung auf dem Agar.

Der zu Beginn der Hybridisierungsvorgänge eingesetzte CIN-Agar hatte den Nachteil, dass beim Ablesen der Nylonmembran Farbbestandteile der auf CIN-Agar gewachsenen Kolonien durch die Waschvorgänge nicht gänzlich entfernt wurden und die leicht farbigen Punkte auf der Membran zur Verwechslung mit positiven Signalen führen konnten. Allerdings war das Signal der Positivkontrolle stets deutlicher als die farbigen Rückstände der auf CIN-Agar gewachsenen Kolonien, und beim Vergleichsdurchlauf mit CASO-Agar waren diese Proben negativ. Die nachfolgende Abbildung 15 zeigt eine Probe, die nach Wachstum auf CASO- und CIN-Agar zum Vergleich einer Hybridisierung unterzogen wurde. Auf der Membran, deren Grundlage die Anzüchtung auf CIN-Agar (linke Membran) war, sieht man noch farbige Rückstände der Kolonien als Punkte auf der Membran. Die rechte Membran, auf der zuvor Kolonien auf CASO-Agar angezüchtet worden waren, zeigt bis auf die Positivkontrolle weder andere positive Signale noch farbige Rückstände der Kolonien.

Abbildung 15: Hybridisierungsergebnis einer Probe (262), die auf CASO- (rechts) und CIN-Agar (links) angezchtet wurde



DISKUSSION**11 Prävalenz von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln in Deutschland und Europa**

Aus den Untersuchungen von Planproben geht hervor, dass *Y. enterocolitica* im Jahr 2005 in Deutschland ausschließlich in Schweinefleischproben vorgekommen ist (HARTUNG 2006, EFSA 2006). Die Prävalenz des Serotyp O:3 Biotyp 4 wurde mit 1,85% angegeben. In Rohprodukten wurde im Gegensatz zum Vorjahr (2004: 6%) keine pathogene *Y. enterocolitica* gefunden. Der Umfang der untersuchten Planproben wurde als gering angegeben (HARTUNG 2006).

Die aus der EU übermittelten Daten (EFSA 2006) gaben an, dass innerhalb der positiv befundeten Planproben Schweineproben dominierend waren. Die Prävalenzen wurden auf der Einzelhandelsebene mit 0 bis 16,7% angegeben und auf Verarbeitungsebene mit 0 bis 5,6%. Die Prävalenz von *Y. enterocolitica* innerhalb untersuchter Rindfleischproben belief sich auf 0 bis 4,4%. In Deutschland wurde *Y. enterocolitica* nach EU Angaben in einer Rohmilchprobe (1,2%) gefunden. Die Prävalenz innerhalb untersuchter Geflügelproben wurde mit 7,6% auf Einzelhandelsebene und mit 20,5% auf Verarbeitungsebene angegeben.

Die Zusammenträge aus den EU-Mitgliedsländern sind allerdings unvollständig, da die Angaben der Probenumfänge aus 5 Mitgliedsländern stammen. In Anbetracht einer Gesamtzahl von 27 EU-Mitgliedsländern, ist etwa ein Fünftel repräsentiert. Dazu kommt, dass in den meisten Fällen die Angaben zum Serotyp bzw. zu vorhandenen Virulenzfaktoren fehlen und damit die Beurteilung über das pathogene Potential dieser Isolate offen bleibt. Die Tatsache, dass die durch *Yersinia* Spezies verursachte Lebensmittel-bedingten Infektionen sowohl in Deutschland als auch in Europa an dritter Stelle stehen und *Y. enterocolitica* zu 89% beteiligt ist (RKI 2006, EFSA 2006), bekräftigt den Bedarf nach weitergehenden Untersuchungen in den einzelnen Ländern. Ferner wurden unabhängig von den Daten, die in der EU aufgrund von Planproben zusammengetragen wurden, viele Einzelstudien zur Prävalenz von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln durchgeführt (siehe Tabelle 14, 15 und 16). Die

Ergebnisse dieser Einzelstudien geben ebenfalls Anlass zu intensiveren Untersuchungen hinsichtlich der Prävalenzen von pathogener *Y. enterocolitica* innerhalb der EU und Deutschland, da die Ergebnisse in den Einzelstudien nicht mit den Daten der EU im Einklang stehen.

So konnte in eigenen Untersuchungen mit der Real-Time PCR pathogene *Y. enterocolitica* mit einer Prävalenz von 6,0% bei untersuchten **Schweinefleischproben** gefunden werden. Die Ergebnisse decken sich in etwa mit den in der Literatur angegebenen Prävalenzen. HARTMANN (2006) ermittelte mittels Real-Time PCR Untersuchung ähnliche Ergebnisse. Bei 12% der in Deutschland untersuchten Schweinerohfleischproben konnte sie pathogene *Y. enterocolitica* detektieren. JOHANNESSEN et al. (2000) ermittelten in Norwegen mit einer PCR-Methode bei 300 untersuchten Schweinefleischproben eine Prävalenz von 17% von pathogener *Y. enterocolitica*. Mittels kultureller Methoden war eine Detektionsrate von 2% möglich. SCHIEMANN (1980) und FUKUSHIMA et al. (1997) konnten mit kultureller Methode eine Prävalenz von 2% (Deutschland) und 3% (Japan) in Schweinerohfleisch nachweisen.

Obwohl in Deutschland im Jahr 2004 nach dem BfR keine pathogene *Y. enterocolitica* in Geflügelfleischproben detektiert wurde, konnte in eigenen Untersuchungen eine Prävalenz von 0,9% in rohen **Geflügelfleischproben** ermittelt werden. Ebenfalls mit Einsatz einer PCR Methode war LINDBLAD et al. (2006) möglich, pathogene *Y. enterocolitica* mit einer Prävalenz von 9% in Geflügelschlachtkörpern in schwedischen Schlachthäusern zu detektieren. Selbst mittels kultureller Methoden war NORBERG (1981) und FUKUSHIMA et al. (1997) die Detektion von 1,2% in Schweden und 0,3% in Japan in Geflügelrohfleisch möglich. Aufgrund der eigenen Untersuchungsergebnisse kann rohes Geflügelfleisch in Bayern (Herkunftsland der Proben) eine potentielle Infektionsquelle darstellen, obwohl BUCHER et al. (2002b) bei der kulturellen Untersuchung von Schnabelhöhlen und Fäzes von 100 Tieren keine pathogene *Y. enterocolitica* finden konnten. Eine Kontamination zwischen Schweinefleisch und Geflügelfleisch auf Einzelhandelsebene oder im Verarbeitungsbetrieb ist durchaus auch möglich (LOGUE et al. 1996). Da aber für die Tierart Geflügel noch wenige

Daten zur Prävalenz von pathogener *Y. enterocolitica* existieren, sind weitere wissenschaftliche Studien, vor allem mit modernen, sensitiven Methoden erforderlich, um Geflügel als Kontaminationsquelle besser einordnen zu können.

Rinder stellen in Bayern vermutlich keine Kontaminationsquelle mit pathogener *Y. enterocolitica* dar, da in eigenen Untersuchungen keine Probe als positiv befundet werden konnte. Jedoch berichtete die EFSA (2006) innerhalb der EU über *Y. enterocolitica* positive **Rindfleischproben** in 2005. Inwieweit diese Proben eine Kontaminationsquelle darstellen, wird wie gesagt, Aufgabe weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen sein, da die Angaben über den Serotyp bzw. Virulenzfaktoren fehlen. Obwohl in eigenen Untersuchungen keine pathogene *Y. enterocolitica* bei rohem Rindfleisch und Rohfleischprodukten gefunden wurde, konnten in der Literatur dennoch Angaben zu Prävalenzen gefunden werden. So detektierten FUKUSHIMA et al. (1997) in Japan in 612 rohen Rindfleischproben mittels kultureller Methode zwei (Prävalenz: 0,3%) positive *Y. enterocolitica* Proben mit dem Serotyp O:3 Biotyp 4. VISHNUBHATLA et al. (2000) konnten mittels einer Sonden Real-Time PCR Methode in 31 der 100 untersuchten Rindfleischproben (31%) pathogene *Y. enterocolitica* detektieren. Es existieren allerdings auch für das Rind nur wenige Daten zu Untersuchungen auf pathogene *Y. enterocolitica*, daher wurde die Tierart aufgrund fehlender Daten in die eigenen Untersuchungen aufgenommen. Zudem sind in der Vergangenheit überwiegend kulturelle Methoden eingesetzt worden, die eine geringere Sensitivität aufweisen als PCR Methoden (THISTED LAMBERTZ et al. 1996, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999). Inwieweit das Rind auch als Kontaminationsquelle für Lebensmittelinfektionen in Frage kommt, bleibt weiterführenden Studien vorbehalten. Die Untersuchungen von VISHNUBHATLA et al. (2000) zeigen allerdings, dass auch eine durchaus hohe Kontaminationsrate (31%) bei Rindfleisch vorkommen kann. Zum jetzigen Zeitpunkt sind auch hier, wie beim Geflügel, Kontaminationen durch gleichzeitig verarbeitetes Schweinefleisch im Zerlegebetrieb oder auch im Einzelhandel möglich (LOGUE et al. 1996).

Schlussfolgerung

Generell sind die Zusammenträge aus den EU-Ländern noch sehr spärlich und bedürfen daher einer Intensivierung der Untersuchungen zur Verteilung von *Y. enterocolitica* in Lebensmittelproben. Zudem fehlen in vielen Fällen die Angaben zum pathogenen Potential der isolierten Keime. Neben den EU-Daten sind in der Literatur viele Einzelstudien zur Prävalenz von pathogener *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln zu finden. Die in den Einzelstudien ermittelten Prävalenzdaten stehen, wie in den vorausgehenden Abschnitten bereits aufgeführt wurde, nicht im Einklang mit den Zusammenträgen der EU. Für die in der Zukunft anstehenden Untersuchungen in der EU stehen aufgrund dieser Einzelstudien mittlerweile moderne molekularbiologische Methoden wie die PCR zur Verfügung. Eine Vereinheitlichung der eingesetzten Methoden sollte die Basis der fortführenden Untersuchungen darstellen, da die ermittelten Prävalenzen, wie die vorangegangenen Ausführungen zeigen, innerhalb der gewählten Methoden differieren. Die in der Literatur angegebenen Prävalenzen, vor allem bei den seltener untersuchten Tierarten Rind und Geflügel, wurden zudem überwiegend mittels kultureller Methoden ermittelt. Mit den PCR Methoden besteht die Möglichkeit, sowohl innerhalb der unterschiedlichen Tierarten als auch innerhalb der angegebenen Prävalenzwerten, höhere Zahlen zu ermitteln, da sowohl die herkömmliche PCR als auch die Real-Time PCR sensitivere Verfahren darstellen als klassische Kultivierungsmethoden (BOYAPALLE et al. 2001, JOHANNESSEN et al. 2000, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999). Ein weiterer Vorteil der DNA-basierten Methoden liegt in der Detektion von pathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen durch den Einsatz von Pathogenität bestimmenden Zielgenen (Virulenzgene).

12 Prävalenz von *Y. enterocolitica* in rohem Fleisch und Rohfleischprodukten

In Deutschland wurden für das Jahr 2004 vom BfR (HARTUNG 2006) keine weiteren Prävalenzen zu rohem Fleisch und Rohprodukten bis auf Schweineprodukte (1,85%) angegeben. Eine Produktspezifische Differenzierung wurde nicht aufgeführt. Bei der von der EFSA (2006) veröffentlichten Daten wurde

die Prävalenz von *Y. enterocolitica* in **Schweinefleischproben** mit 16,7% angegeben. Die Prävalenz in Hackfleisch betrug 9,9%.

In den weiteren EU Ländern konnten folgende Prävalenzen für die Tierart Schwein ermittelt werden: In Belgien wiesen Hackfleischproben eine Prävalenz von durchschnittlich 0,7% auf. Italien gab eine Prävalenz von 1,2% für Hackfleisch an. Die Angaben der EU-Mitgliedsländer bezogen auf einzelne Produkte sind wie die übergreifenden Angaben zu den einzelnen Tierarten ebenfalls nicht ausreichend, um die genannten Daten interpretieren zu können. Zum einen fehlen die Daten zu Pathogenitätsfaktoren der Keimisolate, zum anderen wurden die eingesetzten Untersuchungsverfahren nicht genannt. Verglichen mit Einzelstudien weichen auch hier die aufgeführten Prävalenzen, vor allem von Belgien und Italien erheblich von Einzelstudienenergebnissen ab.

So konnte in eigenen Untersuchungen mittels Sonden-Real-Time PCR eine Prävalenz von 6,5% von pathogener *Y. enterocolitica* in Hackfleisch- und 10,1% in Fleischproben beim Schwein ermittelt werden. Rohwürste waren in den Untersuchungen negativ, wohingegen THISTED LAMBERTZ et al. (2007) in einer schwedischen Untersuchung, eine Prävalenz von 11% in kaltgeräucherter Wurst mittels PCR Methode nachweisen konnten. Die ermittelten Zahlen decken sich in etwa mit denen für Deutschland angegebenen Zahlen (Prävalenz: 16,7% Schweineprodukte allgemein, Prävalenz: 9,9% Hackfleisch), allerdings kann die Interpretation aufgrund der fehlenden Aussagen hinsichtlich des Pathogenitätspotential der isolierten Keime nicht durchgeführt werden. Die eigenen Ergebnisse decken sich dennoch mit den Untersuchungen von HARTMANN (2006). Sie konnte eine Prävalenz von 13% bei 70 untersuchten Hackfleischproben mit Sonden-Real-Time PCR ermitteln. Die Prävalenz in 30 Fleischstücken betrug 10%. FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999) ermittelten in Finnland mit einer herkömmlichen PCR Methode sogar eine Prävalenz von 25% in 255 untersuchten Hackfleischproben. THISTED LAMBERTZ et al. (2007) untersuchten 100 Hackfleischproben und ermittelten in Schweden eine Prävalenz von 35%. Die Prävalenz in den Hackfleischproben ist mit 25% und 35% bei FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999) und THISTED LAMBERTZ et al. (2007) verglichen zu den eigenen Untersuchungen (6,5%) sehr hoch. Die Unterschiede in den Hackfleischprävalenzen liegen vermutlich zum einen an der Probenentnahme

und zum anderen am Probenumfang, der bei den genannten Autoren mit 255 und 100 Proben zum eigenen Probenumfang von 31 Schweinehackfleischproben umfassender war. Berücksichtigt werden müssen bei den Aussagen neben dem Probenumfang und der Probenahmetechnik und Untersuchungszeitpunkt auch Schritte der Anreicherungstechnik und eingesetzte Selektivmedien. In beiden genannten Studien wurden die Proben sofort untersucht, wohingegen in eigenen Untersuchungen die meisten Proben bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert wurden. In eigenen Untersuchungen wurde m-TSB als ein wenig selektives Medium eingesetzt, wohingegen THISTED-LAMBERTZ et al. (2007) zur Probenvorbereitung die Buoyant density centrifugation (BDC) einsetzten, die zur Konzentration der Zielorganismen und Beseitigung von Inhibitoren führt. Die Methode ist vor allem für Proben geeignet, die einen hohen Anteil an PCR-Inhibitoren aufweist, da diese durch den Zentrifugationsschritt abgetrennt werden (LINDQVIST 1997). Insofern ist es möglich, dass THISTED-LAMBERTZ et al. (2007) durch die Probenvorbereitung ein höheres Ergebnis erhielten, da die PCR durch Entfernung von Inhibitoren weniger gehemmt wurde. Generell bietet Hackfleisch eine größere Oberfläche und damit einen großen Nährboden für das Wachstum von Bakterien. Daher gelten für die Herstellung und Verarbeitung von Hackfleisch auch besondere Vorschriften wie die Hackfleisch-Verordnung und die Verordnung EG 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. Gerätschaften wie der Fleischwolf, der zur Herstellung von Hackfleisch eingesetzt wird, stellen ebenfalls eine Kontaminationsquelle für Hackfleischproben dar, wodurch zum einen eine Kontamination innerhalb der Schweineproben erfolgen kann, aber auch eine Kontamination von Rinderhackfleisch möglich ist.

Die bei **Rind-Rohfleischproben** ermittelten Prävalenzen wurden von Spanien mit 4,4% und von Italien mit 0,5% angegeben. Eigene Untersuchungen waren mittels Real-Time PCR für untersuchtes Rohfleisch und Rohwürste negativ, wohingegen VISHNUBHATLA et al. (2000) mit einer Sonden-Real-Time PCR eine Prävalenz von 31% in Hackfleischproben feststellten. Dazu werden in der Literatur Prävalenzen von 0,3% in Rohfleischproben, die mit kultureller Methode detektiert wurde, angegeben (FUKUSHIMA et al. 1997). Obwohl das Rind zumindest in Bayern aufgrund der Untersuchungen keine Kontaminationsquelle darstellt, sollten Prävalenzstudien auf die Bundesländer ausgeweitet werden. Zudem wurde in der

Literatur bisher überwiegend über die Untersuchung von Rindfleischproben mittels kultureller Methoden berichtet (FUKUSHIMA et al. 1987, DE BOER 1995, LOGUE et al. 1996, FUKUSHIMA et al. 1997 und NORTJE et al. 1999) und weitere Prävalenzstudien mit PCR Methoden, die sensitivere Methoden darstellen als kulturelle Untersuchungen (THISTED LAMBERTZ et al. 1996, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999, BOYAPALLE et al. 2001), könnten eventuell zu einer höheren Nachweisquote bei Rindfleischproben führen.

Spanien war das einzige Land, das *Y. enterocolitica* mit einer durchschnittlichen Prävalenz von 14,4% in **Geflügelrohfleisch** angab. Auch hier fehlen Angaben zu den Pathogenitätsfaktoren der Keime. Zudem ist die Angabe eines Mitgliedslandes mehr als unzureichend. In eigenen Untersuchungen konnte mit dem Real-Time PCR Verfahren in rohem Geflügelfleisch pathogene *Y. enterocolitica* mit einer Prävalenz von 1% festgestellt werden. Die Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen von NORBERG (1981), LOGUE et al. (1996), FUKUSHIMA et al. (1997) und LINDBLAD et al. (2006), die ebenfalls pathogene *Y. enterocolitica* in rohem Geflügelfleisch mit Prävalenzen von 1,2%, 15%, 0,3% und 9% finden konnten. Bis auf LINDBLAD et al. (2006, PCR-Untersuchung) wurden die Prävalenzen alle mit kulturellen Methoden ermittelt. In Rohwurstproben konnte keine pathogene *Y. enterocolitica* gefunden werden. Allerdings war der Probenumfang mit 6 untersuchten Rohwürsten sehr gering. Prävalenzstudien zu Untersuchungen von Geflügelrohwürsten konnten durch eine Literaturrecherche nicht gefunden werden. Anhand der eigenen Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, dass rohes Geflügelfleisch eine Kontaminationsquelle in Bayern darstellt.

Schlussfolgerung

Die eigenen Untersuchungen und die Ergebnisse aus der Literatur zeigen, dass sowohl in den EU-Ländern wie auch in den einzelnen Produktkategorien Lücken hinsichtlich fehlender Prävalenzdaten gefüllt werden müssen, um die Übertragungswege von pathogener *Y. enterocolitica* auf Lebensmittel intensiver zu hinterleuchten. Mit dem Einsatz sensitiverer Verfahren wie der PCR oder auch der Real-Time PCR sind höhere Detektionsraten durchaus denkbar.

13 Vergleich der eingesetzten Nachweisverfahren

Die Untersuchungen mit Real-Time PCR Verfahren zu Prävalenzen bei natürlich kontaminierten Schweinefleischproben und Proben weiterer Tierarten stehen noch in den Anfängen, daher sind Literaturangaben hierzu, vor allem in Deutschland spärlich.

In eigenen Untersuchungen wurde mit dem Real-Time PCR Verfahren, das auf dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®]Green basierte, im Gegensatz zur ailP-Sonde (3,0%) bei 21 der 479 untersuchten Rohproben (4,4%) *ail*-positive *Y. enterocolitica* detektiert. Mit dem Real-Time Verfahren, das auf der ailP-Sonde basierte, konnten bei 14 (3,0%) der 479 untersuchten Proben pathogene Yersinien gefunden werden. Somit wies die auf der Sonden Real-Time PCR basierende Methode eine geringere Nachweisrate auf als die SYBR[®]Green Methode. Die Ergebnisse konnten auch von HARTMANN (2006) erzielt werden, in dem mit der SYBR[®]Green Methode 26% Fleischproben *ail*-positiv waren und im Gegensatz dazu 12% der Rohfleischproben mit der ailP-Sonden Real-Time PCR.

Anhand der mit der Real-Time PCR generierten C_t-Werte (Tabelle 36) konnte beobachtet werden, dass die mit dem SONDEN System untersuchten Proben dann positiv ausfielen, wenn bei der SYBR[®]Green Real-Time PCR Untersuchung ein C_t-Wert unter 35 generiert wurde. Inwieweit sich diese Beobachtungen decken lassen ist fraglich, da die Untersuchungen an zwei unterschiedlichen Geräten durchgeführt wurden. Dennoch konnte HARTMANN (2006) durch Versuche mit beimpften Hackfleisch ermitteln, dass bei der ailP-Sonden Real-Time PCR im Gegensatz zum SYBR[®]Green System eine höhere Keimzahl nötig war, bis ein positives Signal beobachtet wurde. Daraus kann man folgern, dass die Proben, die mit der SYBR[®]Green Real-Time PCR Untersuchung zwar positiv ausfielen, aber mit der Sonden PCR negativ waren, eine sehr geringe Keimzahl enthielten. HARTMANN (2006) gab zur Diskussion, dass auch die Amplifizierung eines unspezifischen Produktes möglicherweise zu falsch-positiven Ergebnissen bei der SYBR[®]Green Methode geführt hatte, da die Schmelzkurvenanalyse im Gegensatz zur sequenzspezifischen Sondenanalyse unspezifischer ist. Folglich wurden nur

die Proben als positiv bewertet, die sowohl mit der SYBR[®]Green als auch mit der ailP Sonden Real-Time PCR Untersuchung positiv waren.

In eigenen Untersuchungen stellte sich die Real-Time PCR im Vergleich zur kulturellen Untersuchung und zur Kolonie Hybridisierung als das sensitivste Verfahren dar, da mit der Real-Time PCR Untersuchung 14 Proben als *ail*-positiv detektiert wurden. Im Gegensatz dazu konnten sowohl mit der Kolonie Hybridisierung als auch mit dem kulturellen Verfahren keine pathogenen Yersinien aus den untersuchten Proben isoliert werden. In der Regel erfordern Kolonie-Hybridisierungsverfahren 10^5 bis 10^6 Kopien der Zielsequenz (HILL und KEASLER et al. 1991). Bei Gesamtkeimzahlen von 10^6 bis 10^7 pro Gramm der zur Hybridisierung verwendeten Agarplatten wird die Blot-Effizienz reduziert, da die gesuchten Zielzellen die erforderliche Menge von 10^5 bis 10^6 Zellen durch eine hohe Begleitflora nicht komplettieren können (HILL et al. 1985, JAGOW und HILL 1988). Die Benutzung von Selektivagars und Selektivanreicherungen kann die Sensitivität des Hybridisierungsverfahren steigern (HILL et al. 1983, JAGOW und HILL 1986, NESBAKKEN 1991). Insofern besteht die Ursache in den negativen Befunden mittels Kultur und Hybridisierung vielleicht darin, dass, obwohl ein Selektivagar wie CIN gewählt wurde, die gewählte Voranreicherungslösung (modifizierte CASO-Bouillon, modifiziert = mit Gallesalzen) eventuell nicht selektiv genug war, obwohl Gallesalze als grampositive Keime hemmender Faktor zugesetzt wurde. Hierdurch wäre auch zu erklären, dass das Bakterienwachstum auf dem Selektivagar CIN beim Direktausstrich kein (Rohwurstproben) bis wenig (Rohfleischproben) Bakterienwachstum aufwies, aber nach der Anreicherung eine hohe Bakterienzahl zu verzeichnen war. Der Einsatz von selektiveren Medien könnte in fortführenden Studien eventuell zu einem größeren Erfolg der Kolonie-Hybridisierung und auch zu höheren Detektionsraten mit der Real-Time PCR Untersuchung führen.

Ein weiterer Grund für negative Hybridisierungsergebnisse könnte die Lagerung der Anreicherungslösung bei -20°C gewesen sein. Von 5 Proben konnte eine Kolonie-Hybridisierung nicht durchgeführt werden, da eine Anzucht der Bakterien aus der zurückgestellten (-20°C) Anreicherung nicht möglich war. Das Wachstum der Bakterien war auf den zur Hybridisierung gezüchteten Platten nach

Tiefkühlagerung deutlich geringer (ca. 0-50 Einzelkolonien) als auf den Ausstrichen nach Über-Nacht Anreicherung (ca. Einzelkolonien bis hin zu Bakterienrasen) vor dem Einfrieren der Anreicherungslösung. Die Bakterien sind vermutlich während der Lagerung zerstört worden. Da die Yersinien psychrotroph sind (HANNA et al. 1977, BERCOVIER und MOLLARET 1984), ist eine Lagerung bei Kühlschranktemperatur bis zum Untersuchungszeitpunkt in fortführenden Studien denkbar.

Alternativ kann die Lagerung im Tiefkühlschrank mit einer Inkubation in einer 10%igen Glycerin Lösung eruiert werden, da Glycerin für Zellkulturen zum Einfrieren verwendet wird. Das Glycerin verhindert die Eiskristallbildung während des Einfrierungsprozess, damit die Zellen durch die Kristallbildung nicht zerstört werden. In der Regel wird eine Glycerin-Konzentration von 10% eingesetzt. Dabei verwendet man häufig das übliche Kulturmedium, dem die 10%ige Glycerin-Lösung zugefügt wird (http://www.genaxxon.com/docs/pdf/glycerin_usage.pdf).

Was die Hybridisierungstechnik angeht, so wurde zwar in der Literatur über gute Erfolge mit dem Selektivagar CIN bei Hybridisierungsexperimenten berichtet (KAPPERUD et al. 1990, NESBAKKEN et al. 1991, GOVERDE et al. 1993), dennoch stellte sich der Selektivagar in den eigenen Untersuchungen als weniger geeignet dar, da die in dem Agar vorhandenen Farbstoffe durch die Waschvorgänge nicht gänzlich gelöst werden konnten. So könnte eine Verwechslung mit positiven Signalen durchaus möglich sein, obwohl die Signale der Positivkontrolle im Vergleich zu den blasseren Farbrückständen auf der Nylonmembran deutlich zu erkennen waren. Inwieweit eine Kombination einer Selektivanreicherung und eines weniger selektiven aber farblosen Agars oder der Kombination aus Selektivanreicherung und Selektivagar eine Verbesserung des Verfahrens darstellt, bleibt weiterführenden Studien vorbehalten.

Anhand von Einzelstudien (Tabelle 3) konnte ermittelt werden, dass die kulturellen Verfahren mit einer durchschnittlichen Nachweisgrenze von 10^3 - 10^5 KbE/g(ml) weniger sensibel sind als die PCR-Methode mit einer durchschnittlichen Nachweisgrenze von 10^2 KbE/g(ml) bzw. 10-30 KbE/g bei der Nested PCR ist. Die Real-Time PCR stellt mit einer durchschnittlichen Nachweisgrenze von 1-10 KbE/g(ml) mit Anreicherung das sensitivste Verfahren innerhalb der genannten

Methoden dar. In einer Studie konnten BOYAPALLE et al. (2001) zeigen, dass die Multiplex PCR bezogen auf künstlich kontaminierte Schweinefleischproben 10 mal sensitiver war als kulturelle Methoden, während die TaqMan Sonden Real-Time PCR 100 bis 1000 mal sensitiver war als die Multiplex PCR und 10000 mal sensitiver als die kulturelle Methode. Da die Kolonie-Hybridisierung an die Kultivierung von Bakterien auf Agarplatten gebunden ist, ist die Sensitivität, obwohl sich das Verfahren in eigenen und in der Literatur beschriebenen Verfahren (MILIOTIS et al. 1989, ROBINS-BROWNE et al. 1989, KAPPERUD et al. 1990) als sehr spezifisch darstellte, wie die kulturellen Verfahren bei einer Nachweisgrenze von etwa 10^3 - 10^5 KbE/g(ml) einzustufen.

14 Falsch positive, falsch negative Ergebnisse

Falsch positive Ergebnisse können während eines Real-Time PCR Laufes durch Kontamination während der Probenvorbereitung entstehen (SCHEU et al. 1998) und bei herkömmlichen PCR Durchläufen zusätzlich, wenn das PCR-Produkt zur weiteren Analyse in ein Gel zur Elektrophorese überführt (carry-over) wird. Die Real-Time PCR bietet hier den Vorteil, dass die Detektion positiver Ergebnisse bereits Online am Computerbildschirm ausgewertet werden kann und somit carry-over Kontaminationen verhindert werden (WILHELM und PINGOUD 2003, MC KILLIP und DRAKE 2004).

Um Kontaminationen, die während der Probenvorbereitung für eine PCR verursacht wurden, aufzuspüren, und eine erfolgreiche Amplifikation der PCR nachzuweisen, werden Kontrollen im PCR Lauf mitgeführt. Als Negativ-Kontrollen können zum einen sogenannte No-Template Kontrollen und/oder Extraktionskontrollen eingesetzt werden (SCHEU et al. 1998, MACKAY 2004). Bei der No-Template Kontrolle handelt es sich um ein Reaktionsgefäß, das mit dem Mastermix, nicht aber mit Template DNA befüllt ist. Sie enthält also alle Komponenten, die zur Amplifikation vorhandener DNA nötig sind. Falls die Mastermixkomponenten kontaminiert sind, würde die enthaltene DNA möglicherweise ein Signal bei der Auswertung hervorbringen und der kontaminierte Mastermix könnte detektiert werden. Eine No-Template Kontrolle wurde auch als Negativkontrolle in den eigenen Untersuchungen eingesetzt. Eine

Amplifikation durch in der Negativkontrolle enthaltene Kontaminations-DNA konnte in keinem der PCR Durchläufe beobachtet werden.

Von Extraktionskontrollen wird gesprochen, wenn ein Reaktionsgefäß mit allen Vorbereitungsschritten mitgeführt wird. Sie enthält alle Reagenzien bis auf positives Referenzmaterial (MACKAY 2004). Eine Extraktionskontrolle wurde für den Ansatz der PCR in den eigenen Untersuchungen aus folgenden Gründen nicht mitgeführt: Die während der PCR amplifizierten DNA-Fragmente produzieren individuelle Schmelzkurven (BUSTIN 2005, MC KILLIP und DRAKE 2004). Zum Vergleich der gesuchten Schmelzkurven wird eine Positivkontrolle mitgeführt, die die gereinigte DNA eines Referenzstammes enthält. Die vom Referenzstamm produzierte Schmelzkurve dient bei der Auswertung als Kontrolle für gesuchte positive Ergebnisse. Obwohl sich im Reaktionsansatz sequenzspezifische Primer befinden, die den Abschnitt des gesuchten Zielgenes amplifizieren, bindet SYBR[®]Green unspezifisch an doppelsträngige DNA (MÜLHARDT 2003b). Theoretisch ist also die Amplifikation eines unspezifischen Produktes und somit auch die unspezifische Bindung mit SYBR[®]Green möglich. Um die Spezifität des Amplifikates zu prüfen, müsste, unabhängig von der mitgeführten Extraktionskontrolle, das Amplifikat einer positiven Probe durch eine Restriktionsenzymanalyse, eine DNA-Sonde oder mit Sequenzierung bestätigt werden (THISTED LAMBERTZ et al. 2007). Obwohl das SYBR[®]Green Verfahren nicht so spezifisch ist wie das *aiP*-Sondenverfahren, da SYBR[®]Green unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, eignet es sich dennoch als kostengünstiges Screeningverfahren (BUSTIN 2005), sodass negative Proben im Vorfeld des teureren Sondenprogramms selektiert werden können. Zur Bestätigung sollten aber alle positiven Proben mit dem sequenzspezifischen Sonden Real-Time PCR Programm bestätigt werden, wie es in den eigenen Untersuchungen und von HARTMANN (2006) durchgeführt wurde. Die Spezifität der in der Untersuchung eingesetzten Primer wurde durch NAKAJIMA et al. (1992) getestet und in weiteren Untersuchungen von HARTMANN (2006) und FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2007) bestätigt. Zudem stellt das *ail*-Gen eine verlässlicheres Zielgen als plasmidale Faktoren dar, da das Plasmid während Subkultivierungsvorgängen verloren gehen kann (ZINK et al. 1980, PORTNOY et

al. 1981b, PORTNOY and FALKOW 1981a, SCHIEMANN 1989, WREN und TABAQCHALI 1990).

Die von toten Zellen extrahierte DNA kann ebenfalls zu falsch positiven Ergebnissen führen. Allerdings führt eine Anreicherung vor der PCR zu einer Vermehrung von lebenden Zellen, sodass die DNA-Menge von lebenden Zellen die von toten Zellen extrahierte DNA-Menge deutlich übersteigt (WOLFFS et al. 2005, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2007). Zum anderen sind nach Untersuchungen von FREDRIKSSON-AHOMAA (2007) mit Reinkulturen Ausgangsmengen von 10^3 - 10^4 KbE/ml nötig, um ein positives Signal mit der PCR zu generieren. Das heißt, wenn sich in den eigenen Untersuchungen in der Ausgangsprobe tote Zellen befunden haben, muss die Anzahl der ehemals lebenden Zellen auch mindestens 10^3 - 10^4 KbE/ml betragen haben, damit ein positives PCR Signal produziert wurde. Selbst wenn die Zellen tot sind, handelt es sich in Anbetracht der geforderten Keimzahl für ein positives PCR-Signal um ein hygienisches Problem in der Lebensmittelverarbeitungskette. Obwohl die Zellen möglicherweise eingegangen sind, muss bei *Y. enterocolitica* aufgrund ihrer Eigenschaft, bei Kühlschranktemperaturen überleben und wachsen zu können (HANNA et al. 1977, BERCOVIER und MOLLARET 1984), von einer potentiellen Gefahr der Lebensmittelinfektion ausgegangen werden.

Falsch negative Ergebnisse können durch eine zu geringe Anzahl an Krankheitserregern in der Probe, eine hohe Begleitflora, Inhibitoren der DNA-Polymerase, eingeschleppte Nukleasen, die die Zielsequenz verdauen, Inhibitoren der untersuchten Probe selbst und Bestandteile von Anreicherungs-lösungen wie z. B. Galle-salze produziert werden (ROSSEN et al. 1992, SCHEU et al. 1998). Der in den eigenen Versuchen eingesetzten Anreicherungs-lösung (CASO-Bouillon) wurden Galle-salze zugefügt, die nach Literaturangaben auf die PCR inhibitorisch wirken können (SCHEU et al. 1998). Negative Ergebnisse der eigenen Untersuchungen könnten durch Inhibition der PCR durch diese Galle-salze entstanden sein. Möglich ist auch, dass in den untersuchten Proben zu Beginn der Anreicherung geringgradig pathogene *Y. enterocolitica* vorhanden war, aber durch das wenig selektive Anreicherungs-medium das Wachstum durch eine hohe Begleitflora gehemmt wurde (KAPPERUD et al. 1993). Selektivere Medien können

eine hohe Begleitflora besser hemmen, allerdings können Selektivmedien die PCR inhibieren, so berichteten LANTZ et al. (1998) über die Inhibition der PCR durch das Selektivmedium ITC. Alternativ steht ein Medium von KNUTSSON et al. (2002) für eine Real-Time PCR zur Verfügung. Allerdings ist das Medium nicht kommerziell erhältlich und die Herstellung mit höherem Aufwand verbunden. Weiterhin berichten neuere Studien über die erfolgreiche Anwendung von Probenvorbereitungsmethoden, die PCR Inhibitoren von der Probe abtrennen und tote Zellen entfernen können. So konnten WOLFFS et al. (2004) die Flotationsmethode erfolgreich bei der Probenvorbereitung einsetzen.

Grundsätzlich empfiehlt sich die Mitführung einer internen Amplifikationskontrolle zur Vermeidung falsch negativer Ergebnisse (MALORNY et al. 2003, MACKAY 2004, THISTED LAMBERTZ et al. 2007). Zudem werden interne Amplifikationskontrollen in amtlichen Untersuchungsmethoden vorgeschrieben. So ist in der Amtlichen Methode L07.18-1 (N.N. 2002) nach § 64 LFGB zur Untersuchung auf *E. coli* mittels PCR und DNA-Hybridisierung in Lebensmitteln eine interne Amplifikationskontrolle des Typs pUC 19 in jedem Reaktionsansatz mitzuführen. Die Etablierung einer internen Amplifikationskontrolle zur Vermeidung falsch-negativer Ergebnisse steht für die verwendete Real-Time PCR noch aus.

ZUSAMMENFASSUNG

In der Zeit von März 2006 bis Februar 2007 wurden am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München 479 unterschiedliche Rohfleischprodukte vom Schwein, Rind und Geflügel auf die Prävalenz von pathogener *Y. enterocolitica* untersucht. Die Untersuchung beinhaltete sowohl frische Proben als auch Material, das auf Mindesthaltbarkeit im Routinelabor geprüft wurde.

Zum Einsatz kam eine bereits entwickelte Real-Time PCR Methode, die in vorangegangenen Studien mit Schweineproben evaluiert worden war. Das Untersuchungsspektrum dieser Methode wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Tierarten Rind und Geflügel erweitert. Zur Bestätigung der aus der Real-Time PCR generierten positiven Proben wurde parallel ein Kolonie-Hybridisierungsverfahren etabliert. Beide Verfahren wurden mit einer kulturellen Nachweismethode verglichen.

Ein Nachweis von pathogener *Y. enterocolitica* gelang bei 14 Rohfleischproben (4,1%). Davon waren 2 Hackfleischproben (3,6%) und 12 Fleischstück-Proben (4,2%) positiv. Bei den untersuchten Tierarten konnten 13 positive Proben beim Schwein (6,0%) gefunden werden und beim Geflügel war eine Probe (0,9%) positiv. Innerhalb der rohen Rindfleischproben und der Rohwurstproben konnten keine positiven Proben detektiert werden.

Die Real-Time PCR stellte sich mit 14 positiven Proben als das sensitivste Verfahren dar. Sowohl mit der Kolonie-Hybridisierung als auch mit der kulturellen Untersuchung konnte keine pathogene *Y. enterocolitica* detektiert und isoliert werden.

Aus den eigenen Untersuchungen geht hervor, dass das Schwein nach wie vor als potentielle Quelle für *Y. enterocolitica* verursachte Lebensmittelinfektionen anzusehen ist. Aufgrund der Kreuzkontamination kann es innerhalb der Verarbeitungskette auch zur Übertragung von pathogener *Y. enterocolitica* auf das Fleisch weiterer Tierarten wie Rind und Geflügel kommen, sodass durch

diese Lebensmittelprodukte auch eine Infektion verursacht werden kann. Rindfleisch scheint in Bayern keine Quelle für humane Yersinioseerkrankungen zu sein, wohingegen Geflügelfleisch aufgrund eigener Untersuchungen eine Infektionsquelle darstellt. Inwieweit der Nachweis von pathogener *Y. enterocolitica* bei Geflügelfleischproben mit modernen Untersuchungsverfahren regelmäßig geführt werden kann, bleibt weiterführenden Studien vorbehalten.

SUMMARY

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in raw meat and raw products from cattle, swine and poultry with modern molecularbiological methods

Between March 2006 till February 2007, 479 different raw meat products from cattle, swine and poultry were investigated on the prevalence of pathogenic *Y. enterocolitica*. Fresh samples as well as expiration-date samples were integrated into the analysis.

An already developed real-time PCR method, that had been evaluated with pork products in earlier studies, was applied in the present study. The research spectrum of the real-time PCR has been extended on the species cattle and poultry. The positive samples of the real-time PCR method were confirmed by colony hybridization, which was developed in this study. Both methods were compared to a cultural proceeding.

In 14 raw meat samples (4,1%) a detection of pathogenic *Y. enterocolitica* was possible. Two of them were minced meat samples (3,6%) and 12 were meat samples (4,2%). Within the investigated species 13 positive pork samples (6,0%) and one positive poultry sample (0,9%) were detected. Within the beef and raw sausage samples no positive result was observed.

With 14 positive samples, the real-time PCR proved to be the most sensitive method. Neither colony hybridization nor cultural proceeding was able to detect and isolate pathogenic *Y. enterocolitica*.

According to the presented test results, swine is a potential source for *Y. enterocolitica* mediated food poisoning infections. Due to a possible crosscontamination during processing, pathogenic *Y. enterocolitica* can also be transferred to beef and poultry meat. Therefore the meat of the species cattle and poultry can be an important source of infection as well. In Bavaria, beef does not

play an important role in the pathogenesis of human yersiniosis, poultry meat, however, has to be considered as a possible source. Whether a regular detection of pathogenic *Y. enterocolitica* in poultry samples can be conducted with modern molecularbiological methods, will have to be determined by future studies.

ANHANG**15 Arbeitsmaterial und Geräte****15.1 Mikrobiologischer Nachweis****Flüssige Medien****modifizierte-TSB-Nährbouillon**

(Tryptic Soy-Broth/Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon plus Gallesalze, Amtliche Sammlung L06.00-44 Sept. 1998, §64 LFGB)

Caseinpepton-Sojamehl-Pepton-Lösung (Merck, 1.05459.0500)	30 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml
Gallesalz (Bile Salt No.3, Oxoid LP0056)	1,5 g pro 1000 ml
- Mischen und ggf. zum Lösen erhitzen	
- je 225 ml in Erlenmeyerkolben abfüllen	
- Sterilisieren 15 Min bei +121 °C	

BHI-Nährbouillon (Hirn-Herz-Glucose-Bouillon)

BHI Bouillon (Oxoid, CM 225)	37 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml
- Mischen und ggf. zum Lösen erhitzen	
- benötigte Menge in Reagenzgläser abfüllen	
- Sterilisieren 15 Min bei +121 °C	

Peptonwasser mit Agar

Pepton aus Fleisch pankreatisch verdaut (Merck 1.07214.1000)	1 g
Natriumchlorid (Merck 1.06404.1000)	8,5 g
Agar technical (Agar No.3, Oxoid L13)	0,75 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

- Mischen und ggf. zum Lösen erhitzen
- je 9 ml in Reagenzgläser abfüllen
- Sterilisieren 15 Min bei +121 °C

Peptonwasser ohne Agar

Pepton aus Fleisch pankreatisch verdaut (Merck 1.07214.1000)	1 g
Natriumchlorid (Merck 1.06404.1000)	8,5 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

- Mischen und ggf. zum Lösen erhitzen
- je 9 ml in Reagenzgläser abfüllen
- Sterilisieren 15 Min bei +121 °C

Feste Medien

CIN-Agar

(Cefsulodin-Irgasan™-Novobiocin-Agar)

Basismedium:

<i>Yersinia</i> Agar Basis (Merck 1.16434.0500)	58,5 g
Destilliertes Wasser	1000 ml

- Zum Lösen erhitzen
- Sterilisieren 15 Min bei +121 °C

zugeführtes Supplement:

Yersinia Selektivsupplement (zur Isolierung von *Yersinia*-Spezies)
(Merck, 1.16466.0001), pro 500 ml 1 Flasche Supplement

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

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

TSA-Agar

(Tryptic soy agar/CASO-Agar)

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CASO-Agar)

(Merck, 1.05458.0500)	40 g
Destilliertes Wasser	1000 ml

- Zum Lösen erhitzen
- Sterilisieren 15 Min bei +121 °C

UREA-Agar

Basismedium.

Harnstoff-Pepton-Agar-Basis nach Christensen

(Oxoid, CM 53)	2,4 g
Destilliertes Wasser	95 ml

- Zum Lösen erhitzen
- Sterilisieren 15 Min bei +121 °C

zugeführte Lösung

Harnstoff-Lösung 40 % (Oxoid, SR 0020K)	5 ml
---	------

- Je 5 ml in sterile Reagenzglasröhrchen abfüllen
- Zum Trocknen schräg lagern

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

Mc Farland Standard 0,5 bioMérieux

Aufbewahrungsmedien für identifizierte Reinkulturen

Mikrobank

Microbank® (PRO-LAB DIAGNOSTICS, PL 160)

15.2 Real-Time PCR

Reagenzien zur Probenvorbereitung

BioRad InstaGene™ Matrix BIORAD

Reagenzien für die Real-Time PCR

- iQ™ SYBR® Green Supermix	BIORAD
- iQ™ Supermix	BIORAD
- Wasser, Molecular Biology Grade	EPPENDORF
- Sonde ailP	EMBL
- Primer (nach NAKAJIMA et al., 1992)	MWG Biotech AG
AIL 1_forward	
5' ACT CGA TGA TAA CTG GGG AG-3'	

AIL2_reverse

5' CCC CCA GTA ATC CAT AAA GG-3'

Geräte und Hilfsmittel

Thermocycler

- iCycler IQ[®] BIORAD
- iQ[™]5 Multicolor Real-Time Detection System BIORAD

Stromversorgung

- PowerPac basis[™] BIORAD

PCR-Tubes

- 0,2 ml Thin Wall Tubes BIORAD
- 200 µl Thin Wall Cap Strips BIORAD
- PCR Plate, 96 well BIORAD
- Optical tape BIORAD

Parafilm[®] M 4"x250' american CAN COMPANY

15.3 Kolonie-Hybridisierung

Reagenzien zur Templatevorbereitung

BioRad InstaGene[™] Matrix BIORAD

Reagenzien für PCR -DIG-Labeling der Sonde

- Primer (nach NAKAJIMA et al., 1992) MWG Biotech AG
- AIL 1_forward, 5' ACT CGA TGA TAA CTG GGG AG-3'
- AIL2_reverse, 5' CCC CCA GTA ATC CAT AAA GG-3'
- PCR DIG Probe Synthesis Kit ROCHE
- Wasser, Molecular Biology Grade EPPENDORF

Reagenzien für Mini-Gel

- Wasser, Molecular Biology Grade EPPENDORF
- EZ Load™ 100 bp Molecular Rulers BIORAD
- Sample Acid Loading buffer BIORAD
- Certified Molecular Biology Agarose BIORAD
- 10x Tris/Boric Acid/EDTA Buffer BIORAD
- Ethidiumbromid Solution 10 mg/ml BIORAD

Flüssige Medien für Hybridisierung

- Ethanol Rotipuran® ≥ 99,8%, p.a. CARL ROTH GMBH
- Maleinsäure ≥ 99%, Ph.Eur., BP CARL ROTH GMBH
- Natriumacetat ≥ 99%, p.a., ACS, wasserfrei CARL ROTH GMBH
- Natriumchlorid ≥ 99,5%, p.a., ACS, ISO CARL ROTH GMBH
- NaCl – M 58,44 g/mol; 500 g CARL ROTH GMBH
- Natriumhydroxyd ≥ 98%, Ph.Eur., USP, BP CARL ROTH GMBH
- NaOH – M 40,00 g/mol; 500 g CARL ROTH GMBH
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ≥ 99%, p.a., ACS CARL ROTH GMBH
- SDS (Rotistock 20% SDS) – ready – to-use
20% stock solution steril filtriert; 1 Liter CARL ROTH GMBH
- TE Puffer (Roti®stock 100x TE) – ready-to-use
100fold TE stock solution dampfsterilisiert; 1 Liter CARL ROTH GMBH
- TRIS PUFFERAN® ≥99,9%, p.a. CARL ROTH GMBH
- Triton 100x, reinst CARL ROTH GMBH
- Tween® 20, Ph.Eur. CARL ROTH GMBH
- HCL 1 mol/L J.T. BAKER
- Proteinase K QIAGEN

- DIG Easy Hyb Hybridisierungslösung – ready to use ROCHE
- DIG Wash and Block Buffer Set ROCHE
- NBT/BCIP ready-to-use tablets für Färbelösung ROCHE
- DIG Nucleic Acid Detection Kit ROCHE

Herstellung der Lösungen für die Koloniehybridisierung

Denaturierungslösung

0.5 M NaOH 1 M 40 g/mol ⇒ 20 g/L

1.5 M NaCl 1 M 58,44 g/mol ⇒ 87,66 g/L

Neutralisierungslösung **ph 7,5**

1 M Tris 1 M 121,14 g/mol ⇒ 121,14 g/L

0.3 M tri-Natriumcitrat 1 M 294,10 g/mol ⇒ 88,23 g/L

20x SSC **ph 7,0**

3 M NaCl 1 M 58,44 g/mol ⇒ 175,32 g/L

0.3 M tri-Natriumcitrat 1 M 294,10 g/mol ⇒ 88,23 g/L

2x SSC

1:10 Verdünnung von 20 x SSC:

100 ml 20x SSC

900 ml Aqua bidest

2x SSC/ 0,1% SDS (low stringency buffer)

100 ml 20x SSC

5 ml 20% SDS

895 ml Aqua bidest

0,5x SSC/ 0,1% SDS (high stringency buffer)

25 ml 20x SSC

5 ml 20% SDS

970 Aqua bidest

0.2% Triton 100x/ 0.5 M NaOH

Triton 100x ⇒ 2 ml/L

NaOH ⇒ 20 g/L

Herstellung der Lösungen für Färbereaktion

Die Flaschen Nr. 1 bis 4 des DIG Wash and Block Buffer Sets stellen Stammlösungen dar, die vor Gebrauch verdünnt werden müssen.

Waschpuffer Stammlösung (10x)/ Flasche Nr. 1

Vor Gebrauch kräftig schütteln!

Mit doppelt destilliertem H₂O (ddH₂O) 1:10 verdünnen, so dass 1x Lösung entsteht. Bei +15 bis +25 °C haltbar

⇒ abwaschen der unspezifisch gebundenen Antikörper

Waschpuffer selber herstellen: ph 7,5 bei +20 °C

0.1 M Maleinsäure	1 M 116,07 g/mol	⇒ 11,6 g/L
0.15 M NaCl	1 M 58,55 g/mol	⇒ 8,76 g/L
0.3% (v/v) Tween 20	0,3 g/100 ml	⇒ 3 g/L

Maleinsäurepuffer Stammlösung (10x)/ Flasche Nr.2

Flasche Nr.2 mit ddH₂O 1:10 verdünnen, so dass 1x Lösung entsteht.

Bei +15 bis +25 °C haltbar

⇒ zur Verdünnung der Blocking solution

Puffer Nr. 2 (Maleinsäurepuffer) – selbst hergestellt:

0.1 M Maleinsäure	1 M 116,07 g/mol	⇒ 11,6 g/L
0.15 M NaCl	1 M 58,55 g/mol	⇒ 8,76 g/L

ph mit NaOH Plätzchen auf ph 7,5 einstellen, bei +15 bis +25 °C haltbar

Blocking solution Stammlösung (10x)/ Flasche Nr. 3

Vor Gebrauch kräftig schütteln!

Flasche Nr. 3 mit 1x Verdünnung des Maleinsäurepuffer 1:10 verdünnen, so dass 1x Lösung entsteht. Gleich in 100 ml Portionen aufteilen, bei -20 °C aufheben bzw. immer frisch herstellen

⇒ Verhindern von unspezifischen Bindungen

⇒ Sichtbarmachen der Antikörperbindung

TE Puffer pH 8,0 bei +20°C

Aus fertiger Lösung (Roti[®] stock 100x TE) 1:100 Verdünnung herstellen

IST	SOLL/Liter
1.0 M Tris	10 mM Tris
0.1 M EDTA	1 mM EDTA

⇒ 10 ml Puffer mit 990 ml ddH₂O verdünnen.

Geräte und Hilfsmittel

Bio Photometer 6131	EPPENDORF
UVette[®]	EPPENDORF
Thermocycler	
-iCycler	BIORAD
Elektrophorese-Kammern	
- MINI-Sub Cell GT	BIORAD
Stromversorgung	
- PowerPac basis [™]	BIORAD
Gel-Dokumentationssystem	
- UV-Kammer	BIORAD
mit integrierter Kamera Gel-Doc 1000	
Aqua bidest Bereiter	
- Fistream [™] Cyclon [™]	FISONS PLC
Mikrowelle	micromaxx [®]

PCR-Tubes

- 0,2 ml Thin Wall Tubes BIORAD
- 200 µl Thin Wall Cap Strips BIORAD

Hybridisierungsgläser

- GL 45, Max. Temp. 140°C,
(Roller-Bottles) SCHOTT

Hybridisierungsofen

- Hybridizer HB-100 UVP

Whatman Filterpapier

- Gel Blotting Papier 460 x 570 mm CARL ROTH GMBH

Nylonmembran

- Biodyne[®] Plus 0,45 µl, 82 mm PALL

Plastikschalen

- melamin[®], 13 x 25 x 6 cm, 21 x 32 x 3 cm ZEFA

Blue Max[™]

- Polypropylene conical tubes, 50 ml BECTON DICKINSON

Plastikösen, steril

GREINER-BIO-ONE

Plastikbeutel

- Vernichtungsbeutel 200 x 300 ml LABORSERVICE

Schüttler

- KM2 EDMUND BÜHLER LABOR-
TECHNIK

15.4 Allgemeine Materialien

Waagen

- Analysenwaage CP3202S-OCE SARTORIUS
- Analysenwaage AC210S SARTORIUS

Magnetrührer mit Heizplatte

- Magnetrührwerk MR 2002 HEIDOLPH
- Typ RCT Janke und Kunkel IKA LABORTECHNIK
- Magnetrührer H+P

Pipetten

- Research 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl EPPENDORF

Pipettenspitzen

- 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

Dispensette 2-10 ml

BRAND

Reagenzgläser 160 x 16 mm

SCHOTT

Reagenzglas-Schüttelgerät

JANKE & KUNKEL

Wattestopfen

- STERI-Wattestopfen Nr. 14 SCHUBERT

Messzylinder 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml

BRAND

Aufbewahrungsgefäße

- Erlenmeyerkolben 250 ml, 2000 ml, 3000 ml, 5000 ml JENAER GLAS

- 1000 ml, GL 45

SCHOTT

Aludeckel

- Aludeckel Ø 8 cm

MERCK

- Aludeckel Ø 10 cm

MERCK

- Aludeckel Ø 13 cm

MERCK

Petrischalen (steril)

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 Bag Mixer[®]

INTERSCIENCE

Kühlgeräte

- Kühl-Gefrier-Kombination Typ "Premium"

LIEBHERR

- Deep Freezer nunc[™]

ILSHIN LAB. CO., LTD

Brutschränke

- Typ B 6060, Typ B 6200

HERAEUS INSTRUMENTS

Autoklav

- Hochdruckdampf-Sterilisator Typ 112 KSG STERILISATOREN

Sterilisator

- SLM 500 MEMMERT

Sterilbank

- HeraSafe KENDRO

Mikrobank

- Mikrobank TM Product Code PL 160 PRO-LAB
DIAGNOSTICS

Zentrifugen

- 5415D EPPENDORF

Heizblöcke

- Thermomixer comfort EPPENDORF

- Thermostat plus EPPENDORF

pH-Meter

- pH 535 Multical mit Temperaturabgleich WTW

Filter

- Sterilfilter Einmal Filterhalter 0,2 µm ELL
SCHLEICHER & SCHUELL

16 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse

Tierart: SCHWEIN

Probe	Probe Nr.	Kultur		Real-Time PCR		CT-Wert		Kolonie Blot
		D	ÜN	SYBR Green	aiIP-Sonde	SYBR Green	aiIP-Sonde	aiI-Sonde
<i>Muskelfleisch</i>								
Bio Lende	13	-	-	+	-	34,5	> 40	
Rohmaterial für Hackfleisch	31	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	33	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	36	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	38	-	-	+	+	34,4	38	n.d.
Rohmaterial für Hackfleisch	78	-	-	+	+	28,7	32	n.d.
Rohmaterial für Hackfleisch	83	-	-	+	+	30,4	35	-
Rohmaterial für Hackfleisch	109	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	111	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	114	-	-	+	-	32	> 40	
Rohmaterial für Hackfleisch	126	-	-	+	+	30,1	35	n.d.
Rohmaterial für Hackfleisch	128	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	130	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	132	-	-	+	+	29,4	33	n.d.
Hals ohne Knochen	133	-	-	-				
Hals ohne Knochen	134	-	-	-				
Rücken/Lachs	135	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	136	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	140	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	141	-	-	-				
Hals/Rücken	144	-	-	-				
Hals/Rücken	145	-	-	-				
Lachse	174	-	-	-				
Hals ohne Knochen	175	-	-	-				
Lachse/Rücken	186	-	-	-				
Lachs/Rücken	187	-	-	-				
Hals ohne Knochen	201	-	-	-				
Lachse/Rücken	224	-	-	-				
Lachse/Rücken	225	-	-	-				
Hals ohne Knochen	226	-	-	+	+	29,1	34	-
Hals ohne Knochen	227	-	-	+	+	27,6	32	n.d.
Rohmaterial für Hackfleisch	290	-	-	-				
Hals ohne Knochen	306	-	-	-				
Muskelfleisch	332	-	-	-				
Hals	353	-	-	-				
Hals	354	-	-	-				
Lachs	355	-	-	-				
Lachs	356	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	357	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	358	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	359	-	-	-				
Halssteak, Argentinien	369	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	373	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	374	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	375	-	-	-				
Nuss	377	-	-	-				

ANHANG

Probe	Probe Nr.	Kultur		Real-Time PCR		CT-Wert		Kolonie Blot
		D	ÜN	SYBR Green	aiIP-Sonde	SYBR Green	aiIP-Sonde	aiI-Sonde
Muskelfleisch								
Rohmaterial für Hackfleisch	382	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	398	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	399	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	400	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	401	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	402	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	405	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	406	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	407	-	-	+	+	31,7	34	-
Rohmaterial für Hackfleisch	408	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	409	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	410	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	411	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	412	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	413	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	414	-	-	-				
Hals/Lachse/Schulter	422	-	-	-				
Hals/Lachse/Schulter	423	-	-	-				
Hals/Lachse/Schulter	424	-	-	-				
Hals/Lachse/Schulter	425	-	-	-				
Hals/Lachse/Schulter	426	-	-	-				
Hals/Lachse/Schulter	427	-	-	-				
Hals/Lachse/Schulter	428	-	-	-				
Hals/Lachse/Schulter	429	-	-	-				
Hals/Lachse/Schulter	430	-	-	-				
Hals/Lachse/Schulter	431	-	-	-				
Hals/Lachse/Schulter	432	-	-	-				
Hals/Lachse/Schulter	433	-	-	-				
Hals/Lachse/Schulter	434	-	-	-				
Hals/Lachse/Schulter	435	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	438	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	439	-	-	-				
Lachse/Hals	441	-	-	+	+	30,5	36	-
Lachse/Hals/Schulter	443	-	-	-				
Lachse/Hals/Schulter	444	-	-	-				
Lachse/Hals/Schulter	445	-	-	-				
Lachse/Hals/Schulter	446	-	-	-				
Lachse/Hals/Schulter	447	-	-	-				
Lachse/Hals/Schulter	448	-	-	-				
Schulter	449	-	-	-				
Schulter	450	-	-	-				
Schulter	451	-	-	-				
Schulter	452	-	-	-				
Schulter	453	-	-	-				
Schulter	454	-	-	-				
Schulter	455	-	-	-				

Probe	Probe Nr.	Kultur		Real-Time PCR		CT-Wert		Kolonie Blot
		D	ÜN	SYBR Green	aiIP-Sonde	SYBR Green	aiIP-Sonde	aiI-Sonde
<i>Muskelfleisch</i>								
Schulter	456	-	-	-				
Schulter	457	-	-	-				
Schulter	458	-	-	-				
Schulter	459	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	437	-	-	-				
Schulter	460	-	-	-				
Schulter	461	-	-	-				
Schulter	462	-	-	-				
Schulter	463	-	-	-				
Hals, Paprikamarinade	341	-	-	-				
Hals, Kräutermarinade	342	-	-	-				
Hals, Kräutermarinade	343	-	-	-				
Hals, Paprikamarinade	349	-	-	-				
Hals, Paprikamarinade	350	-	-	-				
Rücken, Paprikamarinade	351	-	-	+	+	33,9	37	-
Hals, Paprikamarinade	352	-	-	+	+	30,4	35	-
Nacken, Paprikamarinade	367	-	-	-				
<i>Hackfleisch</i>								
Bio Hackfleisch	142	-	-	-				
Bio Hackfleisch	257	-	-	-				
Bio Hackfleisch	403	-	-	-				
Bio Hackfleisch	404	-	-	-				
Bio Hackfleisch	96	-	-	-				
Bio Hackfleisch	97	-	-	-				
Hackfleisch	29	-	-	-				
Hackfleisch	34	-	-	-				
Hackfleisch	37	-	-	-				
Hackfleisch	40	-	-	-				
Bio Hackfleisch	28	-	-	-				
Bio Hackfleisch	64	-	-	-				
Bio Hackfleisch	65	-	-	-				
Hackfleisch	79	-	-	-				
Hackfleisch	82	-	-	+	+	28,3	33	-
Hackfleisch	110	-	-	-				
Hackfleisch	112	-	-	-				
Hackfleisch	113	-	-	-				
Bio Hackfleisch	124	-	-	-				
Hackfleisch	127	-	-	-				
Hackfleisch	129	-	-	-				
Hackfleisch	131	-	-	-				
Hackfleisch	137	-	-	-				
Bio Hackfleisch	151	-	-	-				
Bio Hackfleisch	200	-	-	-				
Bio Hackfleisch	230	-	-	+	-	35,1	> 40	

ANHANG

Probe	Probe Nr.	Kultur		Real-Time PCR		CT-Wert		Kolonie Blot
		D	ÜN	SYBR Green	aiIP-Sonde	SYBR Green	aiIP-Sonde	aiI-Sonde
<i>Hackfleisch</i>								
Bio Hackfleisch	254	-	-	-				
Bio Hackfleisch	259	-	-	-				
Bio Hackfleisch	262	-	-	+	+	32,3	37	-
Bio Hackfleisch	287	-	-	-				
Hackfleisch	288	-	-	-				
<i>Rohwurst</i>								
Wildschweinwurst	1	-	-	-				
Katenbauch	9	-	-	-				
Katenbauch	10	-	-	-				
Bavarian Ham	11	-	-	-				
Bio Mettwurst	12	-	-	-				
Bio Mettwurst	14	-	-	-				
Bio Mettwurst/klein	20	-	-	-				
Bio Wacholderschinken	25	-	-	-				
Pfeffersäckchen	51	-	-	-				
Öko-Bauernknacker	57	-	-	-				
Öko-Knoblauchstangerl	58	-	-	-				
Öko-Pusztastangerl	59	-	-	-				
Bavarian Ham	66	-	-	-				
Schwarzwälder Schinken	100	-	-	-				
Bavarian Ham	117	-	-	-				
Salami Milano Spitzenqualität	138	-	-	-				
Salami Spianata Romana	139	-	-	-				
Mettwurst fein	146	-	-	-				
Mettwurst mittelgrob	147	-	-	-	> 40	> 40		
Pfeffersäckchen	148	-	-	-				
Cabanossi	157	-	-	-				
Südtiroler Markenspeck	158	-	-	-				
Schwarzwälder Schinken	159	-	-	-				
luftgetrocknete Minisalami	160	-	-	-				
luftgetrocknete Minisalami	161	-	-	-				
luftgetrocknete Minisalami	162	-	-	-				
Mini Salami	163	-	-	-				
Mini Salami, Light	165	-	-	-				
Mini Salami, Pikant	166	-	-	-				
Chorizo Paprikasalami	167	-	-	-				
Salami pur pork	168	-	-	-				
Chorizo Paprikasalami	169	-	-	-				
Debrecziner	170	-	-	-				
Edel Salami	176	-	-	-				
Paprika Salami	177	-	-	-				
Braunschweige Mettwurst	178	-	-	-				
Paprika Snacki, Art Mettwurst	179	-	-	-				
Schinken Pfeffer Snacki	180	-	-	-				
Brotzeit Snacki, Art Mettwurst	181	-	-	-				
Salami Milano	182	-	-	-				

Probe	Probe Nr.	Kultur		Real-Time PCR		CT-Wert		Kolonie Blot
		D	ÜN	SYBR Green	aiIP-Sonde	SYBR Green	aiIP-Sonde	aiI-Sonde
Salami Emiliano	183	-	-	-				
Samali Abruzze	184	-	-	-				
Salami Napoli	185	-	-	-				
Mettwurst fein	190	-	-	-				
Mettwurst fein	191	-	-	-				
Mettwurst mittelgrob	192	-	-	-	-	37	> 40	
Mettwurst mittelgrob	193	-	-	-				
Pfeffersäckchen	194	-	-	-				
Pfeffersäckchen	195	-	-	-				
Bio Mettwurst	206	-	-	-				
Bio Hüttenschinken	216	-	-	-				
Bauernschinken	218	-	-	-				
Bio Mettwurst	219	-	-	-				
Salami ungarisch	231	-	-	-				
Salami ungarisch, Paprika	232	-	-	-				
Katenbauch	233	-	-	-				
Bayerisches Wammerl	234	-	-	-				
Haussalami	19	-	-	-				
Öko-Paprikasalami	53	-	-	-				
Öko-Bauernsalami	55	-	-	-				
Öko-Bierstangerl	56	-	-	-				
Kantsalami	98	-	-	-				
Cabanossi	119	-	-	-				
Emmentaler Cabanossi	120	-	-	-				
Cabanossi	152	-	-	-	-	> 40	> 40	
Emmentaler Cabanossi	154	-	-	-				
Kantwurst	155	-	-	-				
Haussalami	202	-	-	-				
Mettwurst grob	205	-	-	-				
Emmentaler Cabanossi	207	-	-	-				
Pfeffersalami	210	-	-	-				
Mettwurst	213	-	-	-				
Brotzeit Salami	214	-	-	-				
Mettwurst fein	217	-	-	-				
Pfefferbeisser	305	-	-	-				

ANHANG

Tierart: RIND

Probe	Probe Nr.	Kultur		Real-Time PCR		CT-Wert		Kolonie Blot
		D	ÜN	SYBR Green	ailP-Sonde	SYBR Green	ailP-Sonde	ail-Sonde
<i>Muskelfleisch</i>								
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	2	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	3	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	4	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	5	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	6	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	7	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	8	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	30	-	-	+	-	35,1	> 40	
Rohmaterial für Hackfleisch	32	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	35	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	39	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	41	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	42	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	43	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	44	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	45	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	46	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	47	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	48	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	49	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	67	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	68	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	69	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	70	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	71	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	72	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	73	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	74	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	75	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	76	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	77	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	80	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	81	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	84	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	87	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	89	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	90	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	91	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	101	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	102	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	103	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	104	-	-	+	-	32	> 40	
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	105	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	106	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	107	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	108	-	-	-				

ANHANG

Probe	Probe Nr.	Kultur		Real-Time PCR		CT-Wert		Kolonie Blot
		D	ÜN	SYBR Green	ailP-Sonde	SYBR Green	ailP-Sonde	ail-Sonde
<i>Muskelfleisch</i>								
Rohmaterial für Hackfleisch	115	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	121	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	122	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	123	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	171	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	172	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	173	-	-	-				
Rinderbrust	204	-	-	-				
Rohmaterial für Hackfleisch	289	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	291	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	292	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	293	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	294	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	295	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	296	-	-	-				
Halszwischenmuskel	297	-	-	-				
Halszwischenmuskel	298	-	-	-				
Halszwischenmuskel	299	-	-	-				
Suppenfleisch	309	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	310	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	311	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	312	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	313	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	314	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	315	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	316	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	317	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	318	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	319	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	320	-	-	-				
Vorder-/hinterviertel, Ausschnitt	321	-	-	-				
<i>Hackfleisch</i>								
Bio Hackfleisch	329	-	-	-				
Bio Hackfleisch	26	-	-	-				
Hackfleisch	50	-	-	-				
Bio Hackfleisch	61	-	-	-				
Bio Hackfleisch	62	-	-	-				
Hackfleisch	85	-	-	-				
Hackfleisch	86	-	-	-				
Hackfleisch	92	-	-	-				
Bio Hackfleisch	93	-	-	-				
Bio Hackfleisch	95	-	-	-				
Hackfleisch	116	-	-	-				
Hackfleisch	125	-	-	-				
Bio Hackfleisch	149	-	-	+	-	36	> 40	
Bio Hackfleisch	197	-	-	-				

Probe	Probe Nr.	Kultur		Real-Time PCR		CT-Wert		Kolonie Blot
		D	ÜN	SYBR Green	ailP-Sonde	SYBR Green	ailP-Sonde	ail-Sonde
<i>Hackfleisch</i>								
Bio Hackfleisch	199	-	-	-				
Bio Hackfleisch	229	-	-	-				
Bio Hackfleisch	255	-	-	-				
Bio Hackfleisch	260	-	-	-				
Bio Hackfleisch	261	-	-	-				
Bio Hackfleisch	286	-	-	-				
Bio Hackfleisch	302	-	-	-				
Bio Hackfleisch	303	-	-	-				
Bio Hackfleisch	307	-	-	-				
Bio Hackfleisch	308	-	-	-				
<i>Rohwurst</i>								
Öko-Rindersalami	54	-	-	-				
Öko-Pfefferbeisser	60	-	-	-				
Rindersalami	99	-	-	-				
Bio Salami	211	-	-	-				
Bio Teewurst	212	-	-	-				
Bio Rindersalami	215	-	-	-				
Bio Pfeffersalami	220	-	-	-				
Bio Sommerwurst	221	-	-	-				
Bio Pfeffersalami	222	-	-	-				
Bio Haussalami	223	-	-	-				
Bio Salami	304	-	-	-				
Bio Salami	330	-	-	-				
Bio Teewurst	376	-	-	-				
Bio Salami	380	-	-	-				
Bio Salami	381	-	-	-				
Bio Rinderrauchsalami	383	-	-	-				
Bio Würstchen, kurzgereift	384	-	-	-				
Bio-Wurst, langgereift	385	-	-	-				
Bio Feuerbeisser	386	-	-	-				
Bio Feuerbeisser	387	-	-	-				
Bio Feuerbeisser	388	-	-	-				
Bio Feuerbeisser	389	-	-	-				
Bio-Wurst, langgereift	390	-	-	-				
Bio Salami	391	-	-	-				
Bio-Wurst, langgereift	392	-	-	-				
Bio Salami	393	-	-	-				
Bio-Wurst, langgereift	394	-	-	-				
Bio-Wurst, langgereift	395	-	-	-				
Bio-Wurst, langgereift	396	-	-	-				
Bio-Wurst, langgereift	397	-	-	-				
Salami	442	-	-	-				
Öko-Rindersalami	477	-	-	-				
Öko-Rindersalami	478	-	-	-				
Öko-Rindersalami	479	-	-	-				
Öko-Rindersalami	480	-	-	-				

Probe	Probe Nr.	Kultur		Real-Time PCR		CT-Wert		Kolonie Blot
		D	ÜN	SYBR Green	ailP-Sonde	SYBR Green	ailP-Sonde	ail-Sonde
Öko-Rindersalami	481	-	-	-				
Öko-Rindersalami	482	-	-	-				
Öko-Pfefferbeisser	483	-	-	-				
Öko-Pfefferbeisser	484	-	-	-				
Öko-Pfefferbeisser	485	-	-	-				
Öko-Pfefferbeisser	486	-	-	-				
Öko-Pfefferbeisser	487	-	-	-				
Öko-Pfefferbeisser	488	-	-	-				
Öko-Rindersalami	490	-	-	-				
Öko-Rindersalami	491	-	-	-				
Öko-Rindersalami	492	-	-	-				
Öko-Rindersalami	493	-	-	-				
Öko-Rindersalami	494	-	-	-				
Öko-Rindersalami	495	-	-	-				
Öko-Pfefferbeisser	496	-	-	-				
Öko-Pfefferbeisser	497	-	-	-				
Öko-Pfefferbeisser	498	-	-	-				
Öko-Pfefferbeisser	499	-	-	-				
Öko-Pfefferbeisser	500	-	-	-				
Öko-Pfefferbeisser	501	-	-	-				

ANHANG

Tierart: GEFLÜGEL

Probe	Probe Nr.	Kultur		Real-Time PCR		CT-Wert		Kolonie Blot
		D	ÜN	SYBR Green	aiP-Sonde	SYBR Green	aiP-Sonde	aiI-Sonde
<i>Muskelfleisch</i>								
Putenschnitzel	17	-	-	-				
Putenbrust	208	-	-	-				
Putenbrust	300	-	-	-				
Putenschnitzel	333	-	-	-				
Putenbrust	378	-	-	-				
Putenbrust	436	-	-	+	-	36,3	> 40	
Hähnchenschenkel	235	-	-	-				
Hähnchenschenkel	236	-	-	-				
Hähnchenschenkel	237	-	-	-				
Hähnchenrückenknöchel	238	-	-	-				
Hähnchenschenkel	239	-	-	-				
Hähnchenschenkel	240	-	-	-				
Hähnchenschenkel	241	-	-	-				
Hähnchenschenkel	242	-	-	-				
Hähnchenschenkel	243	-	-	-				
Hähnchenschenkel	244	-	-	-				
Hähnchenschenkel	245	-	-	-				
Hähnchenschenkel	246	-	-	-				
Hähnchenschenkel	247	-	-	-				
Hähnchenschenkel	248	-	-	-				
Hähnchenschenkel	250	-	-	-				
Hähnchenschenkel	251	-	-	-				
Hähnchenschenkel	252	-	-	-				
Hähnchenschenkel	253	-	-	-				
Hähnchenschenkel	264	-	-	-				
Hähnchenschenkel	265	-	-	-				
Hähnchenschenkel	266	-	-	-				
Hähnchenschenkel	267	-	-	-				
Hähnchenschenkel	268	-	-	-				
Hähnchenschenkel	269	-	-	-				
Hähnchenschenkel	270	-	-	-				
Hähnchenschenkel	271	-	-	-				
Hähnchenschenkel	272	-	-	-				
Hähnchenschenkel	273	-	-	-				
Hähnchenschenkel	274	-	-	-				
Hähnchenschenkel	275	-	-	-				
Hähnchenschenkel	276	-	-	-				
Hähnchenschenkel	277	-	-	-				
Hähnchenschenkel	278	-	-	+	+	26,7	32	-
Hähnchenschenkel	279	-	-	-				
Hähnchenschenkel	280	-	-	-				
Hähnchenschenkel	281	-	-	-				
Hähnchenschenkel	282	-	-	-				
Hähnchenschenkel	283	-	-	-				
Hähnchenschenkel	284	-	-	-				
Hähnchenschenkel	285	-	-	-				

Probe	Probe Nr.	Kultur		Real-Time PCR		CT-Wert		Kolonie Blot
		D	ÜN	SYBR Green	aiP-Sonde	SYBR Green	aiP-Sonde	aiI-Sonde
Muskelfleisch								
Hähnchenschenkel	322	-	-	-				
Hähnchenschenkel	323	-	-	-				
Hähnchenschenkel	324	-	-	-				
Hähnchenschenkel	325	-	-	-				
Hähnchenschenkel	326	-	-	-				
Hähnchenschenkel	327	-	-	-				
Hähnchenschenkel	328	-	-	-				
Hähnchenschenkel	335	-	-	-				
Hähnchenschenkel	336	-	-	-				
Hähnchenschenkel	337	-	-	-				
Hähnchenschenkel	338	-	-	-				
Hähnchenschenkel	339	-	-	-				
Hähnchenschenkel	340	-	-	-				
Hähnchenschenkel	344	-	-	-				
Hähnchenschenkel	345	-	-	-				
Hähnchenschenkel	346	-	-	-				
Hähnchenschenkel	347	-	-	-				
Hähnchenschenkel	348	-	-	-				
Hähnchenschenkel	360	-	-	-				
Hähnchenschenkel	361	-	-	-				
Hähnchenschenkel	362	-	-	-				
Hähnchenschenkel	364	-	-	-				
Hähnchenschenkel u. Rücken	365	-	-	-				
Hähnchenschenkel	366	-	-	-				
Hähnchenschenkel	368	-	-	-				
Hähnchenschenkel	370	-	-	-				
Hähnchenschenkel	371	-	-	-				
Hähnchenschenkel	372	-	-	-				
Hähnchenschenkel	415	-	-	-				
Hähnchenschenkel	416	-	-	-				
Hähnchenschenkel	417	-	-	-				
Hähnchenschenkel	418	-	-	-				
Hähnchenschenkel	419	-	-	-				
Hähnchenschenkel	420	-	-	-				
Hähnchenschenkel	421	-	-	+	-	37,3	> 40	
Hähnchenschenkel	464	-	-	-				
Hähnchenschenkel	465	-	-	-				
Hähnchenschenkel	466	-	-	-				
Hähnchenschenkel	467	-	-	-				
Hähnchenschenkel	468	-	-	-				
Hähnchenschenkel	469	-	-	-				
Hähnchenschenkel	470	-	-	-				
Hähnchenschenkel	471	-	-	-				
Hähnchenschenkel	472	-	-	-				
Hähnchenschenkel	473	-	-	-				
Hähnchenschenkel	474	-	-	-				

Probe	Probe Nr.	Kultur		Real-Time PCR		CT-Wert		Kolonie Blot
		D	ÜN	SYBR Green	ailP-Sonde	SYBR Green	ailP-Sonde	ail-Sonde
<i>Muskelfleisch</i>								
Hähnchenschenkel	475	-	-	-				
Hähnchenschenkel	476	-	-	-				
Hähnchenschenkel	502	-	-	-				
Hähnchenschenkel	503	-	-	-				
Hähnchenschenkel	504	-	-	-				
Hähnchenschenkel	505	-	-	-				
Hähnchenschenkel	506	-	-	-				
Hähnchenschenkel	507	-	-	-				
Hähnchenschenkel, Paprika	249	-	-	-				
Hähnchenschenkel, Paprika	363	-	-	-				
<i>Rohwurst</i>								
Puten Cabanossi	118	-	-	-				
Puten Cabanossi	153	-	-	-				
Bio Putensalami	203	-	-	-				
Puten Cabanossi	379	-	-	-				
Puten Cabanossi	489	-	-	-				
Putenlachsfilet	440	-	-	-				

Legende:

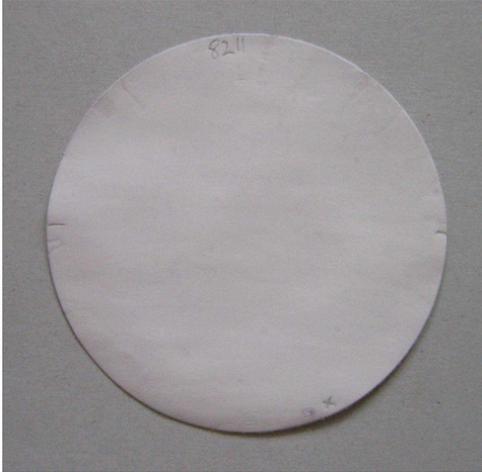
D: Direktausstrich

ÜN: Ausstrich nach Über-Nacht-Anreicherung

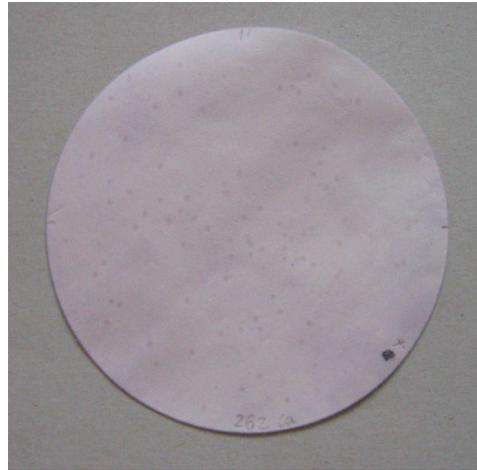
n.d.: nicht durchgeführt, da Bakterien nicht auf Agar anzüchtbar

17 Übersicht der Ergebnisse der Kolonie-Hybridisierungen

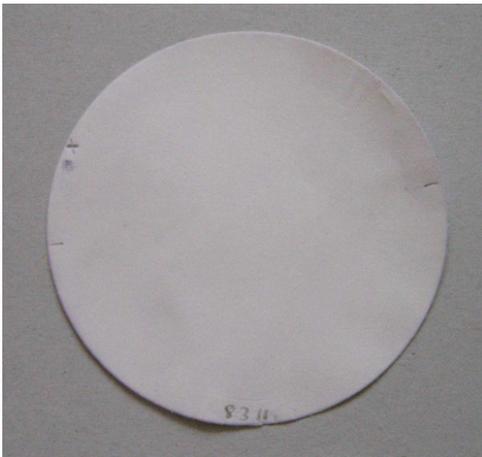
Probe Nr. 82, CASO-Agar



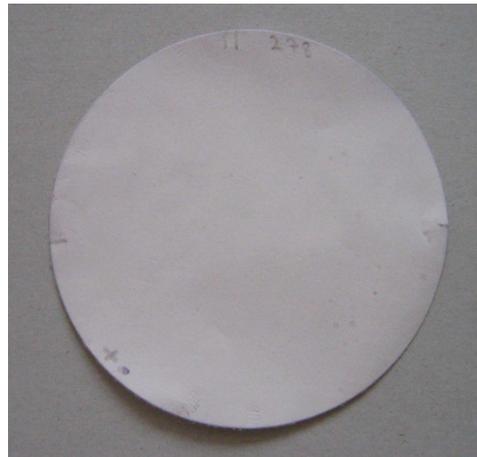
Probe Nr. 262, CIN-Agar



Probe Nr. 83, CASO-Agar



Probe Nr. 278, CIN-Agar



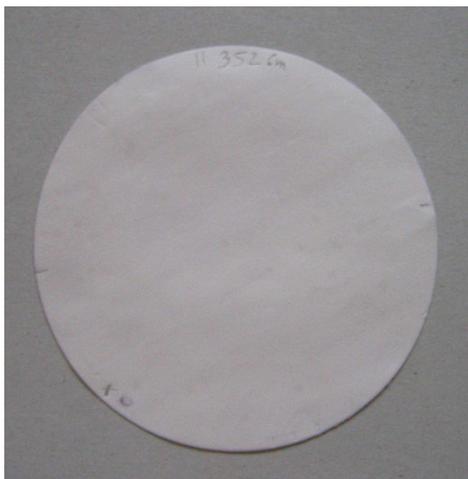
Probe Nr. 226, CIN Agar



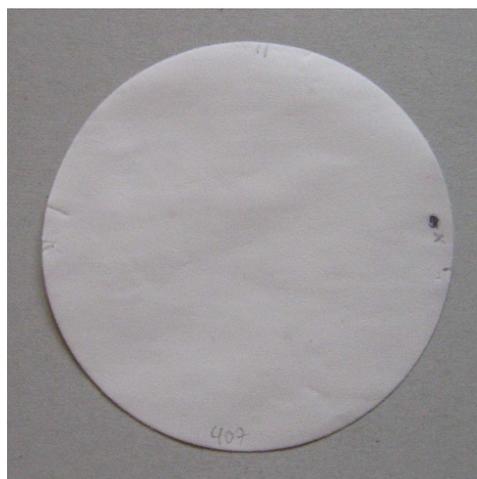
Probe Nr. 351, CASO-Agar



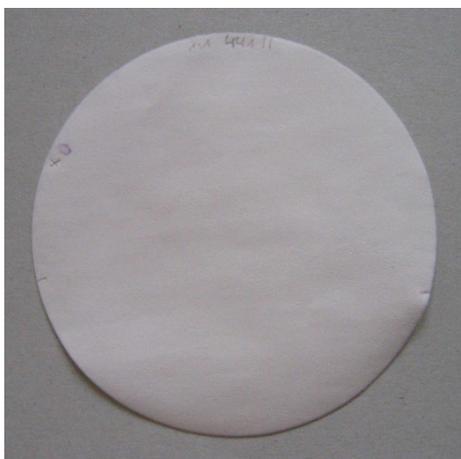
Probe Nr. 352, CASO-Agar



Probe Nr. 407, CASO-Agar



Probe Nr. 441, CASO-Agar



LITERATURVERZEICHNIS

- ABU-HALAWEH, M., BATES, J., PATEL, B.K. (2005)
Rapid detection and differentiation of pathogenic Campylobacter jejuni and Campylobacter coli by real-time PCR
Res. Microbiol., **156**:107-114
- ALEKSIC, S., BOCKEMÜHL, J. (1990)
Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen
Immun. Infekt., **18**:178-185
- ALEKSIC, S., BOCKEMÜHL, J. (1996)
Untersuchungen von Yersinia-Stämmen aus Deutschland, 1993-1994
Bundesgesundheitsblatt, **3**:94-97
- ALEKSIC, S., STEIGERWALT, A.G., BOCKEMÜHL, J., HUNTLEY-CARTER, G.P., BRENNER, D. (1987)
Yersinia rhodei sp. Nov. isolated from human and dog feces and surface water
Int. J. Bact., **37**:327-332
- ALEKSIC, S., BOCKEMÜHL, J., WUTHE, H.H., ALEKSIC, V. (1988)
Occurrence and clinical importance of the pathogenic serogroup O:5,27 of Yersinia enterocolitica in the Federal Republic of Germany and methods for its serological and bacteriological identification
Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt. Orig. A, **269**:197-204
- ARNOLD, T., HENSEL, A., HAGEN, R., ALEKSIC, S., NEUBAUER, H., SCHOLZ, H.C. (2001)
A highly specific one-step PCR assay for the rapid discrimination of enteropathogenic Yersinia enterocolitica from pathogenic Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia pestis
Syst. Appl. Microbiol., **24**:285-289
- AULISIO, C.C.G., STANFIELD, J.T., HILL, W.E., MORRIS, J. A. (1983)
Pathogenicity of Yersinia enterocolitica demonstrated in the suckling mouse
J. Food Prot., **46**:856-860
- AUTENRIETH, I.B., FIRSCHING, R. (1996)
Penetration of M-cells and destruction of Peyer's patches by Yersinia enterocolitica: an ultrastructural and histological study
J. Med. Microbiol., **44**:285-294
- BAILEY, G.D., VANSELOW, B.A., HORNITZKY, M.A., HUM, S.I., EAMENS, G.J., GILL, P.A., WALKER, K.H., CRONIN, J.P. (2003)

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

Commun. Dis. Intell., 27:249-257

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

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In: Schrimpf, G., Gentechnische Methoden

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3:147-167

BARTKOWIAK-HIGGO, A.J., VEARY, C.M., VENTER, E.H., BOSMAN, A.M. (2006)

A pilot study on post-evisceration contamination of broiler carcasses and ready-to-sell livers and intestines (mala) with Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in a high throughput South African poultry abattoir

J. S. Afr. Vet. Assoc., 77:114-119

BERCOVIER, H., BRAULT, J., BAARÉ, N., TREIGNIER, M., ALONSO, J.M., MOLLARET, H.H. (1978)

Biochemical, serological and phage typing characteristics of 459 Yersinia strains isolated from a terrestrial ecosystem

Curr. Microbiol., 1:353-357

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

Genus XIV. Yersinia

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

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

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

Characterization of Yersinia enterocolitica sensu stricto.

Curr. Microbiol., 4:201-206

BERRADA, H., SORIANO, J.M., PICÓ, Y., MANES, J. (2006)

Quantification of Listeria monocytogenes in salads by real time quantitative pcr

Int. J. Food Microbiol., 107:202-206

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

Assay of cristal violet binding for rapid identification of virulent plasmid-bearing clones of Yersinia enterocolitica

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

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

Direct Detection and Isolation of Plasmid-Bearing Virulent Serotypes of Yersinia enterocolitica from Various Foods

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

Yersinia enterocolitica
Infect. Immun., **25**:532-537

BRENNER, D.J. (1981)

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

BRETT, S.J., MAZUROV, A.V., CHARLES, I.G., TITE, J.P. (1993)

The invasin protein of Yersinia spp. provides co-stimulatory activity to human T cells through interaction with beta 1 integrins
Eur. J. Immunol., **23**:1608-1614

BROWN, T.A. (2002)

Kolonie- und Plaquehybridisierung
In: Brown, T.A. (Hrsg.), *Gentechnologie für Einsteiger*
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2**:192-194

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

Case report: Yersinia enterocolitica in septicemia in an American minipig
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., **108**:257-260

BRUBAKER, R.T. (1991)

Factor promoting acute and chronic disease caused by yersiniae
Clin. Microbiol Rev., **4**:309-324

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-Arten in Kälbern und Jungrindern
Fleischwirtschaft, **9**:125-127

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

Vorkommen von Yersinia enterocolitica in Puten
43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Ober-Mörlen, Deutschland, 2002: 649-652

BUSTIN, S.A. (2005)

Real-Time PCR
<http://www.gene-quantification.com/bustin-qpcr-review-2005.pdf>

- CARNIEL, E. (1995)
Chromosomal virulence factors of Yersinia
Contr. Microbiol. Immunol., **13**:218-224
- CARTER, P.B. (1975)
Pathogenicity of Yersinia enterocolitica for mice
Infect. Immun., **11**:164-170
- CHIU, H.Y., FLYNN, D.M., HOFFBRAND, A.V., POLITIS, D. (1986)
Infection with Yersinia enterocolitica in patients with iron overload
Br. Med. J., **292**:97
- CORNELIS, G., BOLAND, A., BOYD, A.P., GEUIJEN, C., IRIARTE, M., NEYT, C., SORY, M.P., STAINIER, I. (1998)
The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome.
Microbiol. Mol. Biol. Rev., **62**:1315-1352
- DE BOER, E. (1995)
Isolation of Yersinia enterocolitica from foods
Contrib. Microbiol. Immunol., **13**:71-73
- DE KONING, J., HEESEMANN, J., HOOBKAMP-KORSTANJE, J.A., FESTEN, J.J., HOUTMAN, P.M., VAN OIJEN, P.L. (1989)
Yersinia in intestinal biopsy specimens from patients with seronegative spondyloarthritis: correlation with specific serum IgA antibodies
J. Infect. Dis., **159**:109-112
- DEDIÉ, K., BOCKEMÜHL, J., KÜHN, H., VOLKMER, K.-I., WEINKE, T. (1993)
Yersiniosen mit enteritischem Verlauf beim Menschen
Lehrbuch über Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch, Epidemiologie, Pathologie, Klinik, Diagnostik und Bekämpfung
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, S. 377-398
- DELOR, I.A., KAECKENBEEK, G., WAUTERS, G., CORNELIS, G.R. (1990)
Nucleotide sequence of yst, the Yersinia enterocolitica gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and non-pathogenic yersiniae
Infect. Immun., **58**:2983-2988
- DELOR, I.A., CORNELIS, G.R. (1992)
Role of Yersinia enterocolitica Yst toxin in experimental infection of young rabbits
Infect. Immun., **60**:4269-4277
- DEQUEKER, J., JAMAR, R., WALRAVENS, M. (1980)
HLA-B27, arthritis and Yersinia enterocolitica infection
J. Rheumatol., **7**:706-710

- DURISIN, M.D., IBRAHIM, A., GRIFFITHS, M.W. (1998)
Detection of pathogenic Yersinia enterocolitica using a digoxigenin labelled probe targeting the yst gene
J. Appl. Microbiol., **2**:285-292
- EFSA-EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2006)
The community Symmary Report 2005
The EFSA Journal 2006-94
- FALCÃO, J.P., FALCÃO, D.P., PITONDO-SILVA, A., MALASPINA, A.C.,
BROCCHI, M. (2006)
Molecular typing and virulence markers of Yersinia enterocolitica strains from human , animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil
J. Med. Microbiol., **55**:1539-1548
- FANTASIA, M., MINGRONE, M.G., CROTTI, D., BOSCATO, C. (1985)
Isolation of Yersinia enterocolitica Biotype 4 Serotype O3 from Canine Source in Italy
J. Clin. Microbiol., **22**:314-315
- FEHLHABER, K.; JANETSCHKE, P. (1992)
Ei und Eiprodukte, In:Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene
Gustav Fischer Verlag, Jena, S. 380-409
- FENG, P. (1992)
Identification of invasive Yersinia species using oligonucleotide probes
Mol. Cell. Probes, **4**:291-297
- FENWICK, S.G., MURRAY, A., (1991)
Detection of pathogenic Yersinia enterocolitica by polymerase chain reaction
Lancet., **337**:496-497
- FITTS, R., DIAMOND, M., HAMILTON, C., NERI, M. (1983)
DNA-DNA Hybridization Assay for Detection of Salmonella spp. in Food
Appl. Environ. Microbiol., **46**:1146-1151
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., HIELM. S., KORKEALA, H. (1999)
High prevalence of yadA-positive Yersinia enterocolitica in pig tongues and minced meat at the retail level in Finland
J. Food Prot., **62**:123-127
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., KORTE, T., KORKEALA, H. (2000)
Contamination of carcasses, offals and the environment with yadA-positive Yersinia enterocolitica in a pig slaughterhouse
J. Food Prot., **63**:31-35

- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., KORTE, T., KORKEALA, H. (2000a)
Prävalenz von Yersinia enterocolitica Bioserotyp 4/O:3 in Tonsillen bei Schlachtschweinen in der Region München
41. Arbeitstagung 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:O3 on pig offal in southern Germany: a slaughtering technique problem
Syst. Appl. Microbiol., **3**:457-463
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., KORTE, T., KORKEALA, H. (2001b)
Transmission of Yersinia enterocolitica 4/O:3 to pets via contaminated pork
Lett. Appl. Microbiol, **32**:375-378
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., KORKEALA, H (2003)
Low Occurrence of Pathogenic Yersinia enterocolitica in Clinical, Food, and Environmental Samples: a Methodological Problem
Clin. Microbiol. Rev., **16**:220-229
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., STOLLE, A., SIITONEN, A., KORKEALA, H (2006)
Sporadic human Yersinia enterocolitica infections caused by bioserotype 4/O:3 originate mainly from pig
J. Med. Microbiol., **55**:747-740
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., HARTMANN, B., SCHEU, P., STOLLE, A. (2007)
Detection of pathogenic Yersinia enterocolitica in meat using real-time PCR
J. Verbr. Lebensm., *In press*
- 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., HOSHINA, K., NAKAMURA, R., ITO, Y. (1987)
Vorkommen von Yersinia spp. in rohem Rind-, Schweine- und Hühnerfleisch
Zbl. Bakt., 1. Abt. Orig. B, **84**:50-59
- 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
- GEMSKI, P., LAZERE, J.R., CASEY, T. (1980)
Plasmid associated with pathogenicity and clacium

dependency of Yersinia enterocolitica
Infect. Immun., **27**:682-685

GIERCZYNSKI, R. (2000)

Evaluation of the usefulness of selected virulence markers for identification of virulent strains of Yersinia enterocolitica strains.III.Chromosome markers of virulence
Med. Dosw. Mikrobiol., **52**:51-65

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

Digoxigenin-labelled inv- and ail-probes for the detection and identification of pathogenic Yersinia enterocolitica in clinical specimens and naturally contaminated pig samples
J. Appl. Bacteriol., **74**:301-313

GRANFORS, K., MERILAHTI-PALO, R., LUUKKAINEN, R., MOTTONEN, T., LAHESMAA, R., PROBST, P., MARKER-HERMANN, E., TOIVANEN, P. (1998):

Persistence of Yersinia antigens in peripheral blood cells from patients with Yersinia enterocolitica O:3 infection with or without reactive arthritis
Arthritis Rheumat., **41**:855-862

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

Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of Yersinia enterocolitica lacking classical virulence markers
Infect. Immun., **66**:1113-1120

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. Prot., **40**:689-692

HARTMANN, B., (2006)

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

- HARTUNG, M., GERIGK, K. (1991)
Yersinia in effluents from the food-processing industry
Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., **10**:799-811
- HARTUNG, M. (2006)
Epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland im Jahr 2004
BfR Wissenschaft, **4**/2006
http://www.bfr.bund.de/cm/238/epidemiologische_situation_de_r_zoonosen_in_deutschland_im_jahr_2004.pdf
- HEESEMANN, J., ALGERMISSEN, B., LAUFS, R. (1984)
Genetically manipulated virulence of Yersinia enterocolitica
Immun. Infekt., **46**:105
- HEESEMANN, J. (1990)
Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische Methoden
Immun. Infekt. **18**:186-191
- HEESEMANN, J., HANTKE, K., VOCKE, T., SAKEN, E., RAKIN, A., STOJILJKOVIC, I., BERNER, R. (1993)
Virulence of Yersinia enterocolitica is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65.000 Da and pesticin sensitivity
Mol. Microbiol., **8**:397-408
- 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**:729-734
- HILL, W.E., PAYNE, W.L., AULISIO, C.C.G. (1983)
Detection and enumeration of virulent Yersinia enterocolitica in food by DNA colony hybridisation
Appl. Environ. Microbiol., **46**:636-641
- HILL, W.E., PAYNE, W.L., ZON, G., MOSELEY, S.L. (1985)
Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes for detecting heat-stable enterotoxin-producing Escherichia coli by DNA colony hybridization
Appl. Environ. Microbiol., **50**:1187-1191
- HILL, W.E., KEASLER, S.P. (1991)
Identification of foodborne pathogens by nucleic acid hybridization
Int. J. Food Microbiol., **12**:67-76

- HOFF, C., MIKOSCH, T., SERANSKI, P. (2002)
Blottingverfahren und Hybridisierungen
In: Schrimpf, G. (Hrsg.), *Gentechnische Methoden*
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **3**:223-246
- HONG, B.X., JIANG, L.F., Hu, Y.S., FANG, D.Y., GUO, H.Y. (2004)
Application of oligonucleotide array technology for the rapid
detection of pathogenic bacteria of foodborne infections
J. Microbiol. Methods, **58**:403-411
- HOOBKAMP-KORSTANJE, J., DE KONING, J. (1990)
Klinik, Diagnostik und Therapie von Yersinia enterocolitica
Infektionen
Immun. Infekt., **18**:192-197
- HUDSON, J.A., MOTT, S.J., PENNEY, N. (1994)
Growth of Listeria monocytogenes, Aeromonas hydrophila
and Yersinia enterocolitica on Vacuum and Saturated Carbon
Dioxide Controlled Atmosphere-Packaged Sliced Roast Beef
J. Food Prot., **57**:204-208
- HUECK, C.J. (1998)
Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of
animals and plants
Microbiol. Mol. Biol. Rev., **62**:379-433
- 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
- IKEDA, M., YAMAGUCHI, N., TANI, K., NASU, M. (2006)
Detection of food poisoning bacteria in fresh vegetables using
DNA microarray
J. Health Sci., **52**:36-42
- ISBERG, R.R. (1989)
Mammalian cell adhesion functions and cellular penetration of
enteropathogenic Yersinia species
Mol. Microbiol., **3**:1449-1453
- JACOBSEN, N.R., BOGDANOVICH, T., SKURNIK, M., LÜBECK, P.S., AHRENS,
P., HOORFAR, J. (2005)
A Real-Time PCR assay for the specific identification of
serotype O:9 of Yersinia enterocolitica
J. Microbiol. Methods, **63**:151-156
- JAGOW, J., HILL, W.E. (1986)
Enumeration by DNA Colony Hybridization of Virulent Yersinia

enterocolitica Colonies in Artificially Contaminated Food
Appl. Environ. Microbiol., **51**:441-443

JARRIN, A. (2002)

Fehlerquellen bei der photometrischen Messung von Nucleinsäuren
Eppendorf BioNews Application Notes

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

Occurrence of pathogenic Yersinia enterocolitica in Norwegian pork products determined by a PCR method and a traditional culturing method
Int. J. Food Microbiol., **54**:75-80

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

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

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

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

A synthetic oligonucleotide probe and a cloned polynucleotide probe based on the yopA gene for detection and enumeration of virulent Yersinia enterocolitica
Appl. Environ. Microbiol., **1**:17-23

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

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

KATAYAMA, Y., KUWANO, A., YOSHIHARA, T.. (2001)

Histoplasmosis in the lung of a race horse with yersiniosis
J. Vet. Med. Sci, **63**:1229-1231

KHALAFALLA, F.A. (1990)

Yersinia enterocolitica bei verarbeitetem Geflügel
Fleischwirtschaft., **70**:351-352

KIM, C., SWAMINATHAN, B., CASSADAY, P.K., MAYER, L.W., HOLLOWAY, B.P. (1991)

Rapid Confirmation of Listeria monocytogenes Isolated from Foods by a Colony Blot Assay Using Digoxigenin-Labeled

Synthetic Oligonucleotide Probe
Appl. Environ. Microbiol., **57**:1609-1614

KLEIN, H.G., DODD, R.Y., NESS, P.M., FRATANTONI, J.A., NEMO, G.J. (1997)
Current status of microbial contamination of blood components: summary of a conference
Transfusion **37**:95-101

KNUTSSON, R., FONTANESI, M., GRAGE, H., RÅDSTRÖM, P. (2002)
Development of a PCR-compatible enrichment medium for Yersinia enterocolitica: amplification precision and dynamic detection range during cultivation
Int. J. Food Microbiol., **72**:185-201

KORTE, T., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., NISKANEN, T., KORKEALA, H. (2004)
Low prevalence of yadA-positive Yersinia enterocolitica in sows
Foodborne Pathog. Dis., **1**:45-52

KUBISTA M., ANDRADE J.M., BENGTSSON M., FOROOTAN A., JONÁK J., LIND K., SINDILKA R., SJÖBACK R., SJOGREEN B., STRÖMBOM L., STAHLBERG A., ZORIK N. (2006)
The real-time polymerase chain reaction
Mol. Asp. Med. **27**, 95-125

KWAGA, J., IVERSEN, J.O., MISRA, V. (1992)
Detection of pathogenic Yersinia enterocolitica by polymerase chain reaction and Digoxigenin-labeled polynucleotide probes
J. Clin. Microbiol., **30**:2668-2673

LAIRD, W.J., CAVANAUGH, D.C. (1980)
Correlation of autoagglutination and virulence of yersiniae
J. Clin. Microbiol., **11**:430-432

LANTZ P.G., KNUTSSON R., BLIXT Y., AL-SOUD W.A., BORCH E., RADSTRÖM P. (1998)
Detection of pathogenic Yersinia enterocolitica in enrichment media and pork by a multiplex PCR: a study of sample preparation and PCR-inhibitory components
Int. J. Food Microbiol., **45**:93-105.

LINDBLAD, M., LINDMARK, H., LAMBERTZ, S.T., LINDQVIST, R. (2006)
Microbial baseline study of broiler chickens at Swedish slaughterhouse
J. Food Prot., **69**:2875-2882

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
- LOGUE, C.M., SHERIDAN, J.J., WAUTERS, G., DOWELL, D.A. Mc, BLAIR, I.S. (1996)
Yersinia spp. and numbers, with particular reference to Y. enterocolitica bio/serotypes, occurring on Irish meat and meat products, and the influence of alkali treatment on their isolation
Int. J. Food Microbiol., **33**:257-274
- MACKAY, I.M. (2004)
Real-Time PCR in the microbiology laboratory
Clin. Microbiol. Infect., **10**:190-212
- MALORNY, B., PANAYOTIS, T., TASSIOS, T., RÅDSTRÖM, 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
- MCKILLIP, J.L., DRAKE, M. (2004)
Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food.
J. Food Prot., **67**:823-832
- MILIOTIS, M.D., GALEN, J.E., KAPER, J.B., MORRIS, J.G.JR. (1989)
Development and testing of a synthetic oligonucleotide probe for the detection of pathogenic Yersinia strains
J. Clin. Microbiol., **7**:1667-1670
- MILLER, V.L., FALKOW, S. (1988)
Evidence of two genetic loci in Yersinia enterocolitica that can promote invasion of epithelial cells
Infect. Immun., **56**:1242-1248
- MILLER, V.L., FARMER, J.J., HILL, W.E., FALKOW, S. (1989)
The ail locus is found uniquely in Yersinia enterocolitica serotypes commonly associated with disease.
Infect. Immun., **57**:121-131
- MITTAL, K.R., TIZARD, I.R., BARNUM, D.A. (1985)
Serological cross-reactions between Brucella abortus and Yersinia enterocolitica O:9
Int. J. Zoonoses., **12**:219-227
- MÜLHARDT, C. (2003a)
Wie man DNA aufspürt
In: Mühlhardt, C., Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **4**:146-163

MÜLHARDT, C. (2003b)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

In: Mühlhardt, C., Der Experimentator:

Molekularbiologie/Genomics

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **4**:73-105

MYERS, K.M., GABA, J., AL-KHALDI, S.F. (2006)

Molecular identification of Yersinia enterocolitica isolated from pasteurized whole milk using DNA microarray chip hybridization

Mol. Cell. Probes, **20**:71-80

MYINT, M.S., JOHNSON, Y.J., TABLANTE, N.L. (2006)

The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated Salmonella in raw poultry compared to conventional culture

Food Microbiol., **23**:599-604

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

NAKAJIMA, H., ITOH, K.I., ARAKAWA, E., INOUE, M. E., MORI, T., WATANABE, H. (1994)

Degradation of a polymerase chain reaction (PCR) product by heat-stable deoxyribonuclease (DNase) produced from Yersinia enterocolitica

Microbiol. Immunol., **38**:153-156

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

Die Yersinia enterocolitica-Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren

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

NESBAKKEN, T., GONDROSEN, B., KAPPERUD, G. (1985)

Investigation of Yersinia enterocolitica-like bacteria and thermotolerant Campylobacters in Norwegian pork products

Int. J. Food Microbiol., **1**:311-320

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., **2**:389-394

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
- NEUBAUER, H., SPRAGUE, L. D., SCHOLZ, H., HENSEL, A. (2001)
Yersinia enterocolitica-Infektionen: 1. Bedeutung bei Tieren
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., **114**:8-12
- NG, L.K., KINGOMBE, C.I., YAN, W., TAYLOR, D.E., HIRATSUKA, K., MALIK, N., GARCIA, M.M. (1997)
Specific detection and confirmation of Campylobacter jejuni by DNA hybridization and PCR
Appl. Environ. Microbiol, **63**:4558-4563
- NORBERG, P. (1981)
Enteropathogenic bacteria in frozen chicken
Appl. Environ. Microbiol., **42**:32-34
- 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
- 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
- PIERSON, D.E., FALKOW, S. (1990)
Nonpathogenic isolates of Y. enterocolitica do not contain functional inv-homologous sequences
Infect. Immun., **58**:1059-1064
- PILZ, D., VOCKE, T., HEESEMANN, J., BRADE, V. (1992)
Mechanism of YadA-mediated serum resistance of Yersinia enterocolitica serotype O:3
Infect. Immun., **60**:189-195
- PLATT-SAMORAJ, A., UGORSKI, M., SZWEDA, W., SZCZERBA-TUREK, A., WOJCIECH, K., PRACAJŁO, Z. (2006)
Analysis of the presence of ail, ystA and ystB Genes in Yersinia enterocolitica Strains Isolated from Aborting Sows and Aborted Fetuses
J. Vet. Med., **53**:341-346
- PORTNOY, D.A., FALKOW, S. (1981a)
Virulence-associated plasmids from Yersinia enterocolitica do not contain functional inv-homologous sequences
Infect. Immun., **148**:877-883

- PORTNOY, D.A., MOSELEY, S.L., FALKOW, S. (1981b)
Characterization of plasmid-associated determinants of Yersinia enterocolitica pathogenesis
 Infect. Immun., **31**:775-782
- PORTNOY, D.A., MARTINEZ, R.J. (1985)
Role of a plasmid in the pathogenicity of Yersinia species
 Curr. Topics Microbiol. Immunol., **118**:29-51
- PRPIC, J.K., ROBINS-BROWNE, R.M., DAVEY, R.B. (1983)
Differentiation between virulent and avirulent Yersinia enterocolitica isolates by using Congo red agar
 J. Clin. Microbiol., **18**:486-490
- RABSON, A.R., HALLETT, A.F., KOORNHOF, H.J. (1975)
Generalized Yersinia enterocolitica infection
 J. Infect. Dis., **131**:447-451
- ROBINS-BROWNE, R.M., MILIOTIS, M.D., CIANCIOSI, S., MILLER, V.L., FALKOW, S., MORRIS, J.G. Jr. (1989)
Evaluation of DNA colony hybridization and other techniques for detection of virulence in Yersinia species
 J. Clin. Microbiol., **27**:644-650
- 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
- SCHEU, P.M., BERGHOF, K., STAHL, U. (1998)
Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction
 Food Microbiol., **15**:13-31
- SCHIEMANN, D.A. (1980)
Isolation of toxogenic Yersinia enterocolitica from retail pork products
 J. Food Prot., **43**:360-365
- SCHIEMANN, D.A., DEVENISH, J.A. (1982)
 Relationship of HeLa-cell infectivity to biochemical, serological and virulence characteristics of Yersinia enterocolitica
 Infect. Immun., **35**:497-506
- SCHIEMANN, D.A. (1989)
Yersinia enterocolitica und Yersinia pseudotuberculosis
 In: Doyle M.P. (Hrsg.), Foodborne bacterial pathogens
 Marcel Dekker, New York, S. 601-672
- SCHUBERT, S., BOCKEMÜHL, J., BRENDLER, U., HEESEMANN, J. (2003)
First Isolation of Virulent Yersinia enterocolitica O8, Biotype

- 1B in Germany*
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **22**:66-68
- SCHULTE, R., KERNELS, S., KLINKE, S., BARTELS, H., PREGER, S.,
KRAEHENBUHL, J., PRINGAULT, E., AUTHENRIETH, I.B. (2000)
*Translocation of Yersinia enterocolitica across reconstituted
intestinal epithelial monolayers is triggered by Yersinia
invasion binding to beta1 integrins apically expressed on M-
like cells*
Cell Microbiol., **2**:173-185
- SEN, K. (2000)
*Rapid identification of Yersinia enterocolitica in blood by the 5'
nuclease PCR assay*
J. Clin. Microbiol., **38**:1953-1958
- SHIOZAWA, K., HAYASHI, M., AKIYAMA, M., NISHINA, T., NAKATSUGAWA, S.,
FUKUSHIMA, H., ASAKAWA, Y.(1988)
*Virulence of Yersinia pseudotuberculosis Isolated from Pork
and from Throats of Swine*
Appl. Environ. Microbiol, **54**:818-821
- 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
- SINGH, I., VIRDI, J.S. (2004)
*Production of Yersinia stable toxin (YST) and distribution of
yst genes in biotype 1A strains of Yersinia enterocolitica*
J. Med. Microbiol., **53**:1065-1068
- SPRAGUE, L.D., NEUBAUER, H. (2005)
Yersinia aleksiciae sp. nov.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **55**:831-835
- SWAMINATHAN, B., HARMON, M.C., MEHLMANN, I.J. (1982)
A review - Yersinia enterocolitica
J. Appl. Bact., **52**:151-183
- TENNANT, S.M., GRANT, T.H., ROBINS-BROWNE, R.M. (2003)
Pathogenicity of Yersinia enterocolitica biotype 1A
FEMS Immunol. Med. Microbiol., **38**:127-137
- THISTED LAMBERTZ, S., BALLAGI-PORDANY, A., NILSSON, A., NORBERG
DANIELSSON-THAM, M.,L. (1996)
*A comparison between a PCR method and a conventional
culture method for detecting pathogenic Yersinia enterocolitica
in food*
J. Appl. Bacteriol., **3**:303-308

- 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., DANIELSSON-THAM, M.,L. (2005)
Identification and characterization of pathogenic Yersinia enterocolitica isolates by PCR and Puls-Field Gel Elektrophoresis
Appl. Environ. Microbiol., **71**:3674-3681
- THISTED LAMBERTZ, S., DANIELSSON-THAM, M.,L. (2007)
Evaluation of a Combined Culture and PCR method (NMKL-163A) for detection of presumptive pathogenic Yersinia enterocolitica in pork products
J. Food. Prot. *In press*
- 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
- VAITILINGOM, M., PIJNENBURG, H., GENDRE, F., BRIGNON, P. (1999)
Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods
J. Agric. Food Chem., **47**:5261-5266
- VELASQUEZ, L.C.D., 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., FUNG, D.Y.C., OBERST, R.D., HAYS, M.P., NAGARAJA, T.G., FLOOD, S.J.A. (2001)
Evaluation of a 5'-Nuclease (TaqMan) Assay for the Detection of Virulent Strains of Yersinia enterocolitica in Raw Meat and Tofu Samples
J. Food Prot., **64**:355-360
- VOLLENHOFER-SCHRUMPF, S., BURESCH, R., UNGER, G., STAHL, N., FRÄNZL, G., SCHINKINGER, M. (2005)

Detection of Salmonella spp., Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes and Campylobacter spp. In chicken samples by Multiplex Polymerase Chain Reaction and Hybridization using the GeneGen Major Food pathogens Detection Kit
 J. Rapid Methods Auto Microbiol., **13**:148-176

WANG, X., JOTHIKUMAR, N., GRIFFITHS, M.W. (2004)

Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of Salmonella and Listeria monocytogenes in raw sausage meat with multiplex real-time PCR
 J. Food Prot., **67**:189-192

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

Revised biogrouping scheme of Yersinia enterocolitica
 Contrib. Microbiol. Immunol., **9**:14-21

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

New enrichment method for isolation of pathogenic Yersinia enterocolitica serogroup O:3 from pork
 Appl. Environ. Microbiol., **54**:851-854

WEAGANT, S., JAGOW, J.A., JINNEMAN, K.C., OMIECINSKI, C.J., KAYSNER, C.A., HILL, W.E. (1999)

Development of Digoxigenin-Labeled PCR Amplicon Probes for Use in the Detection and Identification of Enteropathogenic Yersinia and Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli from Foods
 J. Food. Prot., **62**:438-443

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

Occurrence of human pathogenic Yersinia enterocolitica in cats
 Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **94**:325-327

WEBER, A. (2004)

Vorkommen von Salmonellen, Campylobacter, Yersinien und EHEC/VTEC bei Kleintieren und die Bedeutung für den Menschen
 Amtstierärztl. Dienst und Lebensmittelkontrolle., **11**:114-116

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

Detection of Yersinia enterocolitica Serogroup O:3 by an PCR Method
 J. Clin. Microbiol., **30**:2484-2486

WILHELM, J., PINGOUD, A. (2003)

Real-Time Polymerase Chain Reaction
 Chem Bio. Chem., **4**:1120-1128

WINBLAD, S. (1969)

Erythema nodosum associated with infection with Yersinia

- enterocolitica*
Scand. J. Infect. Dis., **1**:11-16
- WOLFFS, P., KNUTSSON, R., NORLING, B., RÅDSTRÖM, P. (2004)
Rapid Quantification of Yersinia enterocolitica in Pork Samples by a Novel Sample Preparation Method, Flotation, Prior to Real-Time PCR
J. Clin. Microbiol, **42**:1042-1047
- 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. Methods, **60**:315-323
- WREN, B.W., TABAQCHALI, S. (1990)
Detection of pathogenic Yersinia enterocolitica by the polymerase chain reaction
Lancet, **336**:693
- WUTHE, H.H., ALEKSIC, S. (1992)
Yersinia enterocolitica Serovar 1,2a,3 Biovar in Chinchillas
Zbl. Bakt., **277**:403-405
- WUTHE, H.H., ALEKSIC, S. (1997)
Yersinia enterocolitica serovar 2a, wb, 3:b,c biovar 5 in hares and sheep
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., **110**:176-177
- ZHENG, H.X., WANG, J.D., ZHANG, M.J., SUN, Y., JIANG, B. (2006)
Yersinia enterocolitica identification in stool samples using real-time PCR
Diagn. Microbiol. Infect. Dis., *In Press*
- ZINK, D.L., FEELEY, J.C., WELLS, J.G.; VANDERZANT, C.; VICKERY, J.C., ROOF, W.D. and O'DONOVAN, G.A. (1980)
Plasmid-mediated tissue invasiveness in Yersinia enterocolitica
Nature (London), **283**:224-226

SONSTIGE LITERATURQUELLEN

DRAFT INTERNATIONAL STANDARD (1993)

Microbiology – General guidance for the detection of presumptive pathogenic Yersinia enterocolitica (ISO/DIS 10273)

International Organization for Standardization, S. 1-15

EFSA-EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2006)

The community Summary Report 2005

The EFSA Journal 2006-94

NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS (1996)

Yersinia enterocolitica – Detection in foods

Nordic committee on food analysis, 117, 3rd edition

ROBERT KOCH INSTITUT (2006)

Ausgewählte Zoonosen im Jahr 2005: Durch Lebensmittel übertragbare bakterielle gastrointestinale Infektionen

Epidemiologisches Bulletin, **41**/2006

ROCHE DIAGNOSTICS (2000)

DIG Application Manual for Filter Hybridization

N.N. (1984)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB (1984) Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L 06.00-19 Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl bei +30 °C in Fleisch und Fleischerzeugnissen-Tropfplattenverfahren

www.methodensammlung-bvl.de, Beuth Verlag GmbH

N.N. (1999)

Verfahren zum qualitativen Nachweis von Salmonellen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), DIN 10135 1999-11

N.N. (2002)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB (1984) Untersuchung von Lebensmitteln – Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender Escherichia Coli (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik BVL L 07.18-1

www.methodensammlung-bvl.de, Beuth Verlag GmbH

N.N. (1999)

Verfahren zum qualitativen Nachweis von Salmonellen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), DIN 10135 1999-11

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Untersuchung von Lebensmitteln mittels Kolonie Hybridisierung auf <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Campylobacter spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> , EHEC und <i>L. monocytogenes</i>	7
Tabelle 2:	Beispiele von PCR-Methoden, die zur Detektion von <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Campylobacter spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> , EHEC und <i>L. monocytogenes</i> in Lebensmitteln eingesetzt wurden.....	17
Tabelle 3:	Vergleich der Sensitivität der Methoden Kultur, PCR, Nested PCR und Real-Time PCR.....	18
Tabelle 4:	Charakteristische Eigenschaften von <i>Y. enterocolitica</i> und verschiedener <i>Y. enterocolitica</i> -like Bakterien nach (BERCOVIER et al. 1978, BRENNER 1981, KAPPERUD und BERGAN 1984, ALEKSIC et al. 1987, WAUTERS et al. 1988, BOCKEMÜHL und WONG 2003)	23
Tabelle 5:	Biochemische Differenzierung der Biotypen von <i>Y. enterocolitica</i> modifiziert nach WAUTERS et al. 1987 (BOTTONNE 1999)	24
Tabelle 6:	Zusammenfassung wichtiger Pathogenitätsfaktoren von <i>Y. enterocolitica</i> und ihre Temperaturabhängigkeit (nach BOTTONNE 1997).....	26
Tabelle 7:	Bedeutende Virulenzfaktoren von pathogener <i>Y. enterocolitica</i> inklusive ihrer pathogenetischen Funktion (CARNIEL 1995)	27
Tabelle 8:	Übersicht der am häufigsten in Kolonie-Hybridisierungen untersuchten Zielgene, der eingesetzten Sonden und der untersuchten Proben.....	30
Tabelle 9:	PCR-Methoden, die zur Detektion von pathogener <i>Y. enterocolitica</i> in Reinkulturen, Lebensmitteln und klinischem Material entwickelt wurden	36

Tabelle 10:	Vergleich der <i>Yersinia</i> Epidemiologie in Deutschland (D) und Europa (EU) im Jahr 2005	39
Tabelle 11:	Prävalenz von <i>Y. enterocolitica</i> in Schweinefleisch und -Produkten auf Einzelhandels- und Verarbeitungsebene in Europa.....	47
Tabelle 12:	Prävalenz von <i>Y. enterocolitica</i> in Rindfleisch, -Produkten, -Milch und Molkereierzeugnissen auf Einzelhandelsebene in Europa.....	48
Tabelle 13:	Prävalenz von <i>Y. enterocolitica</i> in Geflügelfleisch und -Produkten auf Einzelhandelsebene in Europa	49
Tabelle 14:	Prävalenz von <i>Y. enterocolitica</i> in rohem Fleisch und Rohfleischprodukten vom Schwein	51
Tabelle 15:	Prävalenz von <i>Y. enterocolitica</i> in rohem Fleisch und Rohfleischprodukten vom Rind	52
Tabelle 16:	Prävalenz von <i>Y. enterocolitica</i> in rohem Fleisch und Rohfleischprodukten vom Geflügel	53
Tabelle 17:	Unterschiedliche Rohfleischprodukte vom Schwein, Rind und Geflügel, die auf die Prävalenz von pathogener <i>Y. enterocolitica</i> untersucht wurden.....	59
Tabelle 18:	Nukleotidsequenz der in der Real Time-PCR verwendeten Primer	64
Tabelle 19:	Reaktionsmix für die SYBR [®] Green-PCR zur Detektion <i>ail</i> -positiver <i>Y. enterocolitica</i>	65
Tabelle 20:	Nukleotidsequenz der in der Sonden PCR verwendeten <i>ail</i> P-Sonde	66
Tabelle 21:	Reaktionsmix für die Sonden-PCR zur Detektion <i>ail</i> -positiver <i>Y. enterocolitica</i>	67
Tabelle 22:	Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm:.....	70

Tabelle 23:	Ermittlung der Bakterienzeldichte anhand des McFarland Standards.....	71
Tabelle 24:	Ergebnisse der photometrischen DNA-Messung	73
Tabelle 25:	Ergebnisse der photometrischen DNA-Messung	74
Tabelle 26:	Ergebnisse der photometrischen DNA-Messung	75
Tabelle 27:	Master Mix die für Ermittlung der Annealing Temperatur.....	76
Tabelle 28:	Reaktionsansatz für die Sondenmarkierung mit Digoxigenin (DIG) nach dem DIG Application Manual for Filter Hybridization (ROCHE DIAGNOSTICS 2000)	79
Tabelle 29:	Gelelektrophorese-Parameter für ein erfolgreiches Dig-Labeling .	80
Tabelle 30:	Nachweis von pathogener <i>Y. enterocolitica</i> in rohem Fleisch und Rohfleischprodukten	88
Tabelle 31:	Prävalenz von pathogener <i>Y. enterocolitica</i> bei den untersuchten Tierarten.....	89
Tabelle 32:	Prävalenz von pathogener <i>Y. enterocolitica</i> in rohem Fleisch und Rohprodukten vom Schwein	89
Tabelle 33:	Prävalenz von pathogener <i>Y. enterocolitica</i> in rohem Fleisch und Rohprodukten vom Rind	90
Tabelle 34:	Prävalenz von pathogener <i>Y. enterocolitica</i> in rohem Fleisch und Rohprodukten vom Geflügel	90
Tabelle 35:	Vergleich der Untersuchungsverfahren zur Ermittlung der Prävalenz von pathogener <i>Y. enterocolitica</i> in rohem Fleisch und Rohfleischprodukten von Schwein, Rind und Geflügel	91
Tabelle 36:	C _t -Werte der mit SYBR [®] Green und ailP-Sonde untersuchten Proben	92

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Denaturierung	11
Abbildung 2: Annealing	11
Abbildung 3: Extensionsphase (Elongation)	12
Abbildung 4: Schmelzkurvenanalyse. Hier ist die Temperatur auf der x-Achse gegenüber der relativen Fluoreszenzabnahme auf der y-Achse aufgetragen.....	14
Abbildung 5: Auswertung des C_t – Wertes. Der C_t -Wert gibt den Zyklus an, der zum ersten Mal das Hintergrundrauschen übersteigt.....	16
Abbildung 6: Allgemeiner Ablauf der Probenuntersuchung	60
Abbildung 7: Erstellung einer Verdünnungsreihe	69
Abbildung 8: Tropfplattenverfahren.....	70
Abbildung 9: Beispielrechnung für Tropfplattenauswertung.....	72
Abbildung 10: Optimierung der PCR-Parameter mit Gradienten	78
Abbildung 11: Sondenertragsberechnung mit Kreisflächenformel	81
Abbildung 12: Beispiel eines Computer generierten Reportes für die Ergebnisse einer Real-Time PCR Untersuchung mit SYBR [®] Green	94
Abbildung 13: Mutterplatte mit Kolonien des Reinstammes MYT 13.1D (links) und die dazugehörige Nylonmembran mit positiven Signalen (rechts)	95
Abbildung 14: Beispiel einer Nylonmembran einer Probe, die mit dem Kolonie Hybridisierungsverfahren untersucht wurde.....	96
Abbildung 15: Hybridisierungsergebnis einer Probe (262), die auf CASO- (rechts) und CIN-Agar (links) angezüchtet wurde	98

DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich bei **Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. A. Stolle** für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gewährte Unterstützung und Motivation bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei **Frau Dr. M. Fredriksson-Ahomaa** für die Möglichkeit zur Mitarbeit in ihrem Forschungsprojekt und ihre stets kompetente und überaus hilfsbereite Betreuung meiner Arbeit bedanken. Tack!

Ebenfalls möchte ich mich bei **Frau Dr. C. Mahler** für ihre freundliche Hilfe und ihre guten Ratschläge im Bereich der Molekularbiologie bedanken.

Dankende Worte möchte ich auch **Frau cand. med. vet. C. Meyer** aussprechen, die mich durch ihre aufmunternden Worte bei der Anfertigung dieser Arbeit täglich begleitet hat und mir bei Problemen immer hilfsbereit zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau **Dr. U. Gudehus**, die mir bei Computer- und Formatierungsproblemen mit guten Ratschlägen zur Seite stand.

Nicht zuletzt möchte ich **Frau H. Dietz, Frau U. Demuth, Frau S. Holzmann, Frau I. Fietzek** und **Frau U. Scheffler** ganz herzlich für die Geduld, die nette Atmosphäre und die jederzeit gewährte Hilfe im Bereich der Mikrobiologie und Molekularbiologie bedanken.

Ebenso sei an dieser Stelle allen weiteren **Mitarbeitern des Institutes** ein ganz herzliches Dankeschön für ihre motivierenden Worte und die stets entgegengebrachte Hilfe bei Problemen ausgesprochen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem **Mann Andres** sowie **meinen Eltern** dafür bedanken, dass sie mir immer geduldig zur Seite standen.

LEBENS LAUF

Name **Britta Grötzbach, geb. Kollmann**

Geburtsdatum, -ort: 07.06.1977 in Bonn-Bad Godesberg

Eltern: Ilona Hapke geb. Paes, Rolf Kollmann

Ehemann: Dipl. Ing. Andres Grötzbach

Ausbildung

1983 - 1987 Grundschule Adendorf

Grundschule Bad Neuenahr

1987 - 1996 Gymnasium Calvarienberg, Ahrweiler

Peter Joerres Gymnasium, Ahrweiler

1996 - 1999 Volontariat in Kölner Werbeagentur, begleitend

Abendstudiengang zur „Kommunikationswirtin“

1/2000 - 7/2000 Teamassistentin Kundenberatung bei

*sevensenses, Agentur für Mediendesign und Marketing, Unterföhring

8/2000 - 11/2000 Junior-Kundenberaterin bei der .start ag,
München

11/2000 - 2/2006 Studium der Veterinärmedizin, LMU München

März 2006 Approbation

Berufliche Tätigkeit

3/2006 - 4/2007 Anfertigung der Dissertation an der LMU München

5/2006 - 3/2007 Werksstudentin in der Marketingabteilung der
Novartis Tiergesundheit GmbH, München

Seit 1. April 2007 Medizinisch-wissenschaftliche Beraterin bei der
Novartis Tiergesundheit GmbH, München