

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. Dr. h.c. A. Stolle

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

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

von
Christine Knödl
aus Annweiler am Trifels

München 2008

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Dr. h.c. Stolle
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Kienzle

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
EINLEITUNG	9
LITERATURÜBERSICHT	10
1 <i>Yersinia enterocolitica</i>	10
1.1 Systematik und Eigenschaften	10
1.2 Pathogenität	13
1.3 <i>Yersinia enterocolitica</i> -Infektionen	16
1.3.1 <i>Yersinia enterocolitica</i> -Infektionen bei Menschen	16
1.3.2 <i>Yersinia enterocolitica</i> -Infektionen bei Tieren	17
1.4 <i>Yersinia enterocolitica</i> in Lebensmitteln	20
2 Nachweismethoden für <i>Yersinia enterocolitica</i>	23
2.1 Kulturelle Nachweismethoden	23
2.1.1 Anreicherung von <i>Yersinia enterocolitica</i>	23
2.1.2 KOH-Behandlung	24
2.1.3 Isolierung von <i>Yersinia enterocolitica</i>	24
2.1.4 Biochemische und serologische Identifizierung von <i>Yersinia enterocolitica</i> ...	25
2.1.5 Prüfung auf Pathogenität	26
2.2 Molekularbiologische Nachweismethoden	28
2.2.1 Polymerase Chain Reaction	28
2.2.2 Kolonie-DNA-Hybridisierung	34
3 Normen bezüglich des Nachweises von <i>Yersinia enterocolitica</i>	35
3.1 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren L 00.00-90 Horizontales Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen <i>Yersinia enterocolitica</i>	36
3.2 Nordic Committee on Food Analysis Nr. 163, 1998 Pathogenic <i>Yersinia enterocolitica</i> . PCR methods for detection in foods	39
3.3 Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln	41
3.3.1 DIN EN ISO 22174:2005 Allgemeine Anforderungen und Begriffe	41
3.3.2 DIN EN ISO 20837:2006 Anforderungen an die Probenvorbereitung für den qualitativen Nachweis	42
3.3.3 DIN EN ISO 20838:2006 Anforderungen an Amplifikation und Nachweis bei qualitativen Verfahren	42
4 Validierung mikrobiologischer Verfahren	44
EIGENE UNTERSUCHUNGEN	51
5 Material	51
5.1 Probenmaterial	51

5.1.1	Zur In house-Validierung eingesetztes Probenmaterial	51
5.1.2	Untersuchte Lebensmittelproben	51
5.2	Mikroorganismenstämme	52
5.3	Arbeitsmaterial.....	52
6	Methoden	53
6.1	Verfahren zum Nachweis von pathogenen <i>Yersinia enterocolitica</i>	54
6.2	In house-Validierung des Verfahrens zum Nachweis von pathogenen <i>Yersinia enterocolitica</i>	65
6.2.1	Überprüfung der Inklusivität und der Exklusivität des PCR-Screenings	65
6.2.2	Verfahrensvergleichsuntersuchung.....	68
6.2.3	Bestimmung der Nachweisgrenze	72
6.3	Anwendung des Verfahrens zum Nachweis von pathogenen <i>Yersinia enterocolitica</i> zur Untersuchung der Proben	73
	ERGEBNISSE	75
7	Ergebnisse der In house-Validierung	75
7.1	Ergebnisse der Überprüfung der Inklusivität und der Exklusivität des PCR-Screenings	75
7.2	Ergebnisse der Verfahrensvergleichsuntersuchung	76
7.2.1	Anwendungsbereich und Überblick.....	76
7.2.2	Überprüfung der Eignung der PCR als Screening-Verfahren	78
7.2.3	Vergleich des kulturellen Nachweises des eigenen Verfahrens mit dem amtlichen Verfahren L 00.00-90 nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches	79
7.3	Ergebnisse der Bestimmung der Nachweisgrenze.....	82
8	Ergebnisse der Untersuchung der Lebensmittelproben.....	86
8.1	Ergebnisse des PCR-Screenings	86
8.2	Ergebnisse des kulturellen Nachweises	89
8.3	Ergebnisse des PCR-Screenings und des kulturellen Nachweises im Vergleich...	94
	DISKUSSION	96
9	Aufbau des Verfahrens zum Nachweis von pathogenen <i>Yersinia enterocolitica</i>	96
10	In house-Validierung	99
10.1	Inklusivität und Exklusivität.....	99
10.2	Verfahrensvergleichsuntersuchung	100
10.3	Nachweisgrenze	102
11	Nachweis von pathogenen <i>Yersinia enterocolitica</i> in Lebensmittelproben	104
11.1	PCR-Screening.....	104
11.2	Kultureller Nachweis.....	105

11.3 Vergleich des PCR-Screenings und des kulturellen Nachweises.....	107
ZUSAMMENFASSUNG	109
SUMMARY	111
ANHANG	113
12 Probenmaterial.....	113
13 Mikroorganismenstämme.....	115
14 Nährmedien	116
14.1 Flüssige Medien	116
14.2 Feste Medien	119
15 Reagenzien und Chemikalien	123
16 Geräte und Laborbedarf.....	125
16.1 Geräte.....	125
16.2 Laborbedarf	126
17 Ergebnisse der Validierung.....	127
LITERATURVERZEICHNIS	130
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	150
TABELLENVERZEICHNIS.....	151
DANKSAGUNG.....	152
LEBENS LAUF	153

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ÄSC	Äsculin-Agar
AFS	Ammoniumferrosulfat-Lösung
Ail, <i>ail</i>	Attachment invasion locus
Anr.	Anreicherung
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton
cfu	colony forming units
CRMOX	Kongorot-Magnesium-Oxalat-Agar
CSMOX	Casein-Soja-Agar mit Magnesium und Oxalat
cm	Zentimeter
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
CVUA KA	Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
Dir	Direktausstrich
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EN	Europäische Norm
et al.	et alli
FP	Fertigpackung
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
H-Antigene	Geißelantigene
IND	Indol
Inv	Invasin
<i>inv</i>	invasion
IRG	Irgasan-Lösung
ISO	International Organization for Standardization
Iso.	Isolate
ITC	Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat

i. Tr.	in der Trockenmasse
kb	Kilobasen
KbE	Koloniebildende Einheiten
KOFER	Medium für die Kohlenhydratfermentation
KOH	Kaliumhydroxid
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch)
Lsg.	Lösung
LUA	Landesuntersuchungsamt für Chemie, Hygiene und Veterinärmedizin
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mg	Milligramm
MH	Müller-Hinton
ml	Milliliter
min	Minute
MRS	de Man, Rogosa und Sharpe
NA	Nähragar
NCTC	National Collection of Type Cultures
NMKL	Nordic Committee on Food Analysis, Nordisches Komitee für Lebensmitteluntersuchung
Nr.	Nummer
O-Antigene	Oberflächenantigene
OW	offene Ware
PC	Plate-Count
PCR	Polymerase chain reaction
PSB	Pepton-Sorbit-Gallensalz
PYR	Pyrazinamidase-Agar
pYV	Plasmid for <i>Yersinia</i> virulence
resp.	respektive
<i>rfbC</i>	Strukturgen, kodiert für Proteine der O-Antigenbiosynthese
RKI	Robert Koch Institut
s	Sekunde
SAL	Salicin
SAS	Schweizerische Akkreditierungsstelle
SK	Subkultur
spp.	Spezies
SSDC	Salmonella-Shigella-Agar mit Natriumdesoxycholat und Calciumchlorid

Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA
Temp.	Temperatur
TIC	Ticarcillin-Lösung
TM	Trade mark
TRE	Trehalose
TSB	Trypton-Soja-Nährbouillon
TWE	Tween-Esterase-Agar
U	Unit
Unters.	Untersuchung
V	Volt
vgl.	vergleiche
VirF, <i>virF</i>	Virulence Factor
XYL	Xylose
Y.	<i>Yersinia</i>
YadA, <i>yadA</i>	<i>Yersinia</i> adhesion
Y. e.	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Y. f.	<i>Yersinia frederiksenii</i>
Y. i.	<i>Yersinia intermedia</i>
Y. k.	<i>Yersinia kristensenii</i>
Yops, <i>yops</i>	<i>Yersinia</i> outer proteins
Yst, <i>yst</i>	<i>Yersinia</i> heat-stable toxin
z. B.	zum Beispiel

EINLEITUNG

Durch *Yersinia (Y.) enterocolitica* hervorgerufene gastrointestinale Erkrankungen des Menschen stellen neben der Salmonellose und der Campylobacteriose eine der häufigsten bakteriell bedingten Lebensmittelinfektionen in Deutschland dar. Der Nachweis enteropathogener *Y. enterocolitica* beim Menschen unterliegt seit Inkrafttreten des Infektionsschutzgesetzes im Januar 2001 einer bundesweiten Meldepflicht. Wegen des Vorkommens von *Y. enterocolitica* im Darm und in den Tonsillen von Schweinen gelten kontaminierte Lebensmittel tierischer Herkunft, insbesondere der Verzehr von rohem oder nicht ausreichend erhitztem Schweinefleisch und Schweinefleischprodukten, als Infektionsquelle für den Menschen. Yersinien sind psychrotroph, ihre minimale Vermehrungstemperatur liegt bei -1 °C. Daher besitzen sie vor allem in kühl zu lagernden Produkten einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Bakterien. Aufgrund dieser Fähigkeit sowie der zoonotischen Bedeutung muss *Y. enterocolitica* im Rahmen der Lebensmitteluntersuchung besondere Beachtung geschenkt werden.

Mit dem „Horizontalen Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Y. enterocolitica*“ L 00.00-90 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) ist ein normiertes Verfahren zum kulturellen Nachweis dieses Erregers in Lebens- und Futtermitteln vorhanden. Allerdings ist der kulturelle Nachweis mit einem hohen zeitlichen Aufwand verbunden und wird darüber hinaus durch unterschiedliche Probenmaterialien und die häufig stark vorhandene Begleitflora behindert. Auch die Heterogenität innerhalb der Spezies erschwert die Entwicklung von Isolierungsverfahren zur Differenzierung zwischen pathogenen und apathogenen Stämmen. Der Nachweis mittels PCR ist im Vergleich zu kulturellen Verfahren mit einem geringeren Zeitaufwand, bei gleichzeitig höherer Sensitivität und Spezifität, verbunden. Der alleinige Einsatz der PCR erlaubt jedoch keine Beurteilung der Lebensfähigkeit der nachgewiesenen Bakterien. Diese ist durch kulturelle Methoden zu überprüfen.

Ziel dieser Arbeit war es, ein kombiniertes Verfahren aus kulturellen Methoden und der PCR zu entwickeln, um in der amtlichen Lebensmitteluntersuchung über ein möglichst schnelles und zuverlässiges Routineverfahren zum Nachweis des Zoonoseerregers *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln zu verfügen. Zur Charakterisierung des Verfahrens wurde eine In house-Validierung unter den Bedingungen im Anwenderlabor durchgeführt. Zudem wurde die Eignung des Verfahrens für den Routineeinsatz anhand der Untersuchung von 100 Lebensmittelproben überprüft.

LITERATURÜBERSICHT

1 *Yersinia enterocolitica*

1.1 Systematik und Eigenschaften

Der zur Familie der *Enterobacteriaceae* zählende Genus *Yersinia*, benannt nach dem Schweizer Biologen und Entdecker des Pesterregers Alexandre Yersin (RAKIN, 2003), umfasst derzeit 12 Spezies (KLEER, 2003; SPRAGUE und NEUBAUER, 2005):

- *Y. aldovae*,
- *Y. aleksiciae*,
- *Y. bercovieri*,
- *Y. enterocolitica*,
- *Y. frederiksenii*,
- *Y. intermedia*,
- *Y. kristensenii*,
- *Y. mollaretti*,
- *Y. pestis*,
- *Y. pseudotuberculosis*,
- *Y. rohdei*,
- *Y. ruckeri*

Y. pestis, *Y. pseudotuberculosis* und verschiedene Bioserotypen von *Y. enterocolitica* sind obligate Krankheitserreger des Menschen (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004). *Y. ruckeri* ist als Erreger der „enteric redmouth disease“ bei Salmoniden für bedeutende wirtschaftliche Verluste in der Aquakultur verantwortlich (TOBBACK et al., 2007). Allerdings ist der taxonomische Status dieser Spezies aufgrund genetischer Abweichungen im G/C-Quotienten fraglich (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Bei den übrigen Spezies handelt es sich um ubiquitäre Umweltkeime, die allenfalls bei immungeschwächten Personen als opportunistische Erreger von Bedeutung sein können (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004).

Die durch *Y. pestis* hervorgerufene Pest spielt in Europa derzeit keine Rolle, ist jedoch in Naturherden in vielen Ländern Afrikas, Amerikas und Asiens verbreitet. Sie stellt eine hochinfektiöse Erkrankung von Nagetieren dar, die durch Vektoren (z. B. Rattenfloh) über den Blutweg auf den Menschen übertragen wird. Von Mensch zu Mensch ist eine direkte

Ansteckung über Aerosole möglich (RAKIN, 2003). Durch *Y. pseudotuberculosis* und pathogene *Y. enterocolitica* hervorgerufene Krankheitsbilder werden als Yersiniosen bezeichnet (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Es handelt sich dabei um oral erworbene enterale Infektionen (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004). *Y. pseudotuberculosis* gilt primär als tierpathogen und ist bei zahlreichen Wild- und Haussäugetieren zu finden. Bei Menschen wird der Erreger nur selten isoliert (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Dagegen hat *Y. enterocolitica* als häufiger Infektionserreger des Menschen in den vergangenen Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung gewonnen (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004; BOTTONE, 1999). Dies kann unter anderem auf verbesserte Diagnoseverfahren, den weltweiten Lebensmittelhandel sowie auf Änderungen im Konsumverhalten der Bevölkerung zurückgeführt werden (AMMON und BRÄUNIG, 2002).

Y. enterocolitica ist ein gram-negatives, kokkoides bis pleomorphes Stäbchenbakterium. Es ist alkalistabil, oxidasenegativ, katalasepositiv und zeigt sowohl aerobes als auch fakultativ anaerobes Wachstum (NEUBAUER et al., 2001a). Der Erreger ist in der Lage sich auch bei Kühltemperaturen zu vermehren. Die ausgeprägte Psychrotrophie wird anhand der minimalen Vermehrungstemperatur, die bei $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ liegt, verdeutlicht (KLEER, 2003). Das Wachstumsoptimum von *Y. enterocolitica* liegt bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004).

Die Spezies *Y. enterocolitica* umfasst eine heterogene Gruppe apathogener und pathogener Stämme (NEUBAUER et al., 2001a). Aufgrund der biochemischen Unterschiede wurde eine Einteilung in die Biotypen 1A, 1B, 2, 3, 4 und 5 vorgenommen (Tabelle 1). Dem Biotyp 1A werden zahlreiche apathogene Umweltisolate zugeordnet. Allerdings wurden in seltenen Fällen auch Stämme dieses Biotyps mit humanen Erkrankungen in Verbindung gebracht (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004). Der Biotyp 1B beinhaltet pathogene, erstmals in Amerika isolierte Stämme und zu den Biotypen 2, 3, 4 und 5 zählen pathogene europäische Stämme (KLEER, 2003; NEUBAUER et al., 2001a). Die Reaktionen Äsculin, Salicin und Pyrazinamidase nehmen bei der Biotypisierung eine zentrale Rolle ein, da diese bei Biotyp 1A-Stämmen positiv ausfallen und somit die Abgrenzung von den übrigen pathogenen Biotypen ermöglichen (BOTTONE, 1999).

Neben der Unterscheidung verschiedener Biotypen kann *Y. enterocolitica* auch aufgrund serologischer Eigenschaften in zahlreiche Gruppen (Serotypen) unterteilt werden. Von insgesamt 60 *Yersinia*-O-Antigenen (Oberflächenantigene) kommen 28 bei *Y. enterocolitica* vor. Zudem werden 44 *Yersinia*-H-Antigene (Geißelantigene) unterschieden, wovon 18 *Y. enterocolitica* zugeordnet werden. Die übrigen O- und H-Antigengruppen entfallen auf die

Spezies *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* und *Y. kristensenii*. Im Gegensatz zu den H-Antigenen sind die O-Antigene nicht speziesspezifisch. Dementsprechend können die häufig mit humanen Infektionen assoziierten Antigene O:3, O:8 und O:9 außer bei *Y. enterocolitica* auch bei apathogenen *Yersinia* spezies (spp.) nachgewiesen werden (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990).

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

	Biotypen					
	1A	1B	2	3	4	5
Lipase (Tween-esterase)	+	+	-	-	-	-
Äsculin	+	-	-	-	-	-
Salicin	+	-	-	-	-	-
Indol	+	+	(+)	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	-	V
Trehalose	+	+	+	+	+	-
Pyrazinamidase	+	-	-	-	-	-
β-D-Glucosidase	+	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer-Reaktion	+	+	+	+	+	(+)
Prolinpeptidase	V	-	-	-	-	-
Nitrat-Reduktion	+	+	+	+	+	-

+ = positive Reaktion, - = negative Reaktion, (+) = schwach positive Reaktion, V = variable Reaktion

1.2 Pathogenität

In kontaminierten Lebensmitteln sind *Y. enterocolitica* häufig niedrigen Temperaturen ausgesetzt. Nach alimentärer Aufnahme der Erreger ist eine Adaptation an die höheren Temperaturen im Wirtsorganismus erforderlich (BOTTONE, 1997, 1999). Zudem müssen zahlreiche Abwehrmechanismen des Wirtes überwunden werden (CORNELIS et al., 1998). Dementsprechend verfügen pathogene *Y. enterocolitica* über chromosomal und plasmid kodierte Virulenzfaktoren, die temperaturabhängig exprimiert werden und so die Etablierung im Wirtsorganismus gewährleisten (Tabelle 2). Bei niedrigen Temperaturen werden zunächst chromosomal kodierte Faktoren gebildet, die die Besiedlung ermöglichen. Nach Anpassung an höhere Temperaturen folgt die Expression weiterer, vor allem plasmid kodierter Faktoren, die in der Lage sind die unspezifische Wirtsabwehr außer Kraft zu setzen (BOTTONE, 1997).

Tabelle 2: Darstellung wichtiger Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica* (nach BOTTONE, 1999)

Lokalisation	Gen	Protein	Expressions-temperatur	Funktion
Chromosom	<i>inv</i>	Inv	28 °C	<ul style="list-style-type: none"> Anlagerung Invasion
	<i>ail</i>	Ail	37 °C	<ul style="list-style-type: none"> Anlagerung Invasion Serumresistenz
	<i>yst</i>	Yst	28 °C	<ul style="list-style-type: none"> Intestinale Flüssigkeitssekretion
Plasmid	<i>yadA</i>	YadA	37 °C	<ul style="list-style-type: none"> Anlagerung Invasion Schutz vor komplementvermittelter Oponierung und Phagozytose
	<i>virF</i>	VirF	37 °C	<ul style="list-style-type: none"> Transkriptionsaktivator
	<i>yops</i>	Yops	37 °C	<ul style="list-style-type: none"> Schutz vor unspezifischer Immunabwehr Resistenz gegenüber Phagozytose Zytotoxizität

Im Bereich des terminalen Ileums und proximalen Kolons besiedeln pathogene *Y. enterocolitica* spezialisierte Mucosa-Epithelzellen (M-Zellen) über den Lymphfollikeln der Peyerschen Platten. Die Invasion resultiert aus dem Zusammenspiel verschiedener bakterieller Virulenzfaktoren und der natürlichen Phagozytoseaktivität der M-Zellen. Nach Penetration der Zellen kommt es zur Vermehrung der Erreger im lymphatischen Gewebe, wo durch die Bildung von Mikroabszessen Gewebsschäden auftreten (BOTTONE, 1997; CORNELIS et al., 1998). Durch Freisetzung der Erreger aus den Mikroabszessen können

diese über die Lymphbahnen in die Mesenteriallymphknoten gestreut werden (KLEER, 2003).

Pathogene Stämme von *Y. enterocolitica* verfügen über die zwei chromosomal kodierten Außenmembranproteine **Inv (Invasin)** und **Ail (Attachment invasion locus)**, die für Adhäsion und Invasion verantwortlich sind. Eine maximale Inv-Produktion wird bei Temperaturen um 28 °C verzeichnet. Durch Anlagerung des Inv-Proteins an Integrin-Rezeptoren der Epithelzellen wird die Zell-Penetration eingeleitet (BOTTONE, 1997; KLEER, 2003). Bei 37 °C wird das Polypeptid Ail gebildet, das ebenfalls die Anlagerung an Wirtszellen vermittelt und deren Invasion vorantreibt, wodurch die Streuung der Erreger in die regionalen Lymphknoten, die Leber und die Milz unterstützt wird (BOTTONE, 1999). Weiterhin wird dem Ail-Protein durch Verzögerung der komplementvermittelten Abwehr eine Beteiligung an der Serumresistenz von *Y. enterocolitica* zugeschrieben (BIEDZKA-SAREK et al., 2005; BLISKA und FALKOW, 1992). Bei Untersuchungen von MILLER et al. (1989) wurde der *ail*-Locus einzig bei *Y. enterocolitica*-Stämmen, die an Krankheitsgeschehen beteiligt waren, nachgewiesen. Apathogene Stämme verfügen weder über das *ail*-Gen noch sind sie in der Lage ein funktionstüchtiges Inv-Protein zu bilden (BOTTONE, 1997; NEUBAUER, 2001a; PIERSON und FALKOW, 1990). Das Enterotoxin **Yst (Yersinia heat-stable toxin)** gilt als weiterer chromosomal kodierter Virulenzfaktor von *Y. enterocolitica*. In der Bakterienzelle wird bei Temperaturen unter 30 °C ein aus 71 Aminosäuren bestehendes Polypeptid exprimiert. Das aktive extrazelluläre Enterotoxin wird von den 30 Aminosäuren des C-terminalen Endes des Peptids gebildet (DELOR et al., 1990). Yst wird weder durch hohe noch durch niedrige pH-Werte (pH 1-11) inaktiviert. Zudem ist es sowohl gegenüber Hitze (121 °C für 30 min) als auch gegenüber Kälte (-40 °C für 5 Monate) unempfindlich (BOYCE et al., 1979). Das Toxin wird für eine Störung der Flüssigkeits- und Elektrolyt-Transport-Mechanismen in absorbierenden Darmzellen verantwortlich gemacht. Außer bei pathogenen *Y. enterocolitica* ist das *yst*-Gen auch bei apathogenen Stämmen zu finden (KLEER, 2003; NEUBAUER et al., 2001a).

Alle vollständig virulenten *Y. enterocolitica* sind Träger des ca. 70 Kilobasen (kb) großen Virulenzplasmids **pYV (plasmid for Yersinia virulence)** (PORTNOY und FALKOW, 1981). Zahlreiche phänotypische Merkmale, wie Autoagglutination bei 37 °C, Calciumabhängigkeit sowie Aufnahme von Kongorot und Kristallviolett werden mit dem Vorkommen des Virulenzplasmids assoziiert (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003; KAPPERUD, 1991). Die Eigenschaft der Calciumabhängigkeit ist durch eine Wachstumshemmung plasmidtragender Stämme bei 37 °C in calciumfreiem Medium gekennzeichnet (CORNELIS et al., 1998). Weiterhin ist eine Differenzierung kleiner

plasmidpositiver und großer plasmidnegativer Kolonien möglich (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Das Plasmid kodiert für einen als Typ-III-Sekretionssystem bekannten Mechanismus, welcher bei extrazellulären Bakterien den Transport toxischer Proteine ins Cytosol benachbarter Wirtszellen erlaubt (CORNELIS et al., 1998). Von Bedeutung sind dabei zahlreiche lösliche Proteine, die als **Yops (*Yersinia* outer proteins)** bezeichnet werden (KLEER, 2003). Der Gruppe der Yops werden verschiedene intrazelluläre Effektorproteine sowie Komponenten des Sekretions-Translokationssystems zugeordnet. Durch Kontakt mit den lymphatischen Zellen des Wirtes wird die Freisetzung der Yop-Effektoren in das Cytosol der Wirtszelle angeregt (CORNELIS, 1998, 2003). Diese ermöglichen es den Bakterien die unspezifische Immunantwort zu umgehen und sich im lymphatischen Gewebe des Wirtes zu etablieren (CORNELIS, 1998; KLEER, 2003). Durch ein Zusammenspiel verschiedener Yops wird die Resistenz gegenüber Phagozytose durch polymorphkernige Leukozyten und Makrophagen verstärkt (GROSDENT et al., 2002). Bei In-vitro-Untersuchungen wurde eine Temperaturabhängigkeit der Transkription der *yop*-Gene gezeigt. Dies wurde auf den ebenfalls plasmid kodierten Virulenzfaktor **VirF (Virulence Factor)** zurückgeführt, der bei 37 °C durch Interaktion mit dem Chromatin die Transkription der *yop*-Gene aktiviert. So konnte eine Yop-Sekretion bei einer Temperatur von 37 °C in Abwesenheit von Calcium-Ionen ausgelöst werden (CORNELIS, 1998). Ein Verlust des Virulenzplasmids führt zu einem Verlust der Yop-Sekretion (KWAGA und IVERSEN, 1993). Ein weiterer plasmid kodierter Virulenzfaktor ist das Adhäsion **YadA (*Yersinia* adhesion)**. Das Außenmembranprotein bindet an Fibronectin, Kollagen oder Laminine (NEUBAUER et al., 2001a) und leitet so den Kontakt zwischen den Epithelzellen des Wirtes und den Bakterienzellen ein. Zudem fördert es die Invasion der Wirtszellen. YadA gilt als wichtigster Faktor für die Serumresistenz von *Y. enterocolitica* und ist für das Überleben der Bakterien unentbehrlich (BIEDZKA-SAREK et al., 2005). Das Protein schützt gegen komplementvermittelte Opsonierung und somit vor Phagozytose durch polymorphkernige Leukozyten und Makrophagen (CORNELIS, 1998, 2002; KLEER, 2003). YadA wird bei 37 °C optimal gebildet und ist für die Autoagglutination plasmidtragender *Y. enterocolitica* verantwortlich (BOTTONNE, 1997).

1.3 *Yersinia enterocolitica*-Infektionen

1.3.1 *Yersinia enterocolitica*-Infektionen bei Menschen

Die durch pathogene *Y. enterocolitica* hervorgerufene humane Yersiniose stellt neben der Salmonellose und der Campylobacteriose eine der häufigsten bakteriell bedingten Magen-Darm-Infektionen in Deutschland dar (ROBERT KOCH INSTITUT, 2004a, 2006). Der Nachweis von enteropathogenen *Y. enterocolitica* im Zusammenhang mit einer akuten Erkrankung unterliegt der Meldepflicht nach § 7 des Infektionsschutzgesetzes (N.N., 2000).

Bis heute ist die Epidemiologie von *Y. enterocolitica* nicht vollständig geklärt. Allerdings wird Schweinen die größte Bedeutung als Reservoir für die Übertragung auf Menschen zugeschrieben (FEARNLEY et al., 2005; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006b; KLEER, 2003; MC NALLY et al., 2004). Der Verzehr von rohem bzw. nicht vollständig gegartem kontaminiertem Schweinefleisch gilt als Hauptinfektionsquelle für Menschen (BUCHER et al., 2005a; TAUXE et al., 1987). In Belgien ist die Zubereitung von Gerichten mit rohem Schweinefleisch landesüblich. Dort konnte nach einem stetigen Anstieg humaner Yersiniosen zwischen 1967 und 1986 durch Verbesserung der Schlachthygiene sowie durch Aufklärung der Bevölkerung hinsichtlich ihrer Verzehrsgewohnheiten ein starker Rückgang der Infektionen erreicht werden (VERHAEGEN et al., 1998). Neben Schweinefleisch konnte in der Vergangenheit auch Milch und Quellwasser für verschiedene Ausbrüche in den USA verantwortlich gemacht werden (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990; BOTTONE, 1997).

Als weitere Übertragungswege für *Y. enterocolitica* werden neben der alimentären Infektion auch der direkte Kontakt zwischen Menschen und Schweinen in der Landwirtschaft bzw. am Schlachthof, sowie der enge Kontakt zwischen Haustieren und Besitzern diskutiert (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001b; KAPPERUD, 1991).

Das Auftreten von Gruppenerkrankungen in Krankenhäusern, Kindergärten und Schulen lässt eine Übertragung von Mensch zu Mensch vermuten (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Neben dieser direkten Übertragung spielt auch die indirekte Übertragung durch infizierte Blutkonserven eine Rolle. Aufgrund ihrer psychrotrophen Eigenschaften können sich *Y. enterocolitica* in kühl gelagerten Erythrozytenkonzentraten stark vermehren. Bei einer Transfusion kommt es im Empfängerorganismus zu einer Septikämie mit meist tödlichem Ausgang infolge eines Endotoxinschocks (MEWIS et al., 1997; N.N., 1999).

In Deutschland konnten bei klinischen Erkrankungen des Menschen hauptsächlich die Serotypen O:3 (Biotyp 4), seltener O:9 (Biotyp 2 oder 3) und O:5,27 (Biotyp 2 oder 3) von

Y. enterocolitica isoliert werden, wohingegen in den USA auch der Serotyp O:8 (Biotyp 1B) regelmäßig als Erreger intestinaler Yersiniosen nachgewiesen wird. Seit 2001 wurde allerdings auch in Deutschland der Bioserotyp 1B/O:8 bei drei Patienten für das Auftreten fieberhafter Darmerkrankungen verantwortlich gemacht. In allen drei Fällen konnte die Infektionsquelle nicht ermittelt werden (KLEER, 2003; ROBERT KOCH INSTITUT, 2004b).

Die Inkubationszeit bei *Y. enterocolitica*-Infektionen beträgt ca. 3-10 Tage. Als Symptome der akuten Yersiniose gelten Durchfall, krampfartige Bauchschmerzen (Pseudoappendizitis), Tenesmen, Erbrechen sowie Fieber (ROBERT KOCH INSTITUT, 2007). Weiterhin wurden Entzündungen im Halsbereich beschrieben (TAUXE et al., 1987). Als Komplikation kann es, insbesondere bei immungeschwächten Patienten, zu Septikämien mit Abszedierungen in innere Organe wie Leber und Milz kommen. Im Anschluss an die akute Phase der Infektion können immunologisch bedingte Reaktionen wie Erythema nodosum, reaktive Arthritis, Myokarditis und Glomerulonephritis auftreten. Während diese extraintestinalen Folgeerkrankungen hauptsächlich bei Erwachsenen vorkommen, zeigen junge Patienten in der Regel die oben genannten gastrointestinalen Symptome (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004; BOTTONE, 1997; NEUBAUER et al., 2001c, ROBERT KOCH INSTITUT, 2004b; TAUXE et al., 1987). Die höchste Yersiniose-Inzidenz ist bei Kleinkindern im Alter von 1-4 Jahren festzustellen. Mit zunehmendem Alter ist ein Abfall der Inzidenz zu beobachten (ROBERT KOCH INSTITUT, 2006).

Der Erregernachweis ist aus Stuhlproben, Darmbiopsie- und Operationsmaterial, Blut, sowie aus Material lokaler Herde möglich. Ein Anstieg des Antikörpertiters im Anschluss an eine Infektion wird zur Diagnose postinfektiöser Erkrankungen genutzt. Mittels ELISA oder Immunoblot erfolgt der Nachweis von Antikörpern gegen Zellwand- oder plasmid kodierte Proteine (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Auch bei epidemiologischen Untersuchungen werden Antikörpernachweis-Verfahren eingesetzt (N.N., 1999).

1.3.2 *Yersinia enterocolitica*-Infektionen bei Tieren

Y. enterocolitica konnte bei zahlreichen Tierarten nachgewiesen werden. In den meisten Fällen sind diese Tiere asymptomatische Träger des Bakteriums. Nur selten treten klinische Erscheinungen wie Störung des Allgemeinbefindens und Erkrankungen des Darmtraktes auf (NEUBAUER et al., 2001b). Die Erregerisolierung ist sowohl aus Tonsillen, als auch aus Kot infizierter Tiere möglich. Dies legt eine überwiegend oral-alimentäre Übertragung des Erregers nahe (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004).

***Yersinia enterocolitica*-Infektionen bei Schweinen**

Schweine gelten als die wichtigsten Träger pathogener *Y. enterocolitica*. Es handelt sich dabei überwiegend um den Bioserotyp 4/O:3 (BUCHER et al., 2005a). In der Mundhöhle klinisch gesunder Tiere, insbesondere in den Tonsillen, konnten hohe Gehalte dieser Keime festgestellt werden (NESBAKKEN, 1988). Ebenso gelang der Nachweis des Erregers in Kotproben (BHADURI et al., 2005). Klinisch manifestiert sich die Yersiniose beim Schwein vor allem als Jungtiererkrankung mit Enteritiden, Arthritiden und Pneumonien. Bei Sauen konnten Fruchtbarkeitsstörungen und Aborte beobachtet werden (NEUBAUER et al., 2001b). Verschiedene Untersuchungen zur Verwandtschaft von Stämmen menschlicher und porziner Herkunft bekräftigen die Vermutung, dass Schweine eine der Hauptinfektionsquellen für Menschen darstellen (FEARNLEY et al., 2005; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006b; MC NALLY et al., 2004).

***Yersinia enterocolitica*-Infektionen bei Wiederkäuern**

Untersuchungen zeigen, dass Rinder, insbesondere Jungtiere, pathogene *Y. enterocolitica*-Isolate beherbergen können. Vor allem *Y. enterocolitica* Serotyp O:9 wurde aus dem Kot infizierter Tiere isoliert (GOURDON et al., 1999; KITTELBERGER et al., 1995). Epidemiologische Studien ergaben eine steigende Anzahl an mit *Y. enterocolitica* infizierten Rinderbeständen in Frankreich seit 1990 (GOURDON et al., 1999). Dagegen konnten in Bayern in Kot- und Tonsillenproben von Kälbern und Bullen keine pathogenen *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden. Nach diesen Untersuchungen spielen Rinder als Reservoir für pathogene *Y. enterocolitica* eine untergeordnete Rolle (BUCHER et al., 2002).

Auch bei kleinen Wiederkäuern wurden pathogene *Y. enterocolitica*-Stämme nachgewiesen (SLEE und SKILBECK, 1992). Klinische Erkrankungen sind bei diesen Tierarten jedoch selten und stehen meist im Zusammenhang mit prädisponierenden Faktoren wie z. B. Endoparasitosen oder Transportstress (BIN-KUN et al., 1994; SLEE und BUTTON, 1990). Bei Lämmern konnte Durchfall beobachtet werden (WUTHE und ALEKSIC, 1997). Vergleichende Untersuchungen von menschlichen und tierischen Stämmen unterstreichen die Möglichkeit, dass neben Schweinen auch Schafe als potentielle Infektionsquelle für Menschen gelten können (FEARNLEY et al., 2005; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006a). In Sachsen wurden Kotproben von Ziegen auf das Vorkommen von *Y. enterocolitica* untersucht, wobei keine humanpathogenen Stämme nachgewiesen wurden. Somit werden Lebensmittel caprinen Ursprungs nicht als wichtige Quelle humaner Yersiniosen angesehen (ARNOLD et al., 2006).

***Yersinia enterocolitica*-Infektionen bei Hund und Katze**

Bei Hunden und Katzen wurde neben apathogenen Stämmen vor allem der pathogene Bioserotyp 4/O:3 isoliert. Infektionen verlaufen bei diesen Tierarten überwiegend asymptomatisch. Klinische Krankheitserscheinungen, wie Durchfall, treten vor allem bei jüngeren Tieren auf (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001a; FUKUSHIMA et al., 1984). Untersuchungen von FENWICK et al. (1994) belegen, dass Hunde nach experimenteller Infektion mit *Y. enterocolitica* 4/O:3 als asymptomatische Träger den Erreger über Wochen hinweg ausscheiden.

FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001a) stellten einen Zusammenhang zwischen der Verfütterung von rohem Schweinefleisch und der Infektion bei Hunden und Katzen fest. Weitere Untersuchungen zeigten eine Übereinstimmung des Genotyps von aus Hunden und Katzen isolierten 4/O:3-Stämmen mit Stämmen menschlicher und porziner Herkunft. Die Verfütterung von kontaminiertem Material an Haustiere deutet somit auf einen möglichen Übertragungsweg des Erregers auf den Menschen hin (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001b).

***Yersinia enterocolitica*-Infektionen bei Hase, Kaninchen und Chinchilla**

Aufgrund des Vorkommens bestimmter Stämme bei diesen Tierarten, wurden die Begriffe „Hasentyp“ bzw. „Chinchillatyp“ von *Y. enterocolitica* geprägt. Neben dem Auftreten einer Enterokolitis mit Gewichtsverlust zeichnet sich die Erkrankung bei diesen Tierarten auch durch die Ausbildung von Granulomen aus. Das Krankheitsbild ähnelt der durch *Y. pseudotuberculosis* hervorgerufenen Rodentiose (WUTHE und ALEKSIC, 1992, 1997).

1.4 *Yersinia enterocolitica* in Lebensmitteln

Der Verzehr von rohem bzw. nicht durcherhitztem, mit pathogenen *Y. enterocolitica* kontaminiertem Schweinefleisch wird als Infektionsquelle für den Menschen angesehen (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang die hohe Kontaminationsrate der Tonsillen beim Schwein. Während des Schlacht- und Zerlegeprozesses besteht die Gefahr der Verschleppung von *Y. enterocolitica*, wodurch es zu einer Kontamination der Innereien und des Tierkörpers kommen kann (BUCHER et al., 2005b). Dementsprechend wurden rohe Produkte vom Schwein vielfach auf das Vorkommen pathogener *Y. enterocolitica* untersucht (Tabelle 3). Eine hohe Prävalenz an pathogenen *Y. enterocolitica* wurde insbesondere bei Zungen und Innereien vom Schwein festgestellt (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001c). In Hackfleisch und rohem Schweinefleisch war die Nachweisrate insgesamt geringer, wobei jedoch mittels Polymerase chain reaction (PCR) vor allem in Backenfleisch hohe Werte ermittelt wurden (JOHANNESSEN et al., 2000). Auch in Rohwürsten (Salami), die aus Schweinefleisch hergestellt wurden, konnten durch Einsatz der PCR pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden (THISTED LAMBERTZ et al., 2007).

Tabelle 3: Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln vom Schwein

Proben vom Schwein	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl (n) positiver Proben				Referenz
		kulturell		PCR		
		n	%	n	%	
Zungen	51	40	78	47	92	FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 1999
Innereien	34	17	50	21	62	FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2000
Darm	350	28	8	278	79	BOYAPALLE et al., 2001
Hackfleisch	255	4	2	63	25	FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 1999
	100	32	32	47	47	VISHNUBHATLA et al., 2001
	350	0	0	133	38	BOYAPALLE et al., 2001
	100	5	5	35	35	THISTED LAMBERTZ et al., 2007
Fleisch	300	6	2	50	17	JOHANNESSEN et al., 2000
Salami	97	0	0	11	11	THISTED LAMBERTZ et al., 2007

Neben Schweinefleischprodukten wurden auch verschiedene Lebensmittel anderer Tierarten untersucht. IBRAHIM und MAC RAE (1991) konnten *Y. enterocolitica* in Rind- und Lammfleisch nachweisen. Auch aus Fisch und Geflügel (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001c) sowie aus Rohmilch (IBRAHIM und MAC RAE, 1991; SCHIEMANN und TOMA, 1978) wurden die Erreger isoliert. Wie diese Untersuchungen zeigen, konnten *Y. enterocolitica* in einem breiten Spektrum an Lebensmitteln nicht porzinen Ursprungs nachgewiesen werden, allerdings wurden diese Stämme überwiegend als apathogen eingestuft (DE BOER, 1995; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001c; IBRAHIM und MAC

RAE, 1991; KAPPERUD, 1991; SCHIEMANN und TOMA, 1978). Von der Isolierung pathogener *Y. enterocolitica* aus Hackfleisch vom Rind berichteten VISHNUBHATLA et al. (2001). Im Rahmen derselben Studien wurden mittels PCR pathogene *Y. enterocolitica* in Tofu detektiert. Durch Einsatz der PCR konnten bei weiteren Untersuchungen auch in Salat und in Huhn pathogene Stämme nachgewiesen werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* in anderen Lebensmitteln

Lebensmittel	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl (n) positiver Proben				Referenz
		kulturell		PCR		
		n	%	n	%	
Hackfleisch vom Rind	100	23	23	31	31	VISHNUBHATLA et al., 2001
Geflügel	43	0	0	0	0	FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001c
	98	0	0	9	9	LINDBLAD et al., 2006
	108	0	0	1	0,9	GRÖTZBACH, 2007
Fisch	200	0	0	0	0	FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001c
Salat	101	0	0	3	3	FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001c
	200	0	0	6	3	JOHANNESSEN et al., 2002
Tofu	50	0	0	6	12	VISHNUBHATLA et al., 2001

Die höhere Nachweisrate pathogener *Y. enterocolitica* mittels PCR in verschiedenen Lebensmitteln lässt vermuten, dass durch Einsatz herkömmlicher kultureller Nachweisverfahren in früheren Studien die tatsächliche Kontamination unterschätzt wurde (VISHNUBHATLA et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass neben Schweinefleisch auch andere Lebensmittel mit pathogenen *Y. enterocolitica* kontaminiert sein können. Allerdings wurden bei diesen Produkten nur niedrige Prävalenzen ermittelt, weshalb rohe Schweinefleischprodukte nach wie vor als wichtigste Quelle pathogener *Y. enterocolitica* gelten (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001c). So wird die Kreuzkontamination durch Schweinefleisch als wahrscheinlichste Ursache für den Eintrag pathogener *Y. enterocolitica* in andere Lebensmittel angesehen (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004; BUCHER et al., 2005b; DE BOER, 1995)

Aus lebensmittelhygienischer Sicht ist der Einfluss verschiedener wachstumsbedingender Faktoren auf das Vorkommen von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln zu berücksichtigen. Wegen der Hitzeempfindlichkeit der Erreger werden diese durch Pasteurisation üblicherweise abgetötet (SCHIEMANN, 1978). Nach einem sekundären Eintrag im Anschluss an die Pasteurisation wird allerdings das Wachstum von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln aufgrund der Abwesenheit der bakteriellen Begleitflora begünstigt (BOTTONE, 1997; SCHIEMANN, 1987). Von besonderer Bedeutung ist die Psychrotrophie von *Y. enterocolitica* durch die damit verbundene Vermehrung des Erregers in kühl gelagerten

Produkten (BOTTONE, 1999; KAPPERUD, 1991). Auch bei strikter Kühlung ist insbesondere in Lebensmitteln mit pH-Werten im neutralen Bereich eine schnelle Vermehrung möglich (KLEER, 2003). So wurde bei längerer Lagerung eine Anreicherung von *Y. enterocolitica* in Rohmilch bei 4 °C beschrieben (HEIM et al., 1985). Auch von der Vermehrung in vakuumverpacktem Fleisch bei Kühltemperaturen wurde berichtet (KAPPERUD, 1991). Darüber hinaus konnte bei gefroren gelagerten Lebensmitteln keine Verringerung der Keime festgestellt werden (HEIM et al., 1985). Es wurde gezeigt, dass *Y. enterocolitica* längere Perioden bei -20 °C unbeschadet überstehen kann (BHADURI, 2005). Der Gefriervorgang stellt somit keine Alternative zum Durchgaren von Lebensmitteln dar, um Infektionen zu vermeiden (BHADURI, 2005, 2006). In Lebensmitteln mit Begleitflora wird die Möglichkeit einer Inhibition von *Y. enterocolitica* durch die Bildung von Bakteriozinen diskutiert (BOTTONE, 1997). In ausreichend gereiften Rohwürsten konnte ein allmähliches Absterben der Erreger beobachtet werden. Dies wurde auf die Entwicklung der Reifungsflora, den sinkenden pH-Wert, den steigenden Kochsalzgehalt sowie den Wasserverlust zurückgeführt. In frischen nur kurz gereiften Rohwürsten ist dagegen eine erhöhte Überlebenschance der Erreger gegeben (HEIM et al., 1985). Untersuchungen zur Übertragung von *Y. enterocolitica* bei der Käseherstellung aus Rohmilch zeigten, dass es beim Herstellungsprozess sowie bei der Reifung des Käses zu einem Absterben der Keime kommt (SCHIEMANN, 1978).

2 Nachweismethoden für *Yersinia enterocolitica*

2.1 Kulturelle Nachweismethoden

2.1.1 Anreicherung von *Yersinia enterocolitica*

In Lebensmitteln steht die meist geringe Anzahl an *Y. enterocolitica* einer Vielzahl an Begleitkeimen entgegen. Daher nehmen bei der Isolierung der Erreger Anreicherungsverfahren eine bedeutende Stellung ein. Allerdings ist es aufgrund der Heterogenität der Spezies schwierig ein Verfahren zu entwickeln, welches den Nachweis aller pathogenen Stämme gleichermaßen ermöglicht (SCHIEMANN, 1982). Beispielsweise unterscheiden sich die einzelnen pathogenen Serotypen in ihrer Toleranz gegenüber verschiedenen selektiven Komponenten in Anreicherungsmedien (KAPPERUD, 1991). Trotz zahlreicher veröffentlichter Nachweistechiken konnte bisher kein einheitliches und sicheres Verfahren zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* entwickelt werden (BUCHER et al., 2005a). Die Auswahl des Verfahrens muss sich folglich am Untersuchungsziel orientieren. Eine Kombination verschiedener Verfahren ermöglicht den Nachweis eines breiteren Spektrums an *Yersinia*-Stämmen (DE BOER, 1995; SCHIEMANN, 1982).

Aufgrund ihrer Psychrotrophie haben *Yersinia* spp. bei niedrigen Temperaturen einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Bakterien. Diese Eigenschaft erklärt den häufigen Einsatz der Kälteanreicherung zum Nachweis von *Y. enterocolitica* sowohl aus Lebensmitteln als auch aus Fäzes (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003; SCHIEMANN, 1982). Bei Temperaturen zwischen 22 °C und 32 °C weisen die meisten Begleitkeime eine vergleichsweise höhere Teilungsgeschwindigkeit auf, wodurch es zu einer Unterdrückung des Yersinienwachstums kommt. Durch eine Verringerung der Bebrütungstemperatur wird eine Angleichung der Generationszeiten erreicht (AULISIO et al., 1980; SCHIEMANN und OLSON, 1984). Die Kälteanreicherung erfolgt in der Regel bei 4 °C. Allerdings muss bei dieser Temperatur, in Abhängigkeit von der Ausgangskontamination und der Art der verwendeten Anreicherungsbouillon, mit einer Zeitspanne von zwei bis vier Wochen für den Nachweis von *Y. enterocolitica* gerechnet werden (AULISIO et al., 1980).

WAUTERS et al. (1988) entwickelten die Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Bouillon (ITC), welche erfolgreich zur selektiven Anreicherung des in Europa vorherrschenden Serotyps O:3 eingesetzt werden kann. Allerdings ist dieses Medium nicht für die Anzucht der Bioserotypen 1B/O:8, 2/O:9 und 2/O:5,27 geeignet (N.N., 2004a). Untersuchungen zeigen eine verringerte Wachstumsrate des zweithäufigsten europäischen Serotyps O:9 im Vergleich zu Serotyp O:3. Durch Verwendung eines ITC-Mediums ohne Chlorat und mit verringerter Konzentration

an Magnesiumchlorid und Malachitgrün kann jedoch eine verbesserte Wachstumsrate dieses Serotyps erreicht werden (DE ZUTTER et al., 1994).

Neben der ITC-Bouillon wird im „Horizontalen Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Y. enterocolitica*“ L 00.00-90 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB die Pepton-Sorbit-Gallensalz-Bouillon (PSB) als weiteres Anreicherungsmedium beschrieben (N.N., 2004a). Diese wurde aus der Sorbit-Gallensalz-Bouillon entwickelt und erwies sich als geeignet zur Anreicherung verschiedener Serotypen von *Y. enterocolitica* (WEAGANT und KAYSNER, 1983).

2.1.2 KOH-Behandlung

Aufgrund ihrer Alkalitoleranz besitzen *Yersinia* spp. in alkalischem Milieu einen Selektionsvorteil gegenüber Begleitkeimen. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Behandlung der Probe mit 0,5 %iger KOH-Lösung im Anschluss an eine Anreicherung zunutze (AULISIO et al., 1980). So kann eine Steigerung der Isolationsrate von *Y. enterocolitica* verzeichnet werden (DE BOER, 1995). SCHIEMANN (1983) konnte jedoch eine Beeinflussung der Alkalitoleranz von *Y. enterocolitica* durch verschiedene Faktoren nachweisen. So hing der Erfolg der KOH-Behandlung von der Art des Anreicherungsmediums, der Temperatur und der Phase des Zellzyklus ab.

2.1.3 Isolierung von *Yersinia enterocolitica*

Zur Isolierung von *Y. enterocolitica* wurden zunächst Nährböden eingesetzt, die eine Selektivität für verschiedene andere enteropathogene Keime besitzen. Dazu zählen zum Beispiel der Salmonellen-Shigellen-Agar und der MacConkey-Agar (DE BOER, 1995; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003; VERHAEGEN et al., 1998). Durch Neuentwicklung bzw. Modifikation bereits bekannter Nährmedien ist allerdings auch eine Reihe *Yersinia*-selektiver Nährmedien verfügbar (BUCHER et al., 2005b).

SCHIEMANN (1979b) entwickelte den für *Y. enterocolitica* selektiven Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar (CIN). Die zugesetzten Antibiotika hemmen das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Proteus mirabilis*. Durch den Abbau von Mannit zu Säuren und einen damit verbundenen Farbumschlag des Neutralrots erscheinen verdächtige Kolonien mit himbeerrotem Zentrum und einer klaren Randzone. Bei einer Bebrütung über 48 Stunden bei 22 °C oder über 24 Stunden bei 32 °C konnte im Vergleich zu Salmonellen-Shigellen- und MacConkey-Agar eine Erhöhung der Nachweisrate für *Y. enterocolitica* sowie eine Reduktion der Begleitflora erzielt werden (SCHIEMANN, 1979). Allerdings sind Kolonien von *Citrobacter freundii*, *Serratia liquefaciens*

und *Enterobacter agglomerans* auf diesem Agar nicht eindeutig von *Y. enterocolitica*-Kolonien zu unterscheiden (HEAD et al., 1982).

Die hohe Resistenz von *Y. enterocolitica* gegenüber Desoxycholat wurde bei der Modifikation des Salmonellen-Shigellen-Agar durch Zusatz von Natriumdesoxycholat und Calciumchlorid genutzt (WAUTERS, 1973). Allerdings wird auf diesem Agar das Wachstum verschiedener *Morganella*, *Proteus*, *Serratia* und *Aeromonas* spp. nicht gehemmt, wodurch diese Keime nur schwer von *Yersinia* spp. zu differenzieren sind (DE BOER, 1992). Der SSDC-Agar findet neben dem CIN-Agar Anwendung im amtlichen Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB (N.N., 2004a).

2.1.4 Biochemische und serologische Identifizierung von *Yersinia enterocolitica*

Zur biochemischen Differenzierung von *Y. enterocolitica*-verdächtigen Kolonien eignet sich der Urea-Schrägagar (DEVENISH und SCHIEMANN, 1981). Enteropathogene *Y. enterocolitica* zeichnen sich durch eine positive Harnstoff-Spaltung aus. Die Überprüfung dieser Eigenschaft stellt somit eine schnelle und einfache Möglichkeit für eine erste Selektion verdächtiger Kolonien dar (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990; NEUBAUER et al., 2001a). Durch das Enzym Urease, wird die Spaltung des im Urea-Schrägagar vorhandenen Harnstoffs zu Ammoniak und Carbamat katalysiert. Letzteres zerfällt zu Ammoniak und Kohlendioxid (DE KONING-WARD und ROBINS-BROWNE, 1995; MOBLEY et al., 1995). Die daraus resultierende Alkalisierung des Agars wird durch Farbumschlag des Indikators angezeigt. Neben verschiedenen *Yersinia* spp. besitzen auch andere *Enterobacteriaceae*, wie z. B. *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. oder *Serratia* spp., eine Urease-Aktivität. Diese Keime zeigen jedoch im Vergleich zu *Y. enterocolitica* eine verzögerte Reaktion (VUYE und PIJCK, 1973).

Weiterhin stehen zur biochemischen Identifizierung von *Yersinia* spp. verschiedene kommerzielle Testsysteme, wie z. B. das standardisierte System API® 20 E der Firma BIOMÉRIEUX, zur Verfügung. Bei diesem System konnte durch eine von den Herstellerangaben abweichende Inkubation des Teststreifens bei 28 °C anstatt bei 37 °C für *Y. enterocolitica* eine positive Identifikationsrate von 93 % erreicht werden (ARCHER et al., 1987). Bei vergleichenden Untersuchungen verschiedener Systeme zur Identifizierung von *Yersinia* spp. erwies sich das API® 20 E-System am geeignetsten. Sowohl auf Genus- als auch auf Spezies-Ebene wurde die höchste Sensitivität erreicht. Ebenso zeichnet sich das System durch ein gutes Preis-Leistungsverhältnis aus (ARNOLD et al., 2004; NEUBAUER et al., 1998).

Aufgrund der differierenden biochemischen Eigenschaften innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* wurde von WAUTERS et al. (1987) ein Schema zur Biotypisierung vorgestellt. Dieses ermöglicht anhand verschiedener biochemischer Reaktionen die Zuordnung der Stämme zu den Biotypen 1A, 1B, 2, 3, 4 und 5 (Tabelle 1).

Die serologische Identifizierung von *Y. enterocolitica* erfolgt durch Objektträgeragglutination (NEUBAUER et al., 2001a). Pathogene *Y. enterocolitica* werden häufig den Serotypen O:3, O:5,27, O:8 oder O:9 zugeordnet (BOTTONI, 1999). Für diese am Häufigsten auftretenden O-Antigene stehen kommerzielle Agglutinationsseren zur Verfügung (NEUBAUER et al., 2001a). Allerdings sind die Antigene O:3, O:5, O:8 und O:9 nicht speziesspezifisch und können außer bei *Y. enterocolitica* auch bei anderen, apathogenen *Yersinia* spp. vorkommen (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990).

2.1.5 Prüfung auf Pathogenität

Innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* sind neben pathogenen auch zahlreiche apathogene Stämme vertreten. Aufgrund der Korrelation der Pathogenität mit bestimmten Biotyp-Serotyp-Kombinationen ist eine Differenzierung zwischen pathogenen und apathogenen Stämmen durch parallele Bestimmung von Bio- und Serotyp möglich (BOTTONI, 1999; FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003; KAPPERUD, 1991).

Die im Rahmen der Biotypisierung durchgeführten Tests auf Salicin-Fermentation, Äsculin-Hydrolyse und Pyrazinamidaseaktivität erlauben eine erste Differenzierung zwischen apathogenen und potentiell pathogenen Stämmen von *Y. enterocolitica* (BUCHER et al., 2005b). Stämme mit negativer Pyrazinamidase-Aktivität, einer chromosomal kodierten Eigenschaft, werden als potentiell pathogen eingestuft (KANDOLO und WAUTERS, 1985). Zudem sind diese Stämme nicht oder nur verzögert in der Lage Salicin zu fermentieren und Äsculin zu hydrolysieren. Apathogene Stämme zeigen in diesen Tests hingegen positive Reaktionen (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990; RILEY und TOMA, 1989).

Pathogene *Y. enterocolitica*-Stämme zeichnen sich durch den Besitz eines Virulenzplasmids aus. Der Nachweis dieses Plasmids kann phänotypisch anhand des Autoagglutinationstests in Voges-Proskauer-Bouillon erfolgen. Plasmidtragende Stämme zeigen eine positive Autoagglutination nach 24 h Bebrütung bei 37 °C (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004).

Der Einsatz des von RILEY und TOMA (1989) beschriebenen Kongorot-Magnesium-Oxalat-Agars (CRMOX) ermöglicht die Untersuchung auf die beiden plasmid kodierten Eigenschaften Calciumabhängigkeit und Kongorotaufnahme. Bei einer Inkubation des Agars über 24 Stunden bei 36 °C bilden plasmidtragende und somit pathogene Stämme kleine rote,

CRMOX-positive Kolonien. Kommt es im Laufe der Subkultivierung zu einem Verlust des Virulenzplasmids, treten große farblose Kolonien auf CRMOX auf. Diese potentiell pathogenen Isolate zeigen weder Pyrazinamidase-Aktivität noch Salicin-Fermentation oder Äsculin-Hydrolyse. Die Kombination der Tests auf Salicin-Fermentation, Äsculin-Hydrolyse und Pyrazinamidase-Aktivität mit CRMOX ermöglicht somit eine Unterscheidung zwischen pathogenen, potentiell pathogenen und apathogenen Stämmen (RILEY und TOMA, 1989).

2.2 Molekularbiologische Nachweismethoden

2.2.1 Polymerase Chain Reaction

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) stellt eine vielversprechende, da schnelle Methode zum Nachweis pathogener Keime in Lebensmitteln dar (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003). Sie erlaubt die gezielte in vitro Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Abschnitten. Die PCR wird in so genannten Thermocyclern durchgeführt, die einen zyklischen Temperaturverlauf der Reaktion ermöglichen. Der Reaktionsansatz der PCR besteht aus einer Lösung mit Oligonukleotidprimern, Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs), Reaktionspuffer, hitzestabiler DNA-Polymerase und Ziel-DNA (Template). Bei den Oligonukleotidprimern handelt es sich um kurze einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden des Templates sind. Ein PCR-Zyklus umfasst die Schritte Denaturierung (denaturation), Anlagerung (annealing) und Verlängerung (elongation) der Primer. Im ersten Schritt wird durch eine Erhöhung der Temperatur auf 93-100 °C eine Denaturierung der DNA-Doppelhelix erreicht. Es kommt zu einer Auftrennung der in natürlichem Zustand durch nichtkovalente Wasserstoffbrücken verbundenen, antiparallel verlaufenden DNA-Einzelstränge. Im zweiten Schritt führt eine Verringerung der Temperatur auf 37-65 °C zur Bindung der Primer an die DNA-Matrize. Im dritten Schritt verlängert eine hitzestabile DNA-Polymerase die Primer durch Anfügen von dNTPs bei 72 °C. Das wiederholte Durchlaufen des Zyklus führt zu einer nahezu exponentiellen Vermehrung der zur Matrize komplementären DNA-Stränge. Mit steigender Anzahl der Zyklen kommt es jedoch vermehrt zu unerwünschten Artefakten ohne einen weiteren Anstieg der Ziel-DNA, weshalb nur selten mehr als 40 Zyklen durchgeführt werden. Zu diesem Zeitpunkt hybridisieren die amplifizierten DNA-Stränge untereinander und konkurrieren so mit den Primern. Zudem wird die Effektivität durch die im Laufe der Reaktion verminderte Enzymmenge und -aktivität begrenzt. Die Dauer der PCR richtet sich nach der Anzahl der Zyklen sowie der Zeit, die der Thermocycler zum Aufheizen und Abkühlen benötigt (ramp time). Eine optimale Abstimmung der Reaktionsbedingungen auf das zu amplifizierende Zielgen sollte angestrebt werden, um negative Einflüsse auf die PCR zu minimieren. So ist ein geeignetes Primersystem in Verbindung mit einem angemessenen Temperatur-Zeit-Profil sowie einer entsprechenden Anzahl an Zyklen zu wählen (NEWTON und GRAHAM, 1994).

Der Nachweis der PCR-Endprodukte (Amplikons) erfolgt bei der konventionellen PCR mit Hilfe der Gelelektrophorese, bei der die Produkte im Agarose- oder Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Zur Abschätzung der Länge der Amplikons wird ein Größenmarker mit auf das Gel aufgetragen. Die Anfärbung der DNA wird durch Zugabe des fluoreszierenden

Farbstoffs Ethidiumbromid erreicht. Dieser interkaliert in der doppelsträngigen DNA, welche unter ultravioletter Bestrahlung sichtbar wird (NEWTON und GRAHAM, 1994).

Bei der Real-time PCR erfolgt die Detektion der PCR-Produkte über die Emission von Fluoreszenzsignalen während der Amplifikation. Dazu werden entweder fluoreszierende Farbstoffe oder Fluorophor-markierte Sonden eingesetzt. Während sich die Farbstoffe unspezifisch an doppelsträngige DNA anlagern und somit auch Primerdimere und unspezifische PCR-Produkte detektiert werden können, binden die Sonden spezifisch an eine komplementäre Sequenz des amplifizierten DNA-Strangs. Beide Methoden erlauben eine fortlaufende Messung der proportional zur Menge der PCR-Produkte ansteigenden Fluoreszenz und somit die Überwachung der Reaktion in „Echt-Zeit“. Verglichen mit der konventionellen PCR stellt die Real-time PCR ein geschlossenes System dar, bei welchem die Notwendigkeit der Bearbeitung der PCR-Produkte im Anschluss an die Amplifikation entfällt. Daraus resultiert eine deutliche Einsparung an Arbeitszeit sowie ein verringertes Risiko einer Kontamination der Umgebung (HEID et al., 1996; MACKAY, 2004)

Während des gesamten Verlaufs der PCR besteht die Gefahr einer Kontamination, sei es durch verunreinigte Reagenzien bzw. Arbeitsmaterialien oder auch durch Staub und Aerosole. Eine räumliche Trennung der Arbeitsbereiche, sowie das Tragen von Laborkitteln und Handschuhen steuern zur Verhinderung einer Kontamination des Reaktionsansatzes bei. Eine Dekontamination kann mit Hilfe einer 3 %igen Hypochlorit-Lösung oder durch UV-Bestrahlung erfolgen. Beide Methoden bewirken eine Zerstörung der DNA, so dass eine Verschleppung verhindert wird (DIN EN ISO 22174, 2005; NEWTON und GRAHAM, 1994). Um Verunreinigungen sowie Inhibitionen der PCR auszuschließen, ist die Durchführung von Kontrollreaktionen erforderlich (Abschnitt 3.3.1 und Abschnitt 3.3.3). Negative Kontrollen ohne Zielsequenz erlauben die Beurteilung falsch-positiver Ergebnisse, z. B. in Folge einer Kontamination. Positive Kontrollen mit Zielsequenz lassen hingegen eine mögliche Inhibition der Reaktion und somit falsch-negative Ergebnisse erkennen (BALLAGI-PORDANY und BELAK, 1996; N.N., 2004b).

Einsatz der PCR bei Reinkulturen

Die PCR gilt als zuverlässige und sensitive Methode sowohl zur Identifikation als auch zur Überprüfung der Pathogenität *Y. enterocolitica*-verdächtiger Isolate (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003; THISTED LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM, 2005). Ein Erhitzungsschritt vor der PCR wird insbesondere bei gram-negativen Bakterien eingesetzt, um durch Lyse der Zellmembran die Freisetzung der Bakterien-DNA zu ermöglichen (DIN EN ISO 20837, 2006). Auch hitzelabile PCR-Inhibitoren werden in diesem

Zusammenhang abgebaut (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003). Allerdings wird bei *Y. enterocolitica* das Vorkommen hitzestabiler DNasen beschrieben, die bei einer ausschließlich auf einem Erhitzungsschritt basierenden DNA-Extraktion nicht zerstört werden (NAKAJIMA et al., 1994). Verschiedene Untersuchungen zeigen nach einer Lagerung über Nacht bei 4 °C einen Abbau der PCR-Produkte, wodurch falsch negative Ergebnisse auftreten können. Es wurde eine Temperaturabhängigkeit festgestellt, wobei der Abbau mit steigender Lagertemperatur beschleunigt wird. Die Durchführung eines Proteinase K-Verdau vor der Erhitzung bewirkt eine Zerstörung der DNasen und verhindert dadurch den Abbau der PCR-Produkte (NAKAJIMA et al., 1994; N.N., 2004b).

Einsatz der PCR bei Lebensmitteln

Wird die PCR zum Nachweis von *Y. enterocolitica* aus natürlichen Proben eingesetzt, ist verglichen mit der Identifikation von Reinkulturen eine reduzierte Sensitivität festzustellen. Dies wird auf die zum Teil komplexe Zusammensetzung verschiedener Probenmaterialien und das damit verbundene mögliche Auftreten von PCR-Inhibitoren zurückgeführt (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003; THISTED LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM, 2005). Ob und welche Inhibitoren eine Rolle spielen, ist von der Art der zu untersuchenden Probenmaterialien, sowie den im Rahmen der Untersuchung eingesetzten Reagenzien abhängig (NEWTON und GRAHAM, 1994). ROSSEN et al. (1992) überprüften den Einfluss verschiedener Lebensmittel, Anreicherungsmedien, Lösungen zur DNA-Extraktion sowie deren Komponenten auf die PCR. Dabei wurde eine PCR-Inhibition durch die zur Anreicherung pathogener *Y. enterocolitica* häufig verwendete PSB, insbesondere durch die darin enthaltenen Gallensalze, festgestellt. Auch wurde eine Abhängigkeit der Menge an homogenisiertem Probenmaterial, welche ohne inhibitorische Effekte direkt in die PCR eingesetzt werden kann, von der Art des Lebensmittels gezeigt. Während auch größere Mengen an gekochtem Schinken keine negativen Einflüsse auf die PCR ausübten, wurden bei komplexeren Lebensmitteln wie Salami und Hähnchensalat mit steigender Probenmenge Inhibitionen deutlich. Die Überprüfung von Weichkäse ergab darüber hinaus eine Hemmung der PCR bei allen zur Untersuchung herangezogenen Konzentrationen. Dies wurde auf das Vorkommen von Proteasen zurückgeführt, welche eine Zerstörung der Polymeraseaktivität bewirken (ROSSEN et al., 1992). Auch DICKINSON et al. (1995) stellten eine Abhängigkeit der Sensitivität der PCR von der Art des untersuchten Lebensmittels fest. Insbesondere bei schlecht löslichen, fettreichen Käsen wurde eine verringerte Sensitivität ermittelt. LANTZ et al. (1998) berichteten von inhibitorischen Effekten bei direkter Zugabe von 5 µl Schweinefleisch- bzw. Schweinehackfleischhomogenaten (Verdünnung 1:1 bzw. 1:10) zum Reaktionsansatz.

Probenvorbereitung

Ziel der Probenvorbereitung ist es, den Nachweis geringer Konzentrationen an Zielkeimen zu ermöglichen, konkurrierende Begleitkeime zu unterdrücken sowie PCR-inhibierende Substanzen abzutrennen (DIN EN ISO 20837, 2006). Die Sensitivität der PCR wird durch die Effizienz der Probenvorbereitung beeinflusst (LANTZ et al., 1998).

Eine bei den meisten Verfahren eingesetzte Anreicherung vor der PCR ermöglicht die Vermehrung der Zielorganismen bei einer gleichzeitigen Verdünnung von letalen Zellen und inhibitorischen Komponenten (KNUTSSON et al., 2002; WAAGE et al., 1999). So wird ein Anstieg der Sensitivität erreicht und der Nachweis lebensfähiger Zellen gewährleistet (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003). Durch Verwendung nicht-selektiver Anreicherungsmedien können subletal geschädigte *Y. enterocolitica* wiederbelebt werden. Es werden dabei jedoch auch Begleitkeime vermehrt, die möglicherweise das Wachstum der vorhandenen *Y. enterocolitica* unterdrücken (THISTED-LAMBERTZ et al., 2000). Das Wachstum der Begleitflora kann durch Einsatz selektiver Anreicherungsmedien verringert werden (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003; LANTZ et al., 1998).

Durch Konzentration der Zielkeime mit Hilfe der Zentrifugation kann die Dauer der Anreicherung verkürzt werden (KNUTSSON et al., 2002). Allerdings werden bei diesem Vorgang auch PCR-Inhibitoren verdichtet (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003). Um eine negative Beeinflussung der PCR zu vermeiden, sollte daher die Zentrifugation nur zum Einsatz kommen, wenn das Anreicherungsmedium frei von inhibitorischen Komponenten ist (KNUTSSON et al., 2002). Eine Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit kommt ebenso wie die passive Sedimentation bei der Abtrennung grober Partikel zur Anwendung (KAPPERUD et al., 1993).

Im Vergleich zur einfachen Zentrifugation ist die Buoyant density centrifugation (Dichtegradientenzentrifugation) auch für Proben mit hohen Gehalten an PCR-Inhibitoren geeignet, da dieses Verfahren die Abtrennung der Bakterien von weiteren Probenkomponenten ermöglicht (LINDQVIST et al., 1997). Die einzelnen Bestandteile sedimentieren während der Zentrifugation in einem Gradientenmedium wie beispielsweise Percoll® (AMERSHAM BIOTECH PHARMACIA, Uppsala, Sweden) oder BactXtractor™ (QRAB, Balsta, Sweden) und sammeln sich entsprechend ihrer Dichte in einer bestimmten Schicht des Mediums an. Auf diese Weise wird die Entfernung von inhibitorischen Substanzen bei gleichzeitiger Konzentration von *Y. enterocolitica* erreicht (KNUTSSON et al., 2002; LANTZ et al., 1998; THISTED-LAMBERTZ et al., 2000; THISTED-LAMBERTZ, 2005).

Zur Vorbereitung von Wasserproben auf die PCR eignet sich der Einsatz der Membranfiltration mit anschließender Inkubation des Filters in flüssigen Anreicherungsmedien (KAPPERUD et al., 1993; WAAGE et al., 1999).

Die Immunomagnetische Separation, bei welcher paramagnetische Partikel mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenantigene von *Y. enterocolitica* beschichtet sind, ermöglicht die Konzentration und Separation von *Y. enterocolitica* bei gleichzeitiger Entfernung inhibierender Substanzen (KAPPERUD et al., 1993).

In stark kontaminierten Lebensmitteln ist eine Beeinträchtigung der PCR durch hohe Zellkonzentrationen möglich. Ein Verdünnungsschritt vor der PCR kann eine Inhibition durch zu hohe DNA-Gehalte verhindern (KNUTSSON und RÅDSTRÖM, 2002; WAAGE et al., 1999). Gleichzeitig kann eine Verringerung inhibitorischer Probenkomponenten erreicht werden (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003).

DNA-Extraktion

Bei dem häufig zur DNA-Extraktion aus *Y. enterocolitica* eingesetzten Verfahren des Proteinase-K-Verdaus (BHADURI und COTTRELL, 1998; JOHANNESSEN et al., 2000; WAAGE et al., 1999; WEYNANTS et al., 1996) kommt es neben einem Abbau von Zellwandproteinen und hitzestabilen DNasen (NAKAJIMA et al., 1994) ebenfalls zu einer Zerstörung PCR inhibierender Substanzen (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003). Das Verfahren erwies sich in Kombination mit der Ausfällung der extrahierten DNA durch Isopropanol als geeignet zur Probenvorbereitung beim Nachweis von *Y. enterocolitica* aus rohem Geflügelfleisch und Käse mittels PCR (DICKINSON et al., 1995).

Eine weitere Möglichkeit zur DNA-Extraktion zum Nachweis von *Y. enterocolitica* aus natürlichen Proben ist die Phenol-Chloroform-Behandlung mit anschließender Ethanol-Ausfällung. Dieses Verfahren ist jedoch sehr arbeits- und zeitaufwändig und damit für große Probenzahlen wenig geeignet (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003; LANTZ et al., 1998; WEYNANTS et al., 1996).

Zur DNA-Aufreinigung stehen darüber hinaus kommerzielle Kits zur Verfügung. Diese erlauben die Abtrennung von PCR-Inhibitoren unter Einsparung von Arbeits- und Zeitaufwand (BHADURI und PICKARD, 1995). Beim Vergleich verschiedener Methoden zur Probenvorbereitung wurde die Buoyant density centrifugation zwei kommerziell erhältlichen Kits zur DNA-Aufreinigung (DNeasy[®] Tissue Kit von QIAGEN und PrepMan[®] Ultra Sample Preparation Reagent von APPLIED BIOSYSTEMS) gegenübergestellt. Die

Probenvorbereitung mittels DNeasy® Tissue Kit von QIAGEN lieferte bei nicht angereicherten Homogenaten die besten Ergebnisse, während nach Anreicherung vergleichbare Ergebnisse bei der Buoyant density centrifugation und der Aufreinigung mittels DNeasy® Tissue Kit von QIAGEN erzielt wurden (THISTED-LAMBERTZ et al., 2007). Bei vergleichenden Untersuchungen der kommerziell erhältlichen Extraktionskits DNeasy® Tissue Kit von QIAGEN, Genomic Tissue Kit von BIO RAD und InstaGene™ Matrix von BIO RAD konnten Differenzen in der Höhe der DNA-Ausbeute in Verbindung mit unterschiedlichen Nachweisraten von pathogenen *Y. enterocolitica* festgestellt werden. Auch wurden Unterschiede im Arbeits- und Zeitaufwand der einzelnen Protokolle deutlich. Die höchste Nachweisrate wurde nach Aufarbeitung mit dem Genomic Tissue Kit von BIO RAD erzielt. Dagegen ist die Aufarbeitung mittels InstaGene™ Matrix von BIO RAD in deutlich kürzerer Zeit möglich (HARTMANN, 2007).

Zielgene zur Detektion von *Yersinia enterocolitica*

Zum molekularbiologischen Nachweis von *Y. enterocolitica* wurden zahlreiche PCR-Verfahren entwickelt, wobei sowohl auf dem Virulenzplasmid pYV als auch auf dem Bakterienchromosom lokalisierte Virulenzfaktoren unterschiedlicher Spezifität detektiert wurden (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003).

Das *ail*-Gen stellt das am häufigsten zum Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* verwendete chromosomale Zielgen dar (FENWICK und MURRAY, 1991; NAKAJIMA et al., 1992; NILSSON et al., 1998; NMKL, 1998; THISTED-LAMBERTZ et al., 2000; THISTED-LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM, 2005; WEYNANTS et al., 1996). Daneben wurden auch Verfahren mit den ebenfalls auf dem Chromosom lokalisierten Genen *inv* und *yst* beschrieben (NAKAJIMA et al., 1992; THISTED-LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM, 2005; WEYNANTS et al., 1996). Während *ail* bisher nur bei pathogenen Stämmen nachgewiesen werden konnte, ist das *inv*-Gen bei allen *Y. enterocolitica* vorhanden (NEUBAUER et al., 2001a). Das *yst*-Gen wurde darüber hinaus auch bei weiteren *Enterobacteriaceae*, z. B. *Salmonella* spp., *Escherichia coli* oder *Citrobacter freundii*, bestätigt (KWAGA et al., 1992). Der Nachweis des häufig an lebensmittelbedingten Erkrankungen beteiligten Serotyps O:3 von *Y. enterocolitica* wird durch den Einsatz von PCR-Methoden mit dem chromosomalen *rfbC* ermöglicht (THISTED LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM, 2005; WEYNANTS et al., 1996). WREN und TABAQCHALI (1990) entwickelten ein PCR-Verfahren mit dem plasmid kodierten Zielgen *virF*. Seither wurden zahlreiche Verfahren mit *virF*-spezifischen Primern beschrieben (NAKAJIMA et al., 1992; NILSSON et al., 1998; NMKL, 1998; THISTED-LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM, 2005; WEYNANTS et al., 1996). Allerdings ist das *virF*-Gen außer bei pathogenen *Y. enterocolitica*

auch bei *Y. pseudotuberculosis* vorhanden (WREN und TABAQCHALI, 1990). Auch das ebenfalls plasmid kodierte *yadA* stellt ein regelmäßig detektiertes Gen dar (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003; NEUBAUER et al., 2000; NMKL, 1998).

Im Laufe der Subkultivierung, insbesondere bei längerer Lagerung der Kulturen oder bei Bebrütungstemperaturen über 30 °C, besteht die Gefahr eines Verlusts des Virulenzplasmids (BLAIS und PHILLIPPE, 1995; THOERNER et al., 2003). Um falsch-negativen Ergebnissen vorzubeugen wurden PCR-Verfahren entwickelt, die durch gleichzeitige Detektion chromosomal und plasmid kodierter Gene den Nachweis sowohl plasmidpositiver als auch plasmidnegativer pathogener Isolate ermöglichen (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003). NILSSON et al. (1998) entwickelten eine solche Multiplex-PCR zur Detektion von pathogenen *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln unter Verwendung von *ail*- und *virF*-spezifischen Primern. Der Einsatz der Multiplex-PCR eignet sich zur schnellen Identifizierung verschiedener *Yersinia*-Stämme. Zudem ist eine Abgrenzung von pathogenen zu apathogenen Serotypen möglich (THISTED LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM, 2005). Eine für *Y. pseudotuberculosis* spezifische Sequenz des *inv*-Gens in Kombination mit den Genen *ail* und *virF* erlaubt die Differenzierung pathogener *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* (NAKAJIMA et al., 1992). Die Kombination der vier verschiedenen Gene *ail*, *yst*, *rfbC* und *virF* ermöglicht die Unterscheidung zwischen *Y. pseudotuberculosis*, pathogenen *Y. enterocolitica* O:3 und anderen pathogenen *Y. enterocolitica* (THISTED LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM, 2005).

2.2.2 Kolonie-DNA-Hybridisierung

Die Kolonie-DNA-Hybridisierung stellt eine weitere Möglichkeit des molekularbiologischen Nachweises pathogener *Y. enterocolitica* dar. Dabei werden Gensonden eingesetzt, die an bakterielle DNA-Sequenzen von chromosomal oder plasmidkodierten Virulenzfaktoren binden. Häufig detektierte Zielgene sind *virF*, *yadA*, *inv* oder *yst* (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003; NESBAKKEN et al., 1991). Kleine Mengen von homogenisiertem Probenmaterial werden auf festen Nährmedien aufgebracht und die enthaltenen Keime angezüchtet. Durch Auflage einer Membran wird ein Abklatsch der Kolonien angefertigt. In weiteren Arbeitsschritten werden die Bakterienzellen auf der Membran lysiert und die DNA freigesetzt. Es folgt die eigentliche Hybridisierung bei der die Gensonden, welche beispielsweise mit Enzymen markiert wurden, an den komplementären Abschnitt der Bakterien-DNA binden. Durch Zugabe chromogener Substrate können gesuchte Kolonien anhand einer positiven Farbreaktion identifiziert werden. Aufgrund des Einsatzes spezifischer Gensonden ist eine Identifizierung der Mikroorganismen auch aus Mischkulturen möglich, wodurch zeitaufwändige Isolierungs- und Identifizierungsschritte entfallen (HILL und KEASLER, 1991).

3 Normen bezüglich des Nachweises von *Yersinia enterocolitica*

In diesem Abschnitt werden Vorschriften und Normen vorgestellt, die für den Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* von Bedeutung sind. Es werden sowohl Möglichkeiten zum kulturellen Nachweis des Erregers als auch zum molekularbiologischen Nachweis mittels PCR erörtert.

Eine Vorschrift zum kulturellen Nachweis findet sich im „**Horizontalen Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Y. enterocolitica***“ L 00.00-90 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. Es handelt sich dabei um die Übernahme der gleichnamigen nationalen Norm DIN EN ISO 10273:2003 (DIN: Deutsches Institut für Normung e.V., EN: Europäische Norm, ISO: International Organization for Standardization), basierend auf dem internationalen Standard ISO 10273:2003.

Für den molekularbiologischen Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* werden in der Methode Nr. 163, 1998 "**Pathogenic *Y. enterocolitica*. PCR methods for detection in foods**" des Nordic Committee on Food Analysis (des Nordischen Komitees für Lebensmitteluntersuchung, NMKL) zwei alternative PCR-Methoden beschrieben.

Weitere Angaben für die Entwicklung eines PCR-Systems zur Detektion pathogener Erreger finden sich in den Normen

- **DIN EN ISO 22174:2005 Allgemeine Anforderungen und Begriffe,**
- **DIN EN ISO 20837:2006 Anforderungen an die Probenvorbereitung für den qualitativen Nachweis,**
- **DIN EN ISO 20838:2006 Anforderungen an Amplifikation und Nachweis bei qualitativen Verfahren,**

unter dem allgemeinen Titel „Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln“.

3.1 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren L 00.00-90 Horizontales Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Yersinia enterocolitica*

Mit dem „Horizontalen Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Y. enterocolitica*“ L 00.00-90 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB ist ein normiertes Verfahren zum kulturellen Nachweis präsumtiv pathogener *Y. enterocolitica* in Lebens- und Futtermitteln vorhanden (Abbildung 1).

Das Verfahren umfasst die aufeinanderfolgenden Schritte:

- Anreicherung in selektiven flüssigen Medien
- Ausstreichen und Identifizieren
- Bestätigung

Die Anreicherung erfolgt in den beiden Selektivmedien Pepton-Sorbit-Gallensalz-Bouillon (PSB) und Irgasan™-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Bouillon (ITC). Die so gewonnene PSB-Kultur wird zum einen direkt, zum anderen nach Durchführung einer Laugenbehandlung in Kaliumhydroxidlösung auf Cefsulodin-Irgasan™-Novobiocin-Agar (CIN) ausgestrichen. Der Ausstrich der ITC-Kultur erfolgt auf Salmonella-Shigella-Agar mit Natriumdesoxycholat und Calciumchlorid (SSDC-Agar). Im Anschluss an die Bebrütung der Medien wird die Anwesenheit charakteristischer Kolonien von *Y. enterocolitica* überprüft. Die für die Bestätigung ausgewählten Kolonien werden zunächst einer orientierenden Prüfung mit Urease-, Indol-, und Oxidasenachweis sowie Glucose- und Lactoseabbau im Kligler-Agar unterzogen. Es folgt die biochemische Bestätigung verdächtiger Isolate mithilfe des Lysin-Decarboxylase-Mediums, des Ornithin-Decarboxylase-Mediums, den Medien zur Vergärung von Saccharose, Rhamnose, Trehalose und Xylose, dem Simmons-Medium zur Citrathydrolyse sowie dem Tween-Esterase-Test. An Stelle dieser Tests dürfen auch kommerziell erhältliche biochemische miniaturisierte Kits zur Identifizierung von *Y. enterocolitica* eingesetzt werden. Die präsumtive Pathogenität wird mithilfe der Prüfung des Äsculinabbaus, der Pyrazinamidaseaktivität und der Calciumabhängigkeit bei 37 °C beurteilt. Gegebenenfalls werden serologische Untersuchungen der Isolate durchgeführt (N.N., 2004a).

Das Verfahren setzt sich aus einer Vielzahl von Einzeltests zusammen und spiegelt somit die Problematik wieder, dass der Spezies *Y. enterocolitica* zahlreiche Stämme unterschiedlicher Bio- und Serotypen zugeordnet werden, die sich in ihrer Toleranz gegenüber verschiedenen selektiven Komponenten in Nährmedien unterscheiden (KAPPERUD, 1991). Aufgrund dieser

Heterogenität verfügen die bis heute entwickelten kulturellen Verfahren lediglich über eine geringe Sensitivität und Spezifität für den Nachweis pathogener *Y. enterocolitica*. Vergleichende Untersuchungen einer Vielzahl von bis heute beschriebenen Verfahren, einschließlich der Methode nach ISO 10273 (entspricht dem amtlichen Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB), liefern widersprüchliche Ergebnisse (N.N., 2004b). HANK (2003) verglich in ihrer Dissertation mehrere Nachweismethoden in Anlehnung an die standardisierten Verfahren ISO 10273 und NMKL-Methode Nr. 117. In keinem der Verfahren konnten alle vorgefundenen *Y. enterocolitica* Isolate gleichzeitig nachgewiesen werden. Es bedarf somit der Kombination verschiedener Verfahren, um eine gewisse Sensitivität in der Routinediagnostik zu erzielen (ALDOVA et al., 1990; NEUBAUER et al., 2001a).

Bei der Erarbeitung des Internationalen Standards ISO 10273 wurden die gesammelten Erfahrungen für Anreicherung und Identifizierung von *Y. enterocolitica* aus Nahrungs- und Futtermittelproben zusammengefasst. Die Kombination verschiedener Tests ließ so eine ausführliche Methodensammlung entstehen, die jedoch mit einem hohen Arbeits- und Zeitaufwand verbunden ist. Für den Einsatz in Routinelaboratorien erscheint das Verfahren dadurch wenig geeignet (NEUBAUER et al., 2001a).

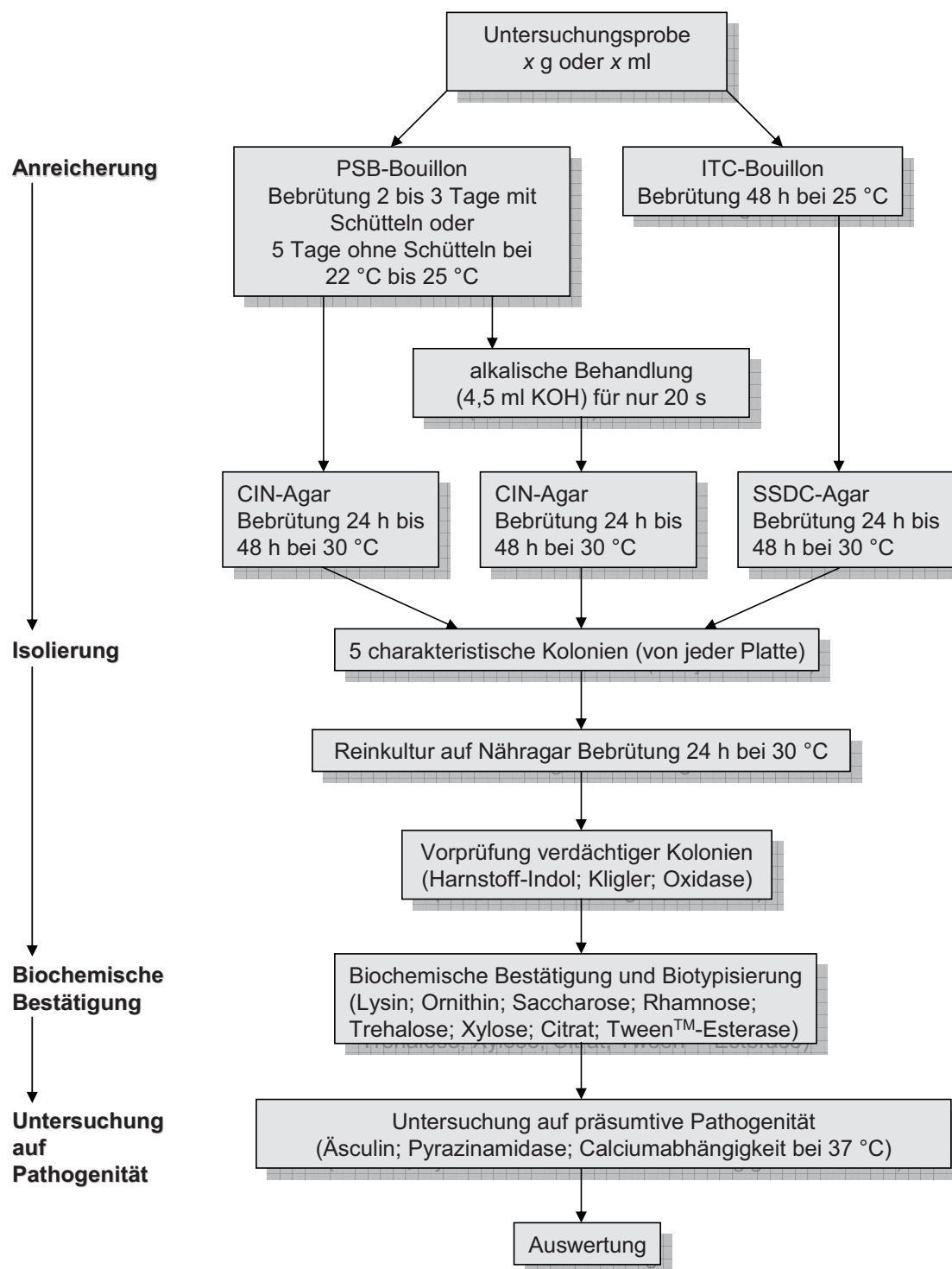


Abbildung 1: Verfahrensdiagramm gemäß dem „Horizontalen Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Y. enterocolitica*“ L 00.00-90 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches

CIN = Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin, ITC = Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat, KOH = Kaliumhydroxid, PSB = Pepton-Sorbit-Gallensalz, SSDC = Salmonella-Shigella-Agar mit Natriumdesoxycholat und Calciumchlorid

3.2 Nordic Committee on Food Analysis Nr. 163, 1998

Pathogenic *Yersinia enterocolitica*. PCR methods for detection in foods

Mit der NMKL-Methode Nr. 163 besteht ein weiteres standardisiertes Verfahren zum Nachweis pathogener *Y. enterocolitica*. Es wird der molekularbiologische Nachweis des Keimes anhand zweier alternativer PCR-Methoden dargestellt (Tabelle 5).

Methode A beschreibt ein kombiniertes Verfahren aus PCR und kulturellem Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* in rohem Fleisch und Fleischprodukten. Es wird zunächst eine Anreicherung in Trypton-Soja-Bouillon (TSB) durchgeführt. Durch Aufreinigung der so erhaltenen Kultur wird eine Bakteriensuspension hergestellt, aus der ein Teil für die Durchführung der PCR, ein weiterer Teil für den Ausstrich auf CIN-Agar verwendet wird. Die Bestätigung verdächtiger Kolonien auf CIN-Agar kann mittels konventioneller Methoden, wie z. B. dem API® 20 E oder der Serotypisierung, erfolgen. Das validierte PCR-Verfahren stellt eine „one-step PCR“ auf das chromosomale Zielgen *ail* dar, welches in pathogenen *Y. enterocolitica* vorkommt. Es wird dabei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 454 Basenpaaren (bp) amplifiziert. Das Verfahren wird sowohl zum direkten Nachweis des Keimes aus der Bakteriensuspension, als auch zur Überprüfung der Pathogenität der Isolate eingesetzt.

Aufgrund der Lokalisation des *ail*-Gens auf dem Bakterienchromosom, werden sowohl *Y. enterocolitica* mit, als auch ohne Virulenzplasmid detektiert. Da jedoch nur Stämme mit Virulenzplasmid als vollständig virulent eingestuft werden, wird auf die Durchführung einer zusätzlichen PCR mit dem plasmoidalen Zielgen *virF* verwiesen. Mittels des beschriebenen Primerpaares wird ein 700 bp langes DNA-Fragment vervielfältigt.

Zur Bestätigung der detektierten PCR-Produkte kann optional eine „nested PCR“ durchgeführt werden. Diese besteht aus zwei aufeinander folgenden PCR-Schritten, wobei ein Teil des im ersten Schritt erhaltenen PCR-Produkts (Fragmentlänge *ail*: 454 bp, *virF*: 700 bp, siehe oben) im zweiten PCR-Schritt als Template eingesetzt wird. Zu diesem zweiten PCR-Schritt wird für die Gene *ail* und *virF* jeweils ein Primerpaar genannt (Fragmentlänge *ail*: 359 bp, *virF*: 606 bp).

Sowohl die Untersuchung auf das Zielgen *virF* als auch die „nested PCR“ werden im Anhang behandelt und sind somit nicht Bestandteil des validierten Abschnitts der Methode A.

Methode B beinhaltet den Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln mithilfe einer „two-step (nested) PCR“. Als Zielgen dient das auf dem Plasmid der Bakterien lokalisierte *yadA*. Dieses ist lediglich bei vollständig virulenten *Y. enterocolitica* vorhanden. Apathogene *Yersinia* spp. sowie pathogene *Y. enterocolitica*-Stämme ohne Virulenzplasmid werden nicht detektiert. Im ersten PCR-Schritt wird ein 750 bp großes DNA-Fragment amplifiziert, welches im zweiten PCR-Schritt als Template eingesetzt wird. Die Länge des zweiten Fragments beträgt 530 bp.

Beim alleinigen Einsatz der PCR ist die Unterscheidung ob es sich bei einem positiven Ergebnis um amplifizierte Gene toter oder lebendiger Bakterien handelt nicht möglich. Um eine Aussage treffen zu können ob das entsprechende Produkt mit lebensfähigen Yersinien kontaminiert war, muss daher eine Bestätigung dieses Ergebnisses über kulturelle Referenzverfahren erfolgen (NMKL, 1998).

Tabelle 5: Vergleichende Darstellung der alternativen PCR-Methoden A und B gemäß NMKL Nr. 163, 1998

	Zielgen	PCR-Schritt	Primer	Fragmentlänge	PCR-Programm
Methode A	<i>ail</i>	I	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 5' GTT TAT CAA TTG CGT CTG TTA ATG TGT ACG 3' ➢ 5' CTA TCG AGT TTG GAG TAT TCA TAT GAA GCG 3' 	454 bp	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 1 Zyklus 92 °C 30 s, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min ➢ 1 Zyklus 92 °C 30 s, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min ➢ 1 Zyklus 92 °C 30 s, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min ➢ 1 Zyklus 92 °C 30 s, 51 °C 1 min, 72 °C 1 min ➢ 30 Zyklen 92 °C 30 s, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min ➢ 1 Zyklus 72 °C 7 min
		II	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 5' CTA TTG GTT ATG CGC AAA GC 3' ➢ 5' TGG AAG TGG GTT GAA TTG CA 3' 	359 bp	
	<i>virF</i>	I	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 5' AAG GTT GTT GAG CAT TCA CAA GAT GG 3' ➢ 5' TTT GAG TGA AAT AAG ACT GAC TCG AGA ACC 3' 	700 bp	
		II	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 5' TCA TGG CAG AAC AGC AGT CA 3' ➢ 5' GGC AAT ATC AAC AAT ACT CAT CTT ACC 3' 	606 bp	
Methode B	<i>yadA</i>	I	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 5' TAA GAT CAG TGT CTC TGC GGC A 3' ➢ 5' TAG TTA TTT GCG ATC CCT AGC AC 3' 	750 bp	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 95 °C für 3 min ➢ 40 Zyklen 95 °C 30 s, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min 30 s ➢ 72 °C für 10 min
		II	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 5' GCG TTG TTC TCA TCT CCA TAT GC 3' ➢ 5' GGC TTT CAT GAC CAA TGG ATA CAC 3' 	530 bp	

validiert
 nicht validiert

bp = Basenpaare

3.3 Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln

3.3.1 DIN EN ISO 22174:2005 Allgemeine Anforderungen und Begriffe

Diese Norm beinhaltet Begriffsdefinitionen sowie allgemeine Anforderungen an die mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln und Futtermitteln mithilfe der PCR. Somit soll sichergestellt werden, dass in verschiedenen Laboren vergleichbare, reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können.

Es wird eine Gliederung der Untersuchung in mehrere aufeinander folgende Schritte vorgenommen:

Mikrobielle Voranreicherung: Falls erforderlich kann eine Anreicherung des Zielkeimes in selektiven oder nicht-selektiven flüssigen Nährmedien erfolgen.

Nukleinsäureaufarbeitung: Es wird ein Aufschluss der Zellen des nachzuweisenden Mikroorganismus bewirkt, so dass die darin enthaltene DNA freigesetzt wird.

Amplifikation mittels PCR: Im Anschluss an die Nukleinsäureaufarbeitung erfolgt die zyklische Vervielfältigung der spezifischen Nukleinsäuresequenzen. Ein PCR-Zyklus umfasst die drei aufeinander folgenden Schritte: Auftrennung der doppelsträngigen Nukleinsäure, Anlagerung der Primer sowie Verlängerung der Primer durch eine hitzestabile DNA-Polymerase.

Nachweis und Bestätigung von PCR-Produkten: Der Nachweis von PCR-Produkten erfolgt mithilfe der Gelelektrophorese oder anderer geeigneter Verfahren (Abschnitt 3.3.3).

Um eine unbeabsichtigte Kontamination mit DNA zu vermeiden werden allgemeine Anforderungen an Laboratorien genannt. Diese umfassen neben einer räumlichen Trennung der Arbeitsbereiche auch das Verfolgen eines „Einbahnstraßen-Prinzips“ bei der Probenhandhabung.

Zur Überprüfung der jeweiligen Schritte der Untersuchung müssen entsprechende Kontrollen mitgeführt werden. Die Häufigkeit der Kontrollreaktionen sowie die Beurteilung der möglichen PCR-Ergebnisse sind in dieser Norm festgelegt. Positive PCR-Kontrollen (mit Zielsequenz) und negative PCR-Kontrollen (ohne Zielsequenz) müssen bei jeder Probencharge enthalten sein. Außerdem ist bei jeder Reaktion eine interne oder externe Amplifikationskontrolle mitzuführen. Weitere Kontrollen wie eine positive und eine negative Prozesskontrolle sowie eine negative Extraktionskontrolle sind in regelmäßigen Zeitabständen durchzuführen, die im

Qualitätssicherungsprogramm des Labors festgelegt werden müssen. Diese sind auch dann erforderlich, wenn die anderen Kontrollen nicht die erwarteten Ergebnisse liefern (DIN EN ISO 22174, 2005).

3.3.2 DIN EN ISO 20837:2006 Anforderungen an die Probenvorbereitung für den qualitativen Nachweis

Diese Vorschrift steht im Zusammenhang mit den Normen DIN EN ISO 22174:2005 und DIN EN ISO 20838:2006. Es werden allgemeine Prinzipien der Probenbehandlung und Nukleinsäureextraktion im Rahmen der PCR detaillierter dargestellt. Auf diese Weise sollen Proben oder Nukleinsäuren von geeigneter Qualität und Quantität bereitgestellt werden.

Für die **Anreicherung und Probenbehandlung** wird bei einigen Mikroorganismen auf spezifische Normen verwiesen. Im Falle von *Y. enterocolitica* wird die Norm ISO 10273 genannt.

Zur **DNA-Freisetzung und -Aufreinigung** können verschiedene Verfahren eingesetzt werden, wie z. B. der Abbau der Proteine im Zellextrakt mittels Proteasen, das Ausfällen der resultierenden Peptide mit organischen Lösungsmitteln oder der thermische Aufschluss der Zellen durch zehnteiliges Kochen mit anschließender Zentrifugation. Ebenso können kommerzielle Kits zur DNA-Extraktion verwendet werden (DIN EN ISO 20837, 2006).

3.3.3 DIN EN ISO 20838:2006 Anforderungen an Amplifikation und Nachweis bei qualitativen Verfahren

Mit dieser Norm ist eine Ergänzung zu den Normen DIN EN ISO 22174:2005 und DIN EN ISO 20837:2006 vorhanden, die eine detailliertere Darstellung der allgemeinen Anforderungen an die Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen sowie des Nachweises und der Bestätigung der Amplifikate beinhaltet. Somit soll eine eindeutige Aussage über das Vorhandensein oder Fehlen der untersuchten Zielsequenz getroffen werden können.

Bei der **Amplifikation mittels PCR** handelt es sich um einen zyklisch ablaufenden Prozess der sich aus Denaturierung der doppelsträngigen Nukleinsäure, Anlagerung und Verlängerung der Primer zusammensetzt.

Der **Nachweis von PCR-Produkten** wird z. B. mithilfe der Gelelektrophorese (Agarose- oder Polyacrylamidgel) oder der Säulenchromatographie erbracht, wobei die Abschätzung der Größe der Amplifikate durch einen parallel laufenden Nukleinsäure-Standard bekannter Länge erfolgt. Im Rahmen der Real Time-PCR-Analyse finden die Amplifikation sowie der Nachweis der PCR-Produkte gleichzeitig statt.

Die **Bestätigung der Identität der PCR-Produkte** kann z. B. durch Einsatz einer nested PCR bzw. der Hybridisierung, Restriktionsanalyse oder DNA-Sequenzierung des PCR-Produktes erfolgen. Ebenso ist die Bestätigung eines positiven PCR-Ergebnisses durch ein mikrobiologisches Kultivierungsverfahren möglich.

In die Auswertung fließen die Ergebnisse der nach DIN EN ISO 22174 festgelegten Kontrollen mit ein. Das **Ergebnis** der PCR wird entweder als

- **positiv**, wenn ein spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen wurde, und sämtliche Kontrollen die erwarteten Ergebnisse liefern, oder
- **negativ, innerhalb der Nachweisgrenzen**, wenn kein spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen wurde, und sämtliche Kontrollen die erwarteten Ergebnisse liefern beurteilt (DIN EN ISO 20838, 2006).

4 Validierung mikrobiologischer Verfahren

Der Bedarf an schnellen und/oder leicht durchführbaren mikrobiologischen Nachweisverfahren, führt vielfach zur Entwicklung von neuen Untersuchungsverfahren oder von Alternativverfahren zu bestehenden international anerkannten Referenzmethoden (DIN EN ISO 16140, 2003). Anhand einer Validierung werden diese Methoden charakterisiert und auf ihre Eignung geprüft (HÜBNER et al., 2002). Es existieren verschiedene Vorschriften, die allgemeine Prinzipien zur Validierung mikrobiologischer Verfahren festlegen:

- DIN EN ISO 16140:2003 Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren
- AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis (FELDSINE et al., 2002)
- NordVal: Protocol for the validation of alternative microbiological methods (N.N., 2007)

Diese Vorschriften umfassen sowohl die Validierung qualitativer als auch quantitativer Verfahren. Es werden jeweils zwei Phasen der Validierung beschrieben. Zum einen die Durchführung einer Vergleichsuntersuchung des alternativen Verfahrens gegenüber dem Referenzverfahren (Methods comparison/Precollaborative study), zum anderen die Organisation und Durchführung von Ringversuchen (Collaborative study). Letztere dienen der Feststellung der Leistung des Verfahrens bei Verwendung gleicher Proben in mehreren Laboratorien unter der Leitung eines mit der Organisation beauftragten Laboratoriums (DIN EN ISO 16140, 2003; FELDSINE et al., 2002; N.N., 2007).

Die deutsche Norm DIN EN ISO 16140:2003, basierend auf der internationalen Norm ISO 16140:2003 „Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods“, stellt eine allgemeine Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren dar. Sie ermöglicht eine Aussage über die Vergleichbarkeit der ermittelten Ergebnisse sowie deren internationale Anerkennung und bildet somit die Grundlage für die Zertifizierung solcher Verfahren. Allerdings ist die Anwendung dieser Arbeitsvorschrift mit einem hohen Aufwand verbunden, so dass ihre Durchführung im Rahmen einer internen Validierung einzelner Laboratorien (In house-Validierung/Single laboratory validation) nicht immer praktikabel ist. Findet ein alternatives Verfahren lediglich Verwendung als hausinterne Routineuntersuchung ohne Anforderung an externe Kriterien der Qualitätssicherung, so kann eine weniger strenge vergleichende Validierung erfolgen (DIN EN ISO 16140, 2003; HÜBNER et al., 2002).

Bislang existieren keine international anerkannten Normen, die die Vorgehensweise bei der Durchführung einer In house-Validierung festlegen. Auf der Basis der von HÜBNER et al. (2002) verfassten Publikation zur „In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren“ wurde unter der Leitung der Schweizerischen Akkreditierungsstelle (SAS) ein „Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich der Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie“ erstellt. Für die In house-Validierung alternativer qualitativer Verfahren werden die folgenden Validierungskriterien genannt, wobei sich der Umfang der Validierung (Anzahl der Proben, Aufwand für die einzelnen Untersuchungskriterien, Auswahl der Matrices) nach dem Untersuchungsziel richten sollte (HÜBNER et al., 2002; N.N., 2006a):

- Inklusivität
- Exklusivität
- Anwendungsbereich
- Sensitivität
- Spezifität
- Falsch-Positiv-Rate
- Falsch-Negativ-Rate
- Statistische Übereinstimmung
- Nachweisgrenze
- (Relative) Richtigkeit
- Wiederholbarkeit (Wiederholpräzision)
- Vergleichbarkeit (Vergleichspräzision/Robustheit)

Für die Auswertung einer qualitativen Vergleichsuntersuchung eignet sich das folgende Schema, anhand dessen verschiedene Validierungskriterien berechnet werden können (Tabelle 6).

Tabelle 6: Auswerteschema für qualitative Nachweisverfahren (nach HÜBNER et al., 2002)

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

+ = positiver Nachweis resp. positive Beurteilung

- = negativer Nachweis resp. negative Beurteilung

a = Anzahl der bei beiden Methoden positiven Analysenergebnisse

b = Anzahl der falsch negativen Analysenergebnisse

c = Anzahl der falsch positiven Analysenergebnisse

d = Anzahl der bei beiden Methoden negativen Analysenergebnisse

n = Gesamtzahl der Analysenergebnisse

Inklusivität

Die Inklusivität wird als „Maß der spezifischen Erfassung“ bezeichnet und ist die Fähigkeit des Verfahrens reine Bakterienkulturen von so genannten inklusiven Keimen (Analyten der Testmethode/Zielkeime) nachzuweisen (HÜBNER et al., 2002; DIN EN ISO 16140, 2003).

Exklusivität

Zur Ermittlung der Exklusivität werden reine Bakterienkulturen von so genannten exklusiven Keimen (Nicht-Zielkeime) untersucht, die nicht detektiert werden dürfen (HÜBNER et al., 2002). Die Exklusivität beschreibt das Nichtvorhandensein störender Einflüsse der Nicht-Zielkeime auf das zu validierende Verfahren (DIN EN ISO 16140, 2003).

Zur Überprüfung der Inklusivität und der Exklusivität werden keine Lebensmittelproben zugesetzt (DIN EN ISO 16140, 2003).

Anwendungsbereich

Die Auswahl der im Rahmen der Validierung eingesetzten Lebensmittelkategorien richtet sich nach dem vorgesehenen Anwendungsbereich des zu validierenden Verfahrens. Handelt es sich um ein produktspezifisches Verfahren, so ist die Untersuchung anhand der entsprechenden Matrix durchzuführen. Bei einem horizontalen Verfahren, das den Nachweis der Mikroorganismen in allen Lebensmitteln umfasst, erfolgt die Validierung an mindestens vier verschiedenen Lebensmittelkategorien. Die Untersuchungen können entweder mit natürlich kontaminierten Proben, oder – wenn diese nicht in ausreichender Anzahl erhältlich sind – mit künstlich kontaminierten Proben durchgeführt werden (N.N., 2006a).

Sensitivität

Die Sensitivität bezeichnet die Fähigkeit der zu validierenden Methode, den Zielorganismus nachzuweisen, wenn er mit dem Referenzverfahren nachgewiesen wird (DIN EN ISO 16140, 2003). Sie beschreibt, wieviel % aller sicher positiven Proben als positiv erkannt werden (N.N., 2006a).

Die Sensitivität wird mithilfe der folgenden Formel berechnet:

Formel 1: Sensitivität

$$\text{Sensitivität [\%]} = \frac{a}{(a + b)} \cdot 100$$

Wird der Zielorganismus von der zu validierenden Methode und dem Referenzverfahren gleichermaßen nachgewiesen, ist von einer gleichen Sensitivität auszugehen (N.N., 2006a).

Spezifität

Die Spezifität bezeichnet die Eignung der zu validierenden Methode, den Zielorganismus nicht nachzuweisen, wenn er mit dem Referenzverfahren nicht nachgewiesen wird (DIN EN ISO 16140, 2003). Sie gibt an, wieviel % aller sicher negativen Proben als negativ erkannt werden (N.N., 2006a).

Die Berechnung erfolgt anhand der nachstehenden Formel:

Formel 2: Spezifität

$$\text{Spezifität [\%]} = \frac{d}{(c + d)} \cdot 100$$

Die Spezifität beschreibt das Maß, zu welchem eine Methode von in der Probe vorhandenen Nicht-Zielkeimen beeinflusst wird. Wird der Zielorganismus weder von der zu validierenden Methode noch von dem Referenzverfahren nachgewiesen, ist von einer gleichen Spezifität auszugehen (N.N., 2006a).

Falsch-Positiv-Rate

Die Falsch-Positiv-Rate beschreibt die Anzahl der Resultate mit positiver Abweichung.

Sie wird mit der folgenden Formel berechnet:

Formel 3: Falsch-Positiv-Rate

$$\text{Falsch - Positiv - Rate [\%]} = \frac{c}{(c + d)} \cdot 100$$

Falsch positive Befunde müssen durch weitere Keimdifferenzierung als solche überprüft werden (N.N., 2006a). Wird das wahre Ergebnis als positiv bestätigt, wird es als richtig positiv angesehen (DIN EN ISO 16140, 2003).

Falsch-Negativ-Rate

Die Falsch-Negativ-Rate beschreibt die Anzahl der Resultate mit negativer Abweichung.

Die Berechnung wird mit der nachfolgenden Formel durchgeführt:

Formel 4: Falsch-Negativ-Rate

$$\text{Falsch - Negativ - Rate [\%]} = \frac{b}{(a + b)} \cdot 100$$

Man spricht von einer Negativabweichung des zu validierenden Verfahrens, wenn dieses ein negatives Ergebnis erbringt, bei gleichzeitig positivem Ergebnis des Referenzverfahrens (DIN EN ISO 16140, 2003; N.N., 2006a).

Statistische Übereinstimmung

Bei Vergleichsuntersuchungen von qualitativen Methoden kann die statistische Übereinstimmung durch sogenannte „nicht-parametrische“ Testverfahren ermittelt werden. Zu diesen zählt z. B. die Bestimmung des Konkordanzindex Kappa. Dieser beschreibt das Maß der Übereinstimmung zweier Prüfverfahren bezüglich eines Analyseparameters (HÜBNER et al., 2002; N.N., 2006a).

Der Konkordanzindex Kappa wird anhand der folgenden Formel berechnet (SACHS, 2002):

Formel 5: Konkordanzindex Kappa

$$\text{Kappa} = \frac{2(ad - bc)}{[(a + c)(c + d) + (a + b)(b + d)]}$$

Die Auswertung erfolgt durch Zuordnung des Konkordanzindex Kappa zu einer Übereinstimmungsstufe (Tabelle 7).

Tabelle 7: Übereinstimmungsstufen in Bezug auf den Konkordanzindex Kappa (nach SACHS, 2002)

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

Bei Kappa $\geq 0,81$ ist eine genügende Übereinstimmung zweier Prüfverfahren gegeben (HÜBNER et al., 2002).

Nachweisgrenze

Als Nachweisgrenze wird die kleinste Anzahl an Zielkeimen bezeichnet, die mit einer vorgegebenen statistischen Sicherheit nachgewiesen werden kann (N.N., 2006a). Die theoretische Nachweisgrenze für qualitative Nachweisverfahren, die eine Anreicherung der Keime vorsehen, beträgt eine koloniebildende Einheit (1 KbE) pro eingewogener Menge des Lebensmittels. Da der Nachweis lebender Organismen von verschiedenen Faktoren wie Vermehrung, Absterben, Schädigung oder Inaktivierung beeinflusst wird, kann die praktische von der theoretischen Nachweisgrenze abweichen (HÜBNER et al., 2002). Es gibt verschiedene Definitionen für die praktische Nachweisgrenze. Nach DIN EN ISO 16140 (2003) ist die Nachweisgrenze die kleinste Anzahl anzüchtbarer Mikroorganismen, die mit einer 50 %igen Treffsicherheit nachgewiesen werden kann. Sie liegt zwischen den beiden Konzentrationen der Kontamination, die weniger bzw. mehr als in 50 % der Fälle die Nachweisgrenze ergeben. Sie wird folglich als Bereich ausgedrückt. Die Nachweisgrenze kann auch angegeben werden als der tiefste Wert, bei dem alle Resultate positiv ausfallen (N.N., 2006a).

(Relative) Richtigkeit

Die Richtigkeit gilt als Maß für die Abweichung vom „richtigen Wert“. Aufgrund der mangelnden Kenntnis über die Verteilung und die Vermehrungsfähigkeit der Mikroorganismen gilt die Richtigkeit bei mikrobiologischen Methoden als nur schwer zu ermittelnde Größe. Häufig wird im Rahmen von Ringversuchen die Abweichung vom robusten Mittelwert als Maß für die Richtigkeit herangezogen (N.N., 2006a). Nach DIN EN ISO 16140 (2003) wird die relative Genauigkeit bestimmt, die bei identischen Proben

den Grad der Übereinstimmung der Ergebnisse des Referenzverfahrens und des zu validierenden Verfahrens angibt.

Wiederholbarkeit (Wiederholpräzision)

Die Wiederholbarkeit (repeatability, r) wird durch den Vergleich von Resultaten wiederholter Messungen derselben Probe unter gleichen Bedingungen (gleiche Personen, Laboratorien, Geräte, Reagenzien, Umgebungsbedingungen) ermittelt.

Die Berechnung erfolgt anhand der folgenden Formel wobei x die Anzahl der Messungen mit übereinstimmenden Resultaten unter Wiederholbarkeitsbedingungen und n die Anzahl der Messungen angibt (N.N., 2006a).

Formel 6: Wiederholbarkeit

$$\text{Wiederholbarkeit } (r) = \frac{x}{n}$$

Vergleichbarkeit (Vergleichspräzision/Robustheit)

Die Vergleichbarkeit (reproducibility, R) wird durch den Vergleich von Resultaten wiederholter Messungen derselben Probe unter wechselnden Bedingungen (verschiedene Personen, Laboratorien, Geräte, Reagenzien, Umgebungsbedingungen) ermittelt.

Die Berechnung erfolgt anhand der folgenden Formel wobei y die Anzahl der Messungen mit übereinstimmenden Resultaten unter Vergleichbarkeitsbedingungen und n die Anzahl der Messungen angibt (HÜBNER et al., 2002).

Formel 7: Vergleichbarkeit

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

Die Bestimmung der Vergleichbarkeit kann über die Teilnahme an Ringversuchen erfolgen (N.N., 2006a).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

5 Material

5.1 Probenmaterial

5.1.1 Zur In house-Validierung eingesetztes Probenmaterial

Für die zur Validierung des Verfahrens zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* durchgeführte Vergleichsuntersuchung sowie die Bestimmung der Nachweisgrenze wurden jeweils fünf verschiedene Lebensmittelmatrizes eingesetzt. Neben den Lebensmitteln tierischen Ursprungs rohes Hackfleisch vom Schwein, schnittfeste Rohwurst mit Schweinefleisch (Salami), pasteurisierte frische Vollmilch (Kuhmilch) mit einem Fettgehalt von 3,5 % und Käse aus pasteurisierter Kuhmilch (Limburger) mit 40 % Fett in der Trockenmasse (i. Tr.), wurde vorzerkleinerter Salat bestehend aus Endiviensalat, Radicio, Weißkraut und Karotte (Rohkost Mix) als pflanzliches Lebensmittel untersucht. Die Lebensmittel wurden entweder unmittelbar nach Probeneingang der Untersuchung unterzogen oder bis zum jeweiligen Untersuchungsbeginn bei -18 °C tiefgefroren (Tabelle 20).

5.1.2 Untersuchte Lebensmittelproben

Zwischen Dezember 2005 und Januar 2007 wurden am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe (CVUA KA) 100 Lebensmittelproben auf pathogene *Y. enterocolitica* untersucht. Diese wurden von den unteren Lebensmittelüberwachungsbehörden des Regierungsbezirks Karlsruhe aus dem Einzelhandel, bei Herstellern, oder vereinzelt aus dem Großhandel erhoben und dem CVUA Karlsruhe zur Untersuchung vorgelegt. Die Proben wurden entweder als offene Ware (65 Proben) oder als Fertigpackung (35 Proben) angeliefert. Im Einzelnen handelte es sich dabei um 44 Proben rohes Fleisch (40 x Schwein, 4 x Rind), 32 Proben rohes Hackfleisch (31 x Schwein, 1 x gemischt Schwein/Rind), 13 Proben stabilisierte, nicht hitzebehandelte Fleischerzeugnisse verschiedener Tierarten (z. B. Rohwürste, rohe Pökelfleischerzeugnisse) und 11 Proben Innereien vom Schwein (4 x Zunge, 4 x Niere, 3 x Leber) (Abbildung 2). Die Proben wurden entweder unmittelbar nach Probeneingang der Untersuchung unterzogen oder bis zum jeweiligen Untersuchungsbeginn bei -18 °C tiefgefroren (Tabelle 21).

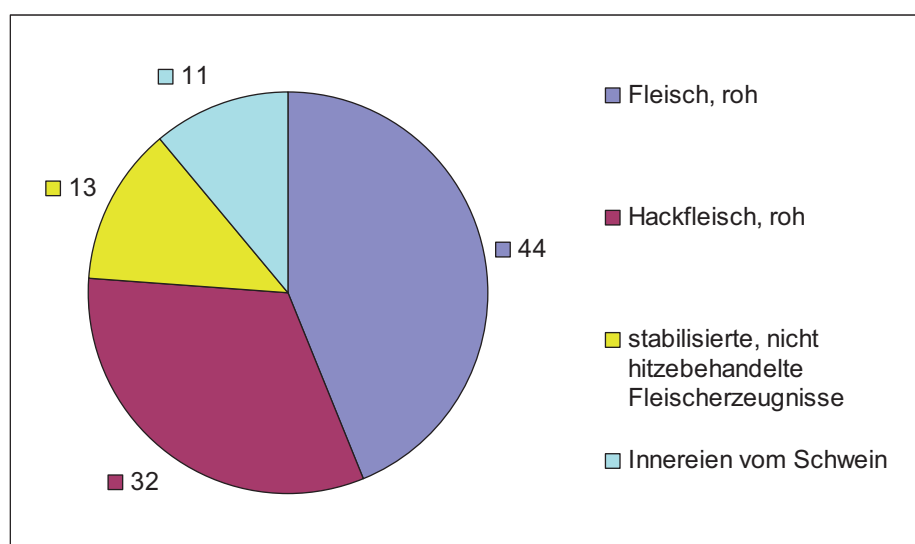


Abbildung 2: Anzahl der Proben bezogen auf die untersuchten Warengruppen

5.2 Mikroorganismenstämme

Insgesamt 29 Stämme aus der Stammsammlung des CVUA Karlsruhe wurden zur In house-Validierung des Verfahrens zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* eingesetzt. Es handelte sich um Stämme unterschiedlicher Herkunft, wobei die überwiegende Anzahl von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH und der OXOID GmbH bezogen wurde. Daneben wurden auch Stämme des Instituts für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Ludwig-Maximilians-Universität München, des Robert Koch Instituts (RKI) Bereich Wernigerode, der Außenstelle Bremerhaven des Landesuntersuchungsamtes für Chemie, Hygiene und Veterinärmedizin Bremen (LUA) sowie ein laboreigener Stamm des CVUA Karlsruhe zur Untersuchung herangezogen (Abschnitt 13).

5.3 Arbeitsmaterial

Alle verwendeten Arbeitsmaterialien sind im Anhang aufgelistet.

6 Methoden

Bei der Entwicklung des im nachfolgenden Abschnitt beschriebenen Verfahrens wurden verschiedene bewährte Elemente von bereits vorhandenen Methoden kombiniert und zum Teil modifiziert, um über ein möglichst schnelles und zuverlässiges Verfahren für den Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln zu verfügen (Abbildung 3).

Analog zum „Horizontalen Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Y. enterocolitica*“ L 00.00-90 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (Abbildung 1) wurden auch beim eigens entwickelten Verfahren die Punkte „Anreicherung“, „Isolierung“, „biochemische Bestätigung“ und „Untersuchung auf Pathogenität“ berücksichtigt. Darüber hinaus wurde beim eigenen Verfahren ein Direktausstrich auf CIN-Agar eingeführt. Die Anreicherung erfolgte zum einen – wie beim amtlichen Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB – in ITC-Bouillon, zum anderen wurde anstelle von PSB nicht-selektive Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (CASO-Bouillon) eingesetzt.

Des Weiteren wurde beim eigens entwickelten Verfahren im Anschluss an die Anreicherung in CASO-Bouillon ein PCR-Screening auf die Zielgene *ail* und *virF* eingeführt. Dadurch sollte bereits zu einem frühen Zeitpunkt eine Differenzierung zwischen Proben, die pathogene *Y. enterocolitica* enthalten und Proben, die frei von diesem Erreger sind, ermöglicht werden. Die Auswahl der Primer sowie das verwendete PCR-Programm orientierten sich an der Methode Nr. 163 A des Nordic Committee on Food Analysis „Pathogenic *Y. enterocolitica*. PCR methods for detection in foods“ (Abschnitt 3.2).

Zur Isolierung der Keime wurde ausschließlich CIN-Agar eingesetzt. Verdächtige Kolonien wurden auf CIN- und Columbia-Blut-Agar ausgestrichen. Ein weiterer Unterschied zwischen den Verfahren besteht darin, dass die Pathogenitätsprüfung der Isolate beim amtlichen Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB rein kulturell erfolgt, beim eigenen Verfahren jedoch eine PCR auf die bei pathogenen *Y. enterocolitica* vorhandenen Zielgene *ail* und *virF* angewendet wurde.

6.1 Verfahren zum Nachweis von pathogenen *Yersinia enterocolitica*

A) Einwaage und Erstansatz

Zur Herstellung des Erstansatzes werden 10 g oder 10 ml des Lebensmittels in einen Stomacherbeutel mit Filtriereinsatz verbracht und mit 90 ml CASO-Bouillon für 2 min homogenisiert. Dieser Erstansatz wird zur Wiederbelebung geschädigter Zellen für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen.

B) Direktausstrich auf CIN-Nährboden

Im Anschluss an die Wiederbelebung werden 100 µl des Erstansatzes (siehe A) auf eine CIN-Agar-Platte (CIN(Dir)) gegeben und mit einer Einweg-Impföse in Form eines Drei-Ösen-Ausstriches so verteilt, dass sich gut isolierte Einzelkolonien bilden. Der beimpfte Nährboden wird 20 h ± 2 h bei 30 °C bebrütet.

C) Anreicherung (Selektivanreicherung und Über-Nacht-Anreicherung)

Selektivanreicherung

Zu 10 ml ITC-Basisnährmedium werden jeweils 10 µl der Supplemente Irgasan-Lösung 0,1 % (IRG) und Ticarcillin-Lösung 0,1 % (TIC) gegeben. Anschließend wird die Bouillon mit 1 ml des Erstansatzes (siehe A) beimpft. Die Bebrütung erfolgt bei 25 °C für 48 h ± 2 h.

Über-Nacht-Anreicherung

Der Erstansatz (siehe A) wird im Stomacherbeutel mit Filtriereinsatz (mit Clip-Verschluss) über Nacht (ca. 16-20 h) bei 25 °C bebrütet.

D) Laugenbehandlung

Aus der Über-Nacht-Anreicherung (siehe C) werden 0,5 ml in 4,5 ml Kaliumhydroxid-(KOH) Lösung 0,5 % pipettiert und 20 s geschüttelt. Aus dieser Suspension wird mit einer Einweg-Impföse Material entnommen und in Form eines Drei-Ösen-Ausstriches auf eine CIN-Agar-Platte (CIN(KOH)) aufgebracht. Der beimpfte Nährboden wird 20 h ± 2 h bei 30 °C bebrütet.

E) Entnahme von Material für das PCR-Screening

Aus der Über-Nacht-Anreicherung (siehe C) wird 1 ml für das PCR-Screening entnommen, weitere 2 ml werden für eventuelle Wiederholungen der Nukleinsäureextraktion in einem Safe Lock Tube von EPPENDORF eingefroren.

F) Durchführung des PCR-Screenings

Alle Proben werden zunächst einem PCR-Screening auf das chromosomal kodierte *ail*-Gen unterzogen. Im Falle eines positiven Ergebnisses folgt eine PCR mit dem plasmoidalen Zielgen *virF*.

Bei Übernahme des Verfahrens in die Laborroutine wird im Falle eines negativen Ergebnisses des PCR-Screenings die Untersuchung der Probe an diesem Punkt abgeschlossen. Das Ergebnis lautet: „pathogene *Y. enterocolitica* nicht nachweisbar“. Bei allen im Rahmen der Dissertation untersuchten Proben wurde die kulturelle Untersuchung weitergeführt.

Nukleinsäureextraktion

Um die Bakterienzellen zu lysieren und vorhandene inhibitorische Komponenten aus dem Lebensmittel und der Anreicherungsbouillon zu absorbieren, wird 1 ml aus der Über-Nacht-Anreicherung mit dem Probenaufarbeitungs-kit InstaGene™ Matrix von BIO RAD behandelt. Zunächst wird das Material für 1 min bei 13000 Umdrehungen / min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Unter Zugabe von 200 µl InstaGene™ Matrix wird das Pellet resuspendiert und anschließend für ca. 30 min in einem Wasserbad bei 56 °C bei leichtem Schütteln inkubiert. Die Suspension wird 10 s gevortext, weitere 8 min in einem Wasserbad bei 100 °C inkubiert und erneut 10 s gevortext. Es folgt eine Zentrifugation der Suspension für 3 min bei 13000 Umdrehungen / min. Der Überstand wird in ein neues Safe Lock Tube von EPPENDORF überführt und in der PCR als Template eingesetzt.

Im Falle des Auftretens von Inhibitionseffekten erfolgt die Nukleinsäureextraktion mithilfe des DNeasy® Blood & Tissue Kit von QIAGEN. Aus der Über-Nacht-Anreicherung wird 1 ml zunächst 10 min bei 7500 Umdrehungen / min zentrifugiert und der resultierende Überstand verworfen. Unter Zugabe von 180 µl ATL-Puffer wird das Pellet resuspendiert. Im Anschluss werden 20 µl Proteinase K zugefügt und gut vermischt. Es folgt die Inkubation im Wasserbad bei 56 °C und leichtem Schütteln für ca. 3 h. Die Suspension wird 15 s gevortext. Nacheinander werden 200 µl AL-Puffer und 200 µl Ethanol zupipettiert und jeweils gut vermischt. Die resultierende Suspension wird auf eine Säule (spin column in 2 ml collection tube) pipettiert und für 1 min bei 8000 Umdrehungen / min zentrifugiert. Anschließend wird die Säule in ein neues collection tube gesetzt. Das alte collection tube mit Inhalt wird verworfen. 500 µl AW1-Puffer werden auf die Säule pipettiert und 1 min bei 8000 Umdrehungen / min zentrifugiert. Das collection tube mit Inhalt wird verworfen und die Säule in ein neues collection tube gesetzt. Nach Zugabe von 500 µl AW2-Puffer folgt ein Zentrifugationsschritt bei höchster Geschwindigkeit für 3 min um die Membran zu trocknen.

Das Collection tube mit Inhalt wird verworfen, und die Säule wird in ein Safe Lock Tube von EPPENDORF gesetzt. Nachfolgend werden 200 µl AE-Puffer direkt auf die Membran gegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 1 min bei 8000 Umdrehungen / min werden erneut 200 µl AE-Puffer direkt auf die Membran pipettiert, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich für 1 min bei 8000 Umdrehungen / min zentrifugiert. Das Eluat wird in der PCR als Template eingesetzt.

Verschiedene pathogene *Y. enterocolitica*-Stämme verfügen über hitzestabile DNAsen, die durch die Behandlung mit Proteinase K-freien Extraktionskits (z. B. InstaGene™ Matrix von BIORAD) nicht zerstört werden. Diese Enzyme sind in der Lage, DNA abzubauen. Um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden ist darauf zu achten, dass die Schritte Nukleinsäureextraktion, Amplifikation und Detektion der Amplifikate in unmittelbarem zeitlichem Zusammenhang durchgeführt werden. Längere Standzeiten zwischen den einzelnen Schritten sind zu vermeiden. Bei Durchführung der Nukleinsäureextraktion mit einem Proteinase K-haltigen Extraktionskit (z. B. DNeasy® Blood & Tissue Kit von QIAGEN) ist dies nicht erforderlich, da eine Zerstörung der DNAsen durch Proteinase K erfolgt.

Nukleinsäureextraktion aus dem Referenzstamm

Die erforderliche Zielsequenz der im PCR-Lauf mitgeführten Positiv- bzw. Inhibitionskontrolle wird durch Nukleinsäureextraktion aus dem Referenzstamm DSM Nr. 11502 erzeugt. Aus dem Anfangsbereich des Impfstreiches des auf Blutagar angezüchteten Referenzstammes wird eine kleine Menge Koloniematerial entnommen und in 1 ml destilliertem Wasser (DNase frei) suspendiert. Zur Lyse der Bakterienzellen wird die Suspension 10 min in einem Wasserbad bei 100 °C gekocht. Anschließend wird der Zelldetritus 3 min bei 13000 Umdrehungen / min abzentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wird in ein neues Safe Lock Tube von EPPENDORF überführt und bei -20 °C gelagert. Dieser kann so für mehrere PCR-Läufe als Zielsequenz eingesetzt werden.

Amplifikation

Unter der Reinraumbank werden die Reaktionsansätze für die PCR pipettiert. Zunächst wird ein Reaktionsansatz bestehend aus HotStarTaq Master Mix Kit von QIAGEN, Wasser und den jeweiligen Primern hergestellt.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für das PCR-Screening:

25 µl HotStarTaq Master Mix Kit, 1 x

5 µl Wasser

7,5 µl Primer 1, 0,3 µM (*ail1* bzw. *virF1*)

7,5 µl Primer 2, 0,3 µM (*ail2* bzw. *virF2*)

Abschließend werden dem Reaktionsansatz 5 µl Template zugefügt. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes beträgt 50 µl.

Wird die Menge an Template geändert, so ist entsprechend auch die Menge Wasser zum Endvolumen 50 µl zu ändern.

Um mögliche Kontaminationen zu erkennen, sind in jedem PCR-Lauf entsprechende Kontrollen mitzuführen:

- Positiv-Kontrolle: enthält alle Reagenzien des Reaktionsansatzes sowie als Template 5 µl der Ziel-Sequenz (siehe Nukleinsäureextraktion aus dem Referenzstamm)
- Reagenzien-Kontrolle (Thermocycler-Leerwert, TL): enthält alle Reagenzien des Reaktionsansatzes, jedoch außer den Primern keine Nukleinsäure (Wassermenge erhöhen auf 10 µl)
- Inhibitionskontrolle: Für jede Probe werden 2 Reaktionsansätze pipettiert, wobei der zweite Ansatz als Inhibitionskontrolle dient. Diesem wird zusätzlich zum Template, 1 µl der Ziel-Sequenz (siehe Nukleinsäureextraktion aus dem Referenzstamm) zugegeben.

Die Amplifikation erfolgt im Thermocycler Gene Amp[®] PCR System 2700 von APPLIED BIOSYSTEMS bei folgendem PCR-Programm (Tabelle 8):

Tabelle 8: PCR-Programm

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

Detektion der Amplifikate mittels Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 2,5 %igen Agarose-Gels werden 3,0 g Agarose in einen Erlenmeyer-Kolben (250 ml) eingewogen und 120 ml 1 x TRIS-Borat-EDTA- (TBE-) Puffer zugegeben. Die Substanzen werden auf dem Magnetrührer vermischt und anschließend in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Zum Abkühlen wird die Gellösung erneut auf den Magnetrührer gestellt. Beim Erreichen einer Temperatur von ca. 60-70 °C erfolgt die Zugabe von 30 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml). Auf ein Geltaflet werden Gummiblöcke sowie ein Kamm aufgesteckt und anschließend das flüssige Gel eingegossen. Nach 45 min können Gummiblöcke und Kamm abgenommen und das erstarrte Gel auf dem Geltaflet in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt werden. In eine Mikrowellplatte werden 2,5 µl des Ladepuffers (Bromphenolblau und Glycerin) einpipettiert und 12,5 µl der PCR-Lösung bzw. des Markers hinzugegeben. Es folgt das Einpipettieren von 12,5 µl dieser Mischung in die jeweilige Tasche des Agarosegels. Die Amplifikate werden bei einer Spannung von 2,8 V/cm (95 V bei einem Elektrodenabstand von 34 cm) über einen Zeitraum von 2 h aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgt die Geldokumentation mithilfe des Video-Dokumentationssystems BioDocII (BIOMETRA).

Auswertung der PCR

Das Ergebnis der PCR auf *ail* bzw. *virF* ist

- positiv, wenn sich nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Amplifikate Banden spezifischer Größe zeigen (Tabelle 9) und die mitgeführten Kontrollen (Positiv- und Reagenzienkontrolle, sowie beim PCR-Screening die Inhibitionskontrolle) die erwarteten Ergebnisse liefern,
- negativ innerhalb der Nachweisgrenzen, wenn kein spezifisches Amplifikat nachgewiesen wurde und sämtliche Kontrollen die erwarteten Ergebnisse liefern,
- fraglich, wenn die mitgeführten Kontrollen nicht die erwarteten Ergebnisse liefern.

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Primerpaare, Zielgene und spezifischen Amplifikatgrößen

Primerpaar	Zielgen	Amplifikatgröße
<i>ail1/ail2</i>	<i>ail</i>	454 bp
<i>virF1/virF2</i>	<i>virF</i>	700 bp

bp = Basenpaare

G) Ausstrich der Selektivanreicherung auf CIN

Nach Bebrütung der Selektivanreicherung (siehe C) werden 100 µl der Bouillon auf eine CIN-Agar-Platte (CIN(ITC)) gegeben und mit einer Einweg-Impföse in Form eines Drei-Ösen-

Ausstriches so verteilt, dass sich gut isolierte Einzelkolonien bilden. Der beimpfte Nährboden wird 20 h ± 2 h bei 30 °C bebrütet.

H) Isolierung

Nach einer Bebrütung für 20 h ± 2 h bei 30 °C bilden präsumtiv pathogene *Y. enterocolitica* auf CIN-Agar Kolonien mit himbeerrotem Zentrum, einer klaren Randzone und einem Durchmesser von <1 mm (sog. „Kuh-Augen“). Aufgrund der psychrotrophen Eigenschaften von *Y. enterocolitica* muss bei Aufbewahrung der Platten bei Kühltemperaturen eine Vergrößerung der Kolonien berücksichtigt werden. Dies gilt auch für Platten, die länger als 22 h bebrütet werden. Bei zweifelhaften Kolonien ist in diesen Fällen eine Bestätigung erforderlich.

I) Identifizierung

Auswahl von Kolonien für die Bestätigung

Zur Bestätigung werden von den aus B), D) sowie G) erhaltenen CIN-Platten jeweils fünf verdächtige Kolonien ausgewählt. Wenn sich auf einer Platte weniger als fünf verdächtige Kolonien befinden, werden alle verdächtigen Kolonien für die Bestätigung verwendet. Die ausgewählten Kolonien werden auf Columbia-Blutagar und CIN-Agar so ausgestrichen, dass sich gut voneinander getrennte Kolonien entwickeln können. Die Platten werden 20 h ± 2 h bei 30 °C bebrütet. Danach werden diese Platten auf die Reinheit der gewachsenen Kulturen untersucht. Falls Mischkulturen vorliegen, werden Reinigungsausstriche angefertigt. Für die biochemischen Bestätigungsprüfungen und die Pathogenitätsprüfungen werden ausschließlich Reinkulturen (Isolate/Subkulturen, SK) verwendet.

Orientierende Prüfung

Von den verdächtigen Subkulturen wird der Urea-Test durchgeführt. Dazu wird vom Columbia-Blutagar Koloniematerial entnommen und die Oberfläche des Harnstoffagar nach Christensen beimpft. Die Bebrütung erfolgt bei 30 °C für 22 h ± 2 h.

Enteropathogene *Y. enterocolitica* zeigen eine positive Harnstoffspaltung innerhalb von 24 h. Diese wird durch Farbumschlag des Agars nach rosa sichtbar. Weitere *Enterobacteriaceae* mit positiver Urease-Aktivität, wie z. B. *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. oder *Serratia* spp., zeigen eine deutlich rosa-violette Verfärbung des Agars erst bei einer Bebrütungsdauer von mehr als 24 h. Daher ist darauf zu achten, dass die Auswertung innerhalb von 24 h erfolgt. Bei zweifelhaften Befunden ist eine Bestätigung erforderlich.

Biochemische Bestätigung (Biotypisierung)

Zur biochemischen Bestätigung (Tabelle 10) werden nur Subkulturen mit positiver Urea-Reaktion verwendet.

Tabelle 10: Biotypisierung von *Y. enterocolitica*

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

+ = positive Reaktion, - = negative Reaktion, (+) = schwach positive Reaktion, V = variable Reaktion

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

^b = apathogen

- Tween-Esterase-Test:

Einige Kolonien werden in einer Linie auf dem Tween-Esterase-Agar (TWE) ausgestrichen. Bei einer positiven Reaktion wird ein milchig trüber Hof um den Impfstrich sichtbar (Mikrokristalle von Calciumoleat). Die Bebrütung erfolgt bei 30 °C für 24-48 h.

- Äsculinvergärung:

Einige Kolonien werden in Form eines Ein-Ösen-Ausstriches auf den Äsculin-Agar (ÄSC) aufgetragen. Eine gelbe Verfärbung des Agars in der Umgebung des Impfstriches zeigt eine positive Reaktion. Die Bebrütung erfolgt bei 30 °C für 24-48 h.

- Fermentation von Xylose (XYL), Trehalose (TRE) und Salicin (SAL):

Zur Beurteilung der Fermentation von Xylose, Trehalose und Salicin werden die entsprechenden Medien für die Kohlenhydratfermentation (KOFER-XYL, KOFER-TRE, KOFER-SAL) mit mehreren Bakterienkolonien beimpft. Die Bebrütung erfolgt bei 30 °C für 24-48 h. Bei einer positiven Reaktion kann ein Farbumschlag des Mediums von rot nach gelb festgestellt werden.

- Pyrazinamidasenachweis:

Einige Kolonien werden auf den unteren Bereich der Schrägfläche des Pyrazinamidase-Agars (PYR) ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgt bei 30 °C für 24-48 h. Nach Beendigung der Bebrütung erfolgt die Zugabe von 1 ml

Ammoniumferrosulfat-Lösung (AFS). Eine positive Reaktion wird durch eine rotbraune Färbung der Lösung innerhalb von 10 min angezeigt.

Biochemische Identifizierung

Die biochemische Identifizierung von *Y. enterocolitica* erfolgt mithilfe des standardisierten Testsystems API® 20 E von BIOMÉRIEUX. Zunächst wird von der Reinkultur auf Blutagar eine kleine Menge Koloniematerial abgenommen und in 5 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Es folgt die Befüllung der 20 Mikroröhrchen des Teststreifens mit der Keimsuspension. Entsprechend der Anleitung werden zusätzlich ein Teil der Becher befüllt oder die Röhrchen mit Paraffinöl luftdicht verschlossen. Die während einer Inkubation von 20-24 h bei 30 °C entstandenen Stoffwechselprodukte bewirken entweder direkt oder indirekt, nach Reagenzienzugabe, einen Farbumschlag, welcher anhand der Ablesetabelle ausgewertet werden kann. Das resultierende 7-stellige numerische Profil dient der Identifizierung mittels einer Identifizierungssoftware.

Serologische Identifizierung

Die Serotypbestimmung mittels Objektträgeragglutination erfolgt bei allen *Y. enterocolitica*-Isolaten, die einem der pathogenen Biotypen 1B, 2, 3, 4 oder 5 zugeordnet wurden. Es können die monospezifischen Testseren Anti-*Y. enterocolitica* O:3, O:5, O:8, O:9 und O:27 von SIFIN eingesetzt werden. Ein Tropfen des entsprechenden Testserums wird auf einen Objektträger gegeben und eine Kolonie der auf Blutagar gewachsenen Reinkultur eingerieben. Zur Auswertung wird der Objektträger geschwenkt. Bei einer positiven Reaktion kann nach 1 bis 20 Schwenkungen eine sichtbare grob- oder feinflockige Agglutination festgestellt werden. Tritt erst nach mehr als 20 Schwenkungen eine Reaktion auf oder bleibt die Suspension milchig-trüb wird das Ergebnis als negativ beurteilt. Um eine Spontanagglutination auszuschließen wird eine Negativkontrolle durchgeführt bei welcher anstelle des Testserums physiologische Kochsalzlösung eingesetzt wird.

J) Pathogenitätsprüfung mittels PCR

Die *Y. enterocolitica*-Isolate, die einem der pathogenen Biotypen 1B, 2, 3, 4 oder 5 zugeordnet wurden, werden weiterhin der Pathogenitätsprüfung mittels PCR unterzogen. Die PCR wird mit dem chromosomalen Zielgen *ail* sowie dem plasmoidalen Zielgen *virF* durchgeführt.

Nukleinsäureextraktion

Von den auf Blutagar-Platten isolierten Reinkulturen wird jeweils eine kleine Menge Koloniematerial entnommen und in 100 µl destilliertem Wasser suspendiert. Zur Lyse der Bakterienzellen wird die Suspension 10 min in einem Wasserbad bei 100 °C gekocht. Anschließend wird der Zelldetritus 3 min bei 13000 Umdrehungen / min abzentrifugiert. Der als Template dienende DNA-haltige Überstand wird in ein neues Safe Lock Tube von EPPENDORF überführt.

Amplifikation

Unter der Reinraumbank werden die Reaktionsansätze für die PCR pipettiert. Zunächst wird ein Reaktionsansatz bestehend aus HotStarTaq Master Mix Kit von QIAGEN, Wasser und den jeweiligen Primern hergestellt.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR zur Pathogenitätsbestimmung:

12,5 µl HotStarTaq Master Mix Kit, 1 x

9 µl Wasser

1,25 µl Primer 1, 0,1 µM (*ail1* bzw. *virF1*)

1,25 µl Primer 2, 0,1 µM (*ail2* bzw. *virF2*)

Abschließend wird dem Reaktionsansatz 1 µl Template zugefügt. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes beträgt 25 µl.

Wird die Menge an Template geändert, so ist entsprechend auch die Menge Wasser zum Endvolumen 25 µl zu ändern.

Um mögliche Kontaminationen zu erkennen, sind in jedem PCR-Lauf entsprechende Kontrollen mitzuführen:

- Positiv-Kontrolle: enthält alle Reagenzien des Reaktionsansatzes sowie als Template 5 µl der Ziel-Sequenz (siehe Nukleinsäureextraktion aus dem Referenzstamm)
- Reagenzien-Kontrolle (Thermocycler-Leerwert, TL): enthält alle Reagenzien, aber außer den Primern keine Nukleinsäure (Wassermenge erhöhen auf 10 µl)
- Inhibitionskontrolle: entfällt, da die Nukleinsäureextraktion aus Koloniematerial von Reinkulturen durchgeführt wird, und so keine inhibitorischen Komponenten zu erwarten sind.

Die Amplifikation erfolgt im Thermocycler Gene Amp[®] PCR System 2700 von APPLIED BIOSYSTEMS bei dem unter Tabelle 8 genannten PCR-Programm.

Detektion der Amplifikate mittels Gelelektrophorese

Siehe F)

Auswertung der PCR

Siehe F)

K) Auswertung der Bestätigungsreaktionen

Als pathogene *Y. enterocolitica* gelten

- in der biochemischen Identifizierung als *Y. enterocolitica* erkannte Bakterien,
- die nach Tabelle 10 einem der Biotypen 1B, 2, 3, 4 oder 5 zuzuordnen sind und
- in der Pathogenitätsprüfung mittels PCR die Gene *ail* und *virF* aufweisen

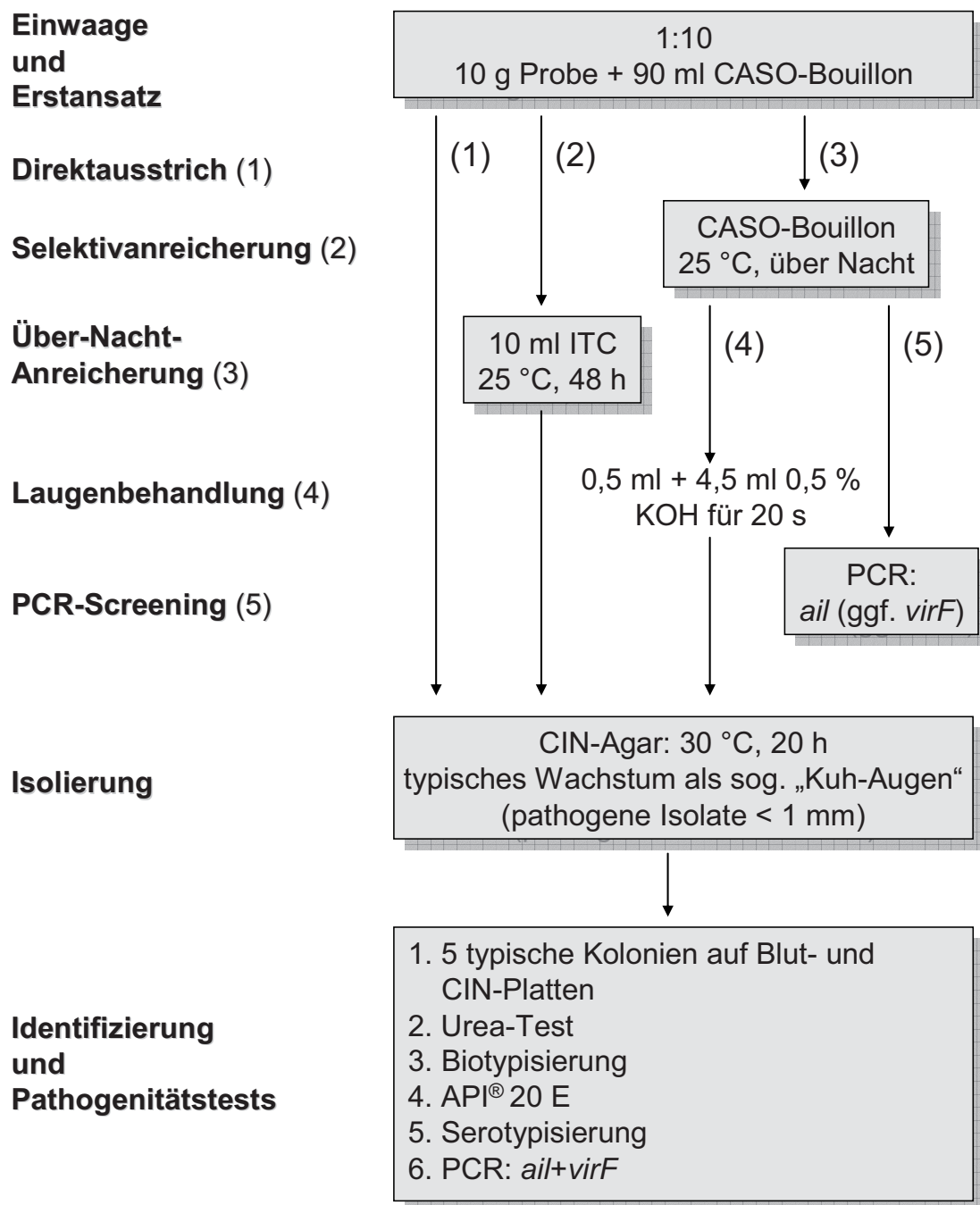


Abbildung 3: Verfahrensdiagramm zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica*

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

6.2 In house-Validierung des Verfahrens zum Nachweis von pathogenen *Yersinia enterocolitica*

6.2.1 Überprüfung der Inklusivität und der Exklusivität des PCR-Screenings

Die Überprüfung der Inklusivität und der Exklusivität des PCR-Screenings erfolgte für beide Gene *ail* und *virF* (PCR mittels *ail1/ail2*-Primer bzw. *virF1/virF2*-Primer), da das entwickelte Verfahren im Falle eines positiven PCR-Screenings auf das chromosomal kodierte *ail*-Gen, zur Überprüfung der vollständigen Virulenz der detektierten Erreger, ein weiteres PCR-Screening auf das plasmoidale Zielgen *virF* vorsieht. Die Bestimmung wurde parallel von zwei Personen jeweils im Doppelansatz durchgeführt, beginnend bei der Extraktion.

Inklusivität

Die Überprüfung der Inklusivität erfolgte über den Nachweis des Zielkeims. Als Zielkeim wurde der pathogene Referenzstamm *Y. enterocolitica* DSM Nr. 11502 eingesetzt. Es wurde keine Lebensmittelprobe zugegeben.

Mehrere kleine Kolonien des auf Blut-Agar angezüchteten Referenzstamms wurden in 10 ml CASO-Bouillon suspendiert. Diese Suspension wurde über Nacht bei 30 °C bebrütet. Anschließend wurde mit der über Nacht bebrüteten Keimsuspension eine dezimale Verdünnungsreihe angelegt.

Als Material für das PCR-Screening wurde jeweils 1 ml der Verdünnungsstufen 10^{-5} , 10^{-6} , und 10^{-7} in ein Safe Lock Tube von EPPENDORF überführt. Die Durchführung des PCR-Screenings auf die Gene *ail* und *virF* umfasste die Schritte Nukleinsäureextraktion mittels InstaGene™ Matrix von BIO RAD, Amplifikation sowie Detektion der Amplifikate mittels Gelelektrophorese. Diese wurden entsprechend dem Verfahren zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* (Abschnitt 6.1 F) durchgeführt.

Zur Berechnung der in der Keimsuspension vorhandenen Zahl an pathogenen *Y. enterocolitica* wurden je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-5} und 10^{-6} im Doppelansatz auf CIN-Platten ausgespatelt. Diese wurden bei 30 °C für 20 h \pm 2 h bebrütet. Im Anschluss an die Bebrütung wurden die typischen Kolonien auf CIN-Platten ausgezählt. Die Berechnung der Anzahl der Yersinien pro ml erfolgte nach dem gewogenen arithmetischen Mittel (Formel 8).

Formel 8: Gewogenes arithmetisches Mittel

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

Mit:

- \bar{c} gewogenes arithmetisches Mittel der Koloniezahlen
- Σc Summe der Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste und nächst höhere auswertbare Verdünnungsstufe)
- n_1 Anzahl der Petrischalen der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
- n_2 Anzahl der Petrischalen der nächst höheren Verdünnungsstufe
- d Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe; hierbei handelt es sich um die auf n_1 bezogene Verdünnungsstufe

Exklusivität

Die Exklusivität des PCR-Screenings wurde mithilfe von 28 Nicht-Zielkeimen ermittelt. Diese sollten ein negatives Ergebnis bezüglich der Gene *ail* und *virF* liefern. Es wurden sowohl taxonomisch eng, als auch weniger eng mit pathogenen *Y. enterocolitica* verwandte Mikroorganismen berücksichtigt. Somit wurde gewährleistet, dass sowohl Keime überprüft wurden, die evtl. störende Einflüsse auf die Zielkeime ausüben können, als auch Mikroorganismen, die als natürliche Begleitflora in den Lebensmittelmatrixen, die im Rahmen der Validierung untersucht wurden, vorkommen. In Tabelle 11 sind die eingesetzten Mikroorganismen sowie deren Anzuchtbedingungen aufgelistet.

Die jeweiligen Mikroorganismen wurden in 10 ml der entsprechenden Nährbouillon suspendiert. Diese Suspensionen wurden unter den aufgelisteten Bedingungen für 24 h inkubiert. Im Anschluss an die Bebrütung wurden aus den Suspensionen dezimale Verdünnungsreihen bis zur Verdünnungsstufe 10^{-6} hergestellt.

Zur Durchführung des PCR-Screenings auf die Gene *ail* und *virF* für jeden Nicht-Zielkeim wurde jeweils 1 ml der Verdünnungsstufe 10^{-2} in ein Safe Lock Tube von EPPENDORF überführt. Es folgte die Nukleinsäureextraktion mittels InstaGene™ Matrix von BIO RAD, die Amplifikation sowie die Detektion der Amplifikate gemäß dem Verfahren zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* (Abschnitt 6.1 F).

Zur Berechnung der in den Suspensionen vorhandenen Keimzahlen wurden je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} im Doppelansatz auf die entsprechenden Nähragar-

Platten ausgespatelt und unter den jeweiligen Bedingungen bebrütet (Tabelle 11). Im Anschluss an die Bebrütung wurden die Kolonien ausgezählt. Die Berechnung der Keimzahlen pro ml erfolgte nach dem gewogenen arithmetischen Mittel (Formel 8).

Tabelle 11: Übersicht über die zur Überprüfung der Exklusivität eingesetzten Mikroorganismen

Mikroorganismen			Zur Anzucht eingesetzte/r		Bebrütung	Errechnete Keimzahl nach Bebrütung (KbE/ml)	Zur Nukleinsäureextraktion verwendete		Ergebnisse Ansätze					
			Nährbouillon	Nähragar			Verdünnungsstufe	Keimgehalte (KbE/ml)	I A	I B	II A	II B		
Pilze			Candida albicans	CASO-Bouillon	Columbia Blutagar	25°C, aerob	4,0 x 10 ⁷	10 ⁻²	ca. 10 ⁵	negativ				
			Geotrichum candidum	"	"	"	3,4 x 10 ⁶	"	ca. 10 ⁴					
Bakterien	Gram-positiv		Bacillus cereus	"	"	30°C, aerob	1,0 x 10 ⁷	"	ca. 10 ⁵	negativ				
			Bacillus subtilis	"	"	"	4,2 x 10 ⁶	"	ca. 10 ⁴					
			Clostridium perfringens	"	"	37°C, anaerob	2,9 x 10 ⁸	"	ca. 10 ⁶					
			Enterococcus faecalis	"	"	37°C, aerob	5,3 x 10 ⁹	"	ca. 10 ⁷					
			Lactobacillus brevis	MRS-Bouillon	MRS-Agar	25°C, aerob	1,5 x 10 ⁷	"	ca. 10 ⁵					
			Listeria monocytogenes	CASO-Bouillon	Columbia Blutagar	37°C, aerob	2,6 x 10 ⁹	"	ca. 10 ⁷					
			Micrococcus luteus	"	"	"	1,6 x 10 ⁷	"	ca. 10 ⁵					
			Staphylococcus aureus	"	"	"	4,8 x 10 ⁸	"	ca. 10 ⁶					
	Gram-negativ	Oxidase-positiv		Campylobacter jejuni	"	"	42°C, mikro-aerophil	1,4 x 10 ⁸	"	ca. 10 ⁶	negativ			
				Pseudomonas aeruginosa	"	Plate-Count-Agar	25°C, aerob	3,2 x 10 ⁸	"	ca. 10 ⁶				
				Vibrio cholerae	"	CASO-Agar	37°C, aerob	1,1 x 10 ⁷	"	ca. 10 ⁵				
				Vibrio parahaemolyticus	"	"	"	3,0 x 10 ⁶	"	ca. 10 ⁴				
		Oxidase-negativ		Citrobacter freundii	"	Columbia Blutagar	"	7,9 x 10 ⁸	"	ca. 10 ⁶				
					Enterobacter sakazakii	"	"	"	1,6 x 10 ⁹	"				
Escherichia coli				DSM 1103	"	Mueller-Hinton-Agar	"	1,3 x 10 ⁹	"	ca. 10 ⁷				
				DSM 30083				2,5 x 10 ⁹	"	ca. 10 ⁷				
				RKI C600				1,0 x 10 ⁹	"	ca. 10 ⁷				
				NCTC 12900				> 10 ⁹	"	> 10 ⁶				
Proteus vulgaris				"	Columbia Blutagar	"	4,1 x 10 ⁸	"	ca. 10 ⁶					
Salmonella Choleraesuis				"	"	"	7,4 x 10 ⁸	"	ca. 10 ⁶					
Salmonella Saint-paul				"	"	"	4,8 x 10 ⁸	"	ca. 10 ⁶					
Shigella sonnei				"	Mueller-Hinton-Agar	"	9,0 x 10 ⁸	"	ca. 10 ⁶					
Yersinia enterocolitica (apathogen)				"	Columbia Blutagar	30°C, aerob	1,3 x 10 ⁹	"	ca. 10 ⁷					
Yersinia frederiksenii				"	"	"	6,3 x 10 ⁸	"	ca. 10 ⁶					
Yersinia intermedia	"	"	"	1,0 x 10 ⁹	"	ca. 10 ⁷								
Yersinia kristensenii	"	"	"	1,4 x 10 ⁹	"	ca. 10 ⁷								

 Pilze
 Gram-positive Bakterien
 Gram-negative Bakterien

CASO = Caseinpepton-Sojamehlpepton, MRS = deMan, Rogosa und Sharpe

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, NCTC = National Collection of Type Cultures, RKI = Robert Koch Institut

6.2.2 Verfahrensvergleichsuntersuchung

Es wurde eine vergleichende Untersuchung zwischen dem „Horizontalen Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Y. enterocolitica*“ L 00.00-90 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (Referenzmethode) und dem eigens entwickelten Verfahren zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* durchgeführt. Beim amtlichen Verfahren handelt es sich um ein kulturelles Nachweisverfahren, wohingegen das eigene Verfahren neben dem kulturellen Nachweis ein PCR-Screening einschließt.

Um die Voraussetzungen für die Validierung eines horizontalen Verfahrens zu erfüllen wurden beide Verfahren im Doppelansatz anhand fünf verschiedener Lebensmittelmatrizes getestet:

- Hackfleisch vom Schwein
- Rohwurst schnittfest (Salami, mit Schweinefleisch)
- Frische Vollmilch (pasteurisierte Kuhmilch: 3,5 % Fett)
- Käse (aus pasteurisierter Kuhmilch: Limburger 40 % Fett i. Tr.)
- Vorzerkleinerter Salat (Rohkost Mix)

Aufgrund des Mangels an einer ausreichenden Zahl an natürlich mit pathogenen *Y. enterocolitica* kontaminierten Proben, wurden die zur Untersuchung ausgewählten Lebensmittel künstlich beimpft. Um eine natürliche Kontamination dieser Proben mit pathogenen *Y. enterocolitica* auszuschließen, wurden sie vor Beginn der Verfahrensvergleichsuntersuchung mit dem in Abschnitt 6.1 beschriebenen Verfahren zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* untersucht.

Weiterhin wurde vor der Inokulation der Proben eine Bestimmung der Gesamtkeimzahl zur Ermittlung der Höhe der produktspezifischen Begleitkeime durchgeführt. Dazu wurden 10 g Untersuchungsmaterial (Hackfleisch, Rohwurst, Käse, Salat) mit der 9-fachen Menge Verdünnungslösung homogenisiert. Als Verdünnungslösung für Hackfleisch, Rohwurst und Salat wurde NaCl-Pepton-Lösung und für Käse viertelstarke Ringerlösung verwendet. Aus dem jeweiligen Homogenat wurde eine dezimale Verdünnungsreihe hergestellt.

Jeweils 100 µl der geeigneten Verdünnungsstufen wurden mit einer sterilen Demeterpipette auf zwei Plate-Count-Agar-Platten gegeben und eingespatelt:

- | | |
|---------------|---|
| • Hackfleisch | Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} |
| • Rohwurst | Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-6} |
| • Käse | Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-7} |
| • Salat | Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} |

Da bei der pasteurisierten frischen Vollmilch allenfalls eine sehr niedrige Gesamtkeimzahl zu erwarten war, wurden aus dem unverdünnten Original 2 x 1,0 ml gleichmäßig auf jeweils drei Plate-Count-Agar-Platten (Verdünnungsstufe 0), sowie jeweils 100 µl des unverdünnten Originals auf zwei Platten gegeben und eingespatelt (Verdünnungsstufe 10^{-1}). Die Bebrütung der Platten erfolgte bei 30 °C für 72 h \pm 2 h. Die Berechnung der Gesamtkeimzahl pro g bzw. ml des Lebensmittels erfolgte nach dem gewogenen arithmetischen Mittel (Formel 8).

Zur Inokulation der Proben wurde der pathogene Referenzstamm *Y. enterocolitica* DSM Nr. 11502 als Zielkeim eingesetzt.

Mehrere kleine Kolonien des auf Blut-Agar angezüchteten Referenzstamms wurden in 10 ml CASO-Bouillon suspendiert und über Nacht bei 30 °C bebrütet. Aus der über Nacht bebrüteten Keimsuspension wurde eine dezimale Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe 10^{-7} angelegt. Zur Ermittlung der in der Keimsuspension vorhandenen Zahl an pathogenen *Y. enterocolitica* wurden je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} auf zwei CIN-Platten ausgespatelt und bei 30 °C für 20 h \pm 2 h bebrütet. Im Anschluss an die Bebrütung wurden die typischen Kolonien ausgezählt. Die Berechnung der Anzahl der Yersinien pro ml erfolgte nach dem gewogenen arithmetischen Mittel (Formel 8).

Für die Durchführung des eigens entwickelten Verfahrens zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* wurden von jeder Matrix 2 x 10 g bzw. ml mit je 90 ml CASO-Bouillon für 2 min homogenisiert. Anschließend wurde ein Homogenat jeder Matrix mit 1 ml aus der Verdünnungsstufe 10^{-5} , das andere mit 1 ml aus der Verdünnungsstufe 10^{-7} beimpft. Der weitere Ablauf der Untersuchung erfolgte gemäß dem in Abschnitt 6.1 beschriebenen Verfahren.

Das amtliche Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB sieht eine Anreicherung der Keime in PSB sowie in ITC-Bouillon vor. Entsprechend wurden zunächst von jeder Matrix 2 x 10 g bzw. ml mit je 90 ml PSB für 2 min homogenisiert. Anschließend wurde jeweils ein Homogenat jeder Matrix mit 1 ml aus der Verdünnungsstufe 10^{-5} , das andere mit 1 ml aus der Verdünnungsstufe 10^{-7} beimpft. Weiterhin wurden von jeder Matrix 2 x 1 g bzw. ml mit je 99 ml ITC-Bouillon für 2 min homogenisiert. Die Homogenate wurden entsprechend der niedrigeren Einwaage mit jeweils 0,1 ml aus einer der hergestellten Verdünnungsstufen 10^{-5} bzw. 10^{-7} beimpft. Die weitere Untersuchung der inokulierten Ansätze wurde gemäß dem amtlichen Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB durchgeführt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Vergleichende Darstellung des chronologischen Ablaufes der Verfahrensvergleichsuntersuchung

	Eigenes Verfahren	Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB
Tag 0	Anzucht des Zielorganismus	
Tag 1	Einwaage und Erstanatz 10 g Einwaage + 90 ml CASO-Bouillon, Inokulation mit 1 ml der entsprechenden Verdünnungsstufe des Zielorganismus, 1-2 h bei Raumtemperatur stehen lassen	Einwaage und Ansatz PSB 10 g Einwaage + 90 ml PSB, Inokulation mit 1 ml der entsprechenden Verdünnungsstufe des Zielorganismus, Bebrütung 48 h ± 2 h bei 25 °C
	Direktausstrich 100 µl des Erstanatzes auf CIN(Dir), 3-Ösen-Ausstrich, Bebrütung 20 h ± 2 h bei 30 °C	Einwaage und Ansatz ITC Supplemente (je 100 µl) TIC + IRG in ITC-Basisnährmedium, 1 g Einwaage + 99 ml ITC-Bouillon, Inokulation mit 0,1 ml der entsprechenden Verdünnungsstufe des Zielorganismus, Bebrütung 48 h ± 2 h bei 25 °C
	Selektivanreicherung Supplemente (je 10 µl) TIC + IRG in ITC-Basisnährmedium, 1 ml des Erstanatzes in 10 ml ITC-Bouillon, Bebrütung 48 h ± 2 h bei 25 °C	
	Über-Nacht-Anreicherung Erstanatz bei 25 °C über Nacht bebrüten	
Tag 2	Laugenbehandlung 0,5 ml der Über-Nacht-Anreicherung in 4,5 ml KOH 0,5 %, 20 s schütteln, 3-Ösen-Ausstrich auf CIN(KOH) Bebrütung 20 h ± 2 h bei 30 °C	
	PCR-Screening	
	CIN(Dir) ablesen, SK auf Blut und CIN, Bebrütung 20 h ± 2 h bei 30 °C	
Tag 3	Ausstrich der Selektivanreicherung auf CIN 100 µl aus ITC auf CIN(ITC), 3-Ösen-Ausstrich, Bebrütung 20 h ± 2 h bei 30 °C	Ausstrich aus ITC auf SSDC 3-Ösen-Ausstrich, Bebrütung 24 h bei 30 °C
	CIN(KOH) ablesen, SK auf Blut und CIN, Bebrütung 20 h ± 2 h bei 30 °C	Laugenbehandlung 0,5 ml PSB in 4,5 ml KOH 0,5 %, 20 s schütteln, 3-Ösen-Ausstrich auf CIN(KOH) Bebrütung 24 h bei 30 °C
	SK CIN(Dir) und Blut(Dir) ablesen, Aufbewahrung im Kühlschrank	Ausstrich aus PSB auf CIN 3-Ösen-Ausstrich, Bebrütung 24 h bei 30 °C
Tag 4	CIN(ITC) ablesen, SK auf Blut und CIN, Bebrütung 20 h ± 2 h bei 30 °C	SSDC, CIN(PSB) und CIN(KOH) ablesen, SK auf Nähragar und CIN, Bebrütung 24 h bei 30 °C
	SK CIN(KOH) und Blut(KOH) ablesen, Aufbewahrung im Kühlschrank	

	Eigenes Verfahren	Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB
Tag 5	SK CIN(ITC) und Blut(ITC) ablesen	SK ablesen
	Orientierende Prüfung UREA-Test von verdächtigen SK, Bebrütung 22 h ± 2 h bei 30 °C	Orientierende Prüfung UREA-Test von verdächtigen SK, Bebrütung 22 h ± 2 h bei 30 °C
Tag 6	Biochemische Bestätigung von UREA+ Isolaten Bebrütung 24-48 h bei 30 °C	Biochemische Bestätigung von UREA+ Isolaten Bebrütung 24-48 h bei 30 °C
Tag 7	Auswertung der Biochemischen Bestätigung	Auswertung der Biochemischen Bestätigung
	Biochemische Identifizierung API® 20 E, Bebrütung 22 h ± 2 h bei 30 °C	Biochemische Identifizierung API® 20 E, Bebrütung 22 h ± 2 h bei 30 °C
Tag 8	Auswertung der Biochemischen Identifizierung	Auswertung der Biochemischen Identifizierung
	Serologische Identifizierung	Serologische Identifizierung
	Pathogenitätsprüfung mittels PCR	Pathogenitätsprüfung kulturell Calciumabhängigkeit (CASO-Agar, CSMOX), Bebrütung 48 h ± 2 h bei 25 °C und 37 °C
Tag 9		Bebrütung CASO-Agar und CSMOX
Tag 10		Ablesen der Pathogenitätsprüfung kulturell

CASO = Caseinpepton-Sojamehlpepton, CIN = Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin, CSMOX = Casein-Soja-Agar mit Magnesium und Oxalat, Dir = Direktausstrich, IRG = Irgasan-Lösung, ITC = Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat, KOH = Kaliumhydroxid, LFGB = Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch, PSB = Pepton-Sorbit-Gallensalz, SK = Subkultur, SSDC = Salmonella-Shigella-Agar mit Natriumdesoxycholat und Calciumchlorid, TIC = Ticarcillin-Lösung

6.2.3 Bestimmung der Nachweisgrenze

Die Bestimmung der Nachweisgrenze des eigens entwickelten Verfahrens zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* wurde parallel von zwei Personen jeweils im Doppelansatz durchgeführt.

Die Bestimmung erfolgte für die fünf auch bei der Verfahrensvergleichsuntersuchung eingesetzten Lebensmittelmatrizes (Hackfleisch, Rohwurst, Milch, Käse, Salat).

Um eine natürliche Kontamination dieser Proben mit pathogenen *Y. enterocolitica* auszuschließen, wurden sie vor Beginn der Untersuchung dem in Abschnitt 6.1 beschriebenen Verfahren zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* unterzogen. Analog zu der in Abschnitt 6.2.2 beschriebenen Verfahrensvergleichsuntersuchung wurde auch hier von jeder Lebensmittelmatrix vor der künstlichen Beimpfung eine Bestimmung der Gesamtkeimzahl durchgeführt.

Von jeder Lebensmittelmatrix wurden 3 x 10 g bzw. ml mit je 90 ml CASO-Bouillon für 2 min homogenisiert. Als Zielkeim wurde der pathogene Referenzstamm *Y. enterocolitica* DSM Nr. 11502 eingesetzt. Das Vorgehen bei der Anzucht des Zielkeims sowie bei der Berechnung der Anzahl der *Y. enterocolitica* pro ml entsprach dem in Abschnitt 6.2.2 Verfahrensvergleichsuntersuchung geschilderten Ablauf. Aus der in diesem Zusammenhang hergestellten dezimalen Verdünnungsreihe der Keimsuspension wurde das erste Homogenat jeder Matrix mit 1 ml aus der Verdünnungsstufe 10^{-5} , das zweite mit 1 ml aus der Verdünnungsstufe 10^{-6} , das dritte mit 1 ml der Verdünnungsstufe 10^{-7} beimpft und mit dem zu validierenden Verfahren (Abschnitt 6.1) untersucht.

6.3 Anwendung des Verfahrens zum Nachweis von pathogenen *Yersinia enterocolitica* zur Untersuchung der Proben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 100 Lebensmittelproben auf pathogene *Y. enterocolitica* untersucht. Der jeweilige Untersuchungsbeginn der einzelnen Proben ist in Tabelle 21 ersichtlich. Entsprechend des eigens entwickelten Verfahrens zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* (Abschnitt 6.1) ergab sich der folgende chronologische Ablauf:

Tag 1:

Zunächst wurde der **Erstansatz** aus 10 g **Einwaage** und 90 ml CASO-Bouillon hergestellt (Abschnitt 6.1 A). Es folgten der **Direktausstrich** auf CIN-Agar (Abschnitt 6.1 B), die **Selektivanreicherung** in ITC-Bouillon und die **Über-Nacht-Anreicherung** in CASO-Bouillon (Abschnitt 6.1 C).

Tag 2:

Aus der über Nacht bebrüteten CASO-Bouillon wurden die **Laugenbehandlung** mit anschließendem Ausstrich auf CIN-Agar (Abschnitt 6.1 D) sowie das **PCR-Screening** (Abschnitt 6.1 F) durchgeführt. Zudem erfolgten die Auswertung des am Vortag angelegten Direktausstriches auf CIN und die Anfertigung von Subkulturen auf CIN- und Columbia-Blut-Agar.

Tag 3:

Es wurde ein **Ausstrich der Selektivanreicherung auf CIN-Agar** (Abschnitt 6.1 G) durchgeführt. Die an Tag 2 aus der Laugenbehandlung angelegte CIN-Agar-Platte wurde ausgewertet und verdächtige Kolonien wurden auf CIN- und Columbia-Blut-Agar isoliert. Die Subkulturen des Direktausstriches wurden beurteilt und bis zur weiteren Bearbeitung im Kühlschrank aufbewahrt.

Tag 4:

Der aus der Selektivanreicherung angelegte CIN-Agar vom vorhergehenden Tag wurde ausgewertet und es erfolgte die Anfertigung von Subkulturen auf CIN- und Columbia-Blut-Agar. Darüber hinaus wurden die aus der Laugenbehandlung resultierenden Subkulturen überprüft und bis zur weiteren Bearbeitung im Kühlschrank aufbewahrt.

Tag 5:

Die Subkulturen der Selektivanreicherung wurden beurteilt. Es folgte die **orientierende Prüfung** (Abschnitt 6.1 I) der aus dem Direktausstrich, der Über-Nacht-Anreicherung mit

anschließender Laugenbehandlung sowie der Selektivanreicherung isolierten verdächtigen Subkulturen anhand des Urea-Tests.

Tag 6:

Mit den im Urea-Test positiven Isolaten wurde die **biochemische Bestätigung** (Biotypisierung) durchgeführt (Abschnitt 6.1 I).

Tag 7:

Es wurden die Tests der biochemischen Bestätigung ausgewertet. Bei unsicheren Reaktionen wurde die Bebrütung um weitere 24 h verlängert. Aus allen Subkulturen einer Probe, die ein identisches Biotypisierungsergebnis aufwiesen, wurde exemplarisch ein Isolat ausgewählt und mit dem Testsystem API[®] 20 E **biochemisch identifiziert** (Abschnitt 6.1 I).

Tag 8:

Zunächst erfolgte die Auswertung der am Vortag begonnenen biochemischen Identifizierung. Bei allen Isolaten, die durch den API[®] 20 E als *Y. enterocolitica* identifiziert und einem der Biotypen 1B, 2, 3, 4 oder 5 zugeordnet werden konnten, wurden die **serologische Identifizierung** (Abschnitt 6.1 I) sowie die **Pathogenitätsprüfung mittels PCR** (Abschnitt 6.1 J) durchgeführt.

ERGEBNISSE

7 Ergebnisse der In house-Validierung

7.1 Ergebnisse der Überprüfung der Inklusivität und der Exklusivität des PCR-Screenings

Inklusivität

Die Überprüfung der Inklusivität des PCR-Screenings auf die beiden Gene *ail* und *virF* erfolgte über den Nachweis des pathogenen Zielkeims *Y. enterocolitica* DSM Nr. 11502. Die Untersuchung wurde von zwei Personen (I und II) jeweils im Doppelansatz (A und B) durchgeführt. In der über Nacht bebrüteten Keimsuspension des Zielkeims wurde eine Keimzahl von $9,0 \times 10^7$ KbE/ml errechnet. Beide Zielgene wurden in allen vier Ansätzen ab der Verdünnungsstufe 10^{-6} (Keimgehalte im Bereich von ca. 10^2 KbE/ml) detektiert (Tabelle 13). Somit konnte die Eignung des PCR-Screenings den Zielkeim nachzuweisen bestätigt werden.

Tabelle 13: Ergebnisse der Überprüfung der Inklusivität des PCR-Screenings (Gene *ail/virF*)

Zielkeim	Errechnete Keimzahl nach Bebrütung (KbE/ml)	Zur Nukleinsäureextraktion verwendete		Ergebnisse Ansätze			
		Verdünnungsstufe	Keimgehalte (KbE/ml)	I A	I B	II A	II B
<i>Yersinia enterocolitica</i> DSM Nr. 11502 (pathogen)	$9,0 \times 10^7$	10^{-5}	ca. 10^3	positiv			
"	"	10^{-6}	ca. 10^2				
"	"	10^{-7}	ca. 10^1	negativ			

Gram-negativer Zielkeim

Exklusivität

Zur Überprüfung der Exklusivität wurden reine Mikroorganismenkulturen von 28 Nicht-Zielkeimen mithilfe des PCR-Screenings auf die Gene *ail* und *virF* untersucht. Die Untersuchung wurde von zwei Personen (I und II) jeweils im Doppelansatz (A und B) durchgeführt. In den bebrüteten Keimsuspensionen wurden je nach Mikroorganismus Keimzahlen von 10^6 bis 10^9 KbE/ml errechnet. Es wurde jeweils die Verdünnungsstufe 10^{-2} untersucht. Diese entsprach, je nach Mikroorganismus, Keimgehalten im Bereich von ca. 10^4 bis 10^7 KbE/ml. In keinem der Ansätze der 28 Nicht-Zielkeime konnten die beiden Gene detektiert werden. Somit wurde die Exklusivität des PCR-Screenings nachgewiesen (Tabelle 11).

7.2 Ergebnisse der Verfahrensvergleichsuntersuchung

7.2.1 Anwendungsbereich und Überblick

Das eigens entwickelte Verfahren wurde mit dem „Horizontalen Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Y. enterocolitica*“ L 00.00-90 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (Referenzmethode) verglichen.

In keiner der fünf zur Untersuchung eingesetzten Lebensmittel wurden vor der Inokulation pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen (Tabelle 20), eine natürliche Kontamination der Proben wurde somit ausgeschlossen. Die Höhe der produktspezifischen Begleitflora der einzelnen Lebensmittel ist in Tabelle 14 (Gesamtkeimzahl vor Inokulation) ersichtlich. Bei der Anzucht des zur Inokulation eingesetzten pathogenen Referenzstammes *Y. enterocolitica* DSM Nr. 11502 wurde in der über Nacht bebrüteten Keimsuspension eine Keimzahl von $8,1 \times 10^8$ KbE/ml erzielt. Die fünf Lebensmittelmatrizes wurden jeweils mit der Verdünnungsstufe 10^{-5} (Keimgehalte im Bereich von ca. 10^3 KbE/10 g Lebensmittel) und der Verdünnungsstufe 10^{-7} (Keimgehalte im Bereich von ca. 10^1 KbE/10 g Lebensmittel) beimpft und jeweils im Doppelansatz (A und B) untersucht (Tabelle 14).

Von den resultierenden 20 inokulierten Proben wurden mit dem eigenen Verfahren mithilfe des PCR-Screenings 19 Proben als positiv erkannt. Lediglich in einer niedrig (10^1) beimpften Salatprobe wurden keine pathogenen *Y. enterocolitica* detektiert. 13 Proben konnten kulturell bestätigt werden. In allen beimpften Ansätzen der Milch und der Rohwurst wurden pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen. Von den Käse- und Hackfleischproben waren jeweils die beiden hoch (10^3) beimpften Ansätze positiv. Bei den niedrig beimpften Käseproben wurden die Erreger lediglich aus einem der Ansätze isoliert, während beide niedrig beimpften Hackfleischproben negativ waren. Weder in den hoch noch in den niedrig beimpften Ansätzen des Salates konnten pathogene *Y. enterocolitica* kulturell nachgewiesen werden. Keine der kulturell positiven Proben erbrachte im PCR-Screening ein negatives Ergebnis.

Mit dem amtlichen Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB wurden lediglich 12 Proben als positiv nachgewiesen. So wurden aus allen beimpften Ansätzen der Milch und der Rohwurst sowie aus den hoch beimpften Ansätzen des Käses und des Hackfleisches pathogene *Y. enterocolitica* isoliert. Im Gegensatz zum kulturellen Nachweis des eigenen Verfahrens erbrachten beide niedrig beimpften Käseproben mit dem amtlichen Verfahren negative Ergebnisse. Auch aus den niedrig beimpften Ansätzen des Hackfleisches, sowie aus allen Ansätzen des Salates konnten die Erreger kulturell nicht nachgewiesen werden (Tabelle 23).

Tabelle 14: Ergebnisse der Verfahrensvergleichsuntersuchung im Überblick

Lebensmittelmatrix							
Gesamtkeimzahl vor Inokulation (KbE/g bzw. ml)	4,2 x 10 ⁶	10 ¹	A	-	-	+	+
			B	-	-	+	+
Hackfleisch	4,2 x 10 ⁶	10 ³	A	+	+	+	+
			B	+	+	+	+
Rohwurst	7,4 x 10 ⁸	10 ¹	A	+	+	+	+
			B	+	+	+	+
		10 ³	A	+	+	+	+
			B	+	+	+	+
Milch	< 1,0 x 10 ⁰	10 ¹	A	+	+	+	+
			B	+	+	+	+
		10 ³	A	+	+	+	+
			B	+	+	+	+
Käse	1,8 x 10 ⁹	10 ¹	A	-	-	+	+
			B	-	+	+	+
		10 ³	A	+	+	+	+
			B	+	+	+	+
Salat	5,1 x 10 ⁷	10 ¹	A	-	-	-	-
			B	-	-	+	+
		10 ³	A	-	-	+	+
			B	-	-	+	+
Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB	kulturell	Ansatz		-	-	+	+
		Eigenes Verfahren		-	-	+	+
Keimgehalt <i>Y. enterocolitica</i> (KbE/10 g bzw. ml)	4,2 x 10 ⁶	10 ¹	A	-	-	+	+
			B	-	-	+	+
PCR-Screening	kulturell	Ansatz		-	-	+	+
		Eigenes Verfahren		-	-	+	+

- Negatives Ergebnis + Positives Ergebnis
 LFGB = Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch

7.2.2 Überprüfung der Eignung der PCR als Screening-Verfahren

Zunächst sollte die Eignung der PCR auf die Gene *ail* und *virF* als Screening-Verfahren überprüft werden. Dazu erfolgte die Berechnung der Sensitivität und der Falsch-Negativ-Rate sowohl für das amtliche Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB als auch für das PCR-Screening und den kulturellen Nachweis des eigenen Verfahrens.

Die **Sensitivität** wurde definiert, als die Fähigkeit der zu validierenden Methode, den Zielorganismus nachzuweisen, wenn dieser in der Probe enthalten ist. Die Berechnung erfolgte mit der folgenden Formel:

Formel 9: Sensitivität

$$\text{Sensitivität [\%]} = \frac{\text{Anzahl positiver Ansätze des zu prüfenden Nachweises}}{\text{Anzahl inokulierter Proben}} \cdot 100$$

Die **Falsch-Negativ-Rate** beschreibt in diesem Zusammenhang die Anzahl der Resultate mit negativer Abweichung und wurde mit der folgenden Formel berechnet:

Formel 10: Falsch-Negativ-Rate

$$\text{Falsch - Negativ - Rate [\%]} = \frac{\text{Anzahl negativer Ansätze des zu prüfenden Nachweises}}{\text{Anzahl inokulierter Proben}} \cdot 100$$

Mit dem eigenen Verfahren wurden von den 20 inokulierten Proben mithilfe des PCR-Screenings 19 Proben als positiv erkannt. Lediglich in einem Ansatz des niedrig beimpften Salates wurden keine pathogenen *Y. enterocolitica* detektiert. Dies entspricht einer Sensitivität von 95 % sowie einer Falsch-Negativ-Rate von 5 %. Durch den kulturellen Nachweis wurden 13 der im PCR-Screening positiven Proben bestätigt. Sowohl die hoch, als auch die niedrig beimpften Salatansätze sowie die niedrig beimpften Hackfleischproben und ein Ansatz des niedrig beimpften Käses waren kulturell negativ. Somit konnte für den kulturellen Nachweis des eigenen Verfahrens eine Sensitivität von 65 % und eine Falsch-Negativ-Rate von 35 % ermittelt werden.

Mit dem amtlichen Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB wurden lediglich in 12 der 20 Proben pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen. Neben den hoch und niedrig beimpften Salatproben sowie den beiden niedrig beimpften Ansätzen des Hackfleisches waren auch die beiden niedrig beimpften Ansätze des Käses negativ. Das amtliche Verfahren ergab somit eine Sensitivität von 60 % sowie eine Falsch-Negativ-Rate von 40 %.

Folglich konnte im Rahmen dieser Untersuchungen zum Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* für das PCR-Screening eine deutlich höhere Sensitivität (95 %) gegenüber den kulturellen Nachweisen (eigenes Verfahren: 65 %, amtliches Verfahren: 60 %) ermittelt werden. Entsprechend wies die PCR mit 5 % eine sehr viel niedrigere Falsch-Negativ-Rate auf als der kulturelle Nachweis des eigenen Verfahrens mit 35 % und das amtliche Verfahren mit 40 %. Die beiden kulturellen Nachweise lieferten vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 4).

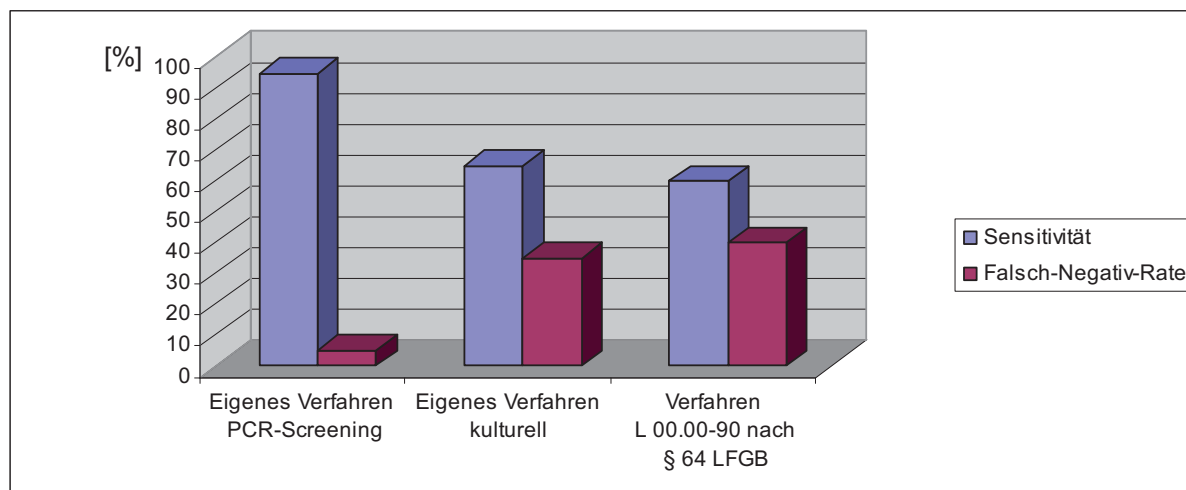


Abbildung 4: Vergleichende Darstellung der Sensitivität und der Falsch-Negativ-Rate der untersuchten Verfahren

LFGB = Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch

7.2.3 Vergleich des kulturellen Nachweises des eigenen Verfahrens mit dem amtlichen Verfahren L 00.00-90 nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches

Um eine zuverlässige Aussage über die Vergleichbarkeit des eigenen Verfahrens und der Referenzmethode zu erhalten, wurden bei der weiteren Auswertung der Vergleichsuntersuchung die Ergebnisse des kulturellen Nachweises des eigenen Verfahrens denen des amtlichen Verfahrens L 00.00-90 nach § 64 LFGB gegenübergestellt. Das Ziel beider Nachweise ist die Isolierung und anschließende Identifizierung der Erreger.

Zur Ermittlung der relativen Sensitivität, relativen Spezifität, relativen Falsch-Positiv- und relativen Falsch-Negativ-Rate des kulturellen Nachweises des eigenen Verfahrens gegenüber der Referenzmethode sowie zur Berechnung der Statistischen Übereinstimmung beider Verfahren wurden die Ergebnisse in das Auswerteschema für qualitative Nachweisverfahren eingetragen (Tabelle 6). Daraus ergab sich folgendes Schema (Tabelle 15)

Tabelle 15: Auswerteschema zur Verfahrensvergleichsuntersuchung

		Zu validierende Methode (eigenes Verfahren kulturell)		Summe
		+	-	
Referenzmethode (Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB)	+	12	0	12
	-	1	7	8
Summe		13	7	20

+ = positiver Nachweis resp. positive Beurteilung

- = negativer Nachweis resp. negative Beurteilung

LFGB = Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch

Relative Sensitivität

Zur Ermittlung der relativen Sensitivität wurden die 12 bei beiden Verfahren positiven Analyseergebnisse herangezogen. Da bei keinem Ansatz ein mit der Referenzmethode positives und zugleich mit der zu validierenden Methode negatives Ergebnis erzielt wurde, errechnete sich die relative Sensitivität als $12/(12+0) \cdot 100$ (Formel 1) und ergab für den kulturellen Nachweis des eigenen Verfahrens einen Wert von 100 %.

Relative Spezifität

Die relative Spezifität errechnete sich aus den sieben bei beiden Verfahren negativen Befunden sowie aus dem einen mit der zu validierenden Methode positiven, mit der Referenzmethode jedoch negativen Analyseergebnis. Sie wurde als $7/(1+7) \cdot 100$ (Formel 2) berechnet und ergibt für das alternative Verfahren 87,5 %.

Relative Falsch-Positiv-Rate

Die relative Falsch-Positiv-Rate beschreibt die Resultate mit positiver Abweichung. Von den acht mit der Referenzmethode negativen Ansätzen wurde mit der zu validierenden Methode einer als positiv erkannt. Somit ergibt sich für den kulturellen Nachweis des eigenen Verfahrens eine relative Falsch-Positiv-Rate von $1/(1+7) \cdot 100 = 12,5$ % (Formel 3).

Die so errechneten Werte für die relative Spezifität und die relative Falsch-Positiv-Rate gelten jedoch nur unter Vorbehalt, da falsch positive Befunde durch weitere Keimdifferenzierung als solche abgesichert werden müssen. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden die mit dem alternativen Verfahren isolierten Erreger durch biochemische, serologische und molekularbiologische Verfahren als pathogene *Y. enterocolitica* bestätigt. Das mit dem alternativen Verfahren positive, mit der Referenzmethode jedoch negative Ergebnis darf somit nicht als falsch positiv bezeichnet werden, sondern ist als wahrer positiver Befund anzusehen. In diesem Zusammenhang

muss auch das Ergebnis der relativen Spezifität relativiert werden, da die Anzahl der falsch positiven Analyseergebnisse in die Berechnung mit einfließt. So ergibt sich für die alternative Methode eine **wahre relative Falsch-Positiv-Rate** von 0 % und eine **wahre relative Spezifität** von 100 %.

Relative Falsch-Negativ-Rate

Da keine mit der Referenzmethode positiven und gleichzeitig mit der zu validierenden Methode negativen Ergebnisse auftraten, beträgt die relative Falsch-Negativ-Rate $0/(12+0) \cdot 100 = 0$ % (Formel 4).

Statistische Übereinstimmung

Zur Ermittlung der statistischen Übereinstimmung der beiden untersuchten Verfahren wurde der Konkordanzindex Kappa (Formel 5) bestimmt. Die Berechnung ergab für Kappa den Wert 0,89. Die Zuordnung dieses Wertes zu einer Übereinstimmungsstufe nach Tabelle 7 ergab eine fast vollständige Übereinstimmung des kulturellen Nachweises des eigenen Verfahrens und der amtlichen Methode L 00.00-90 nach § 64 LFGB.

7.3 Ergebnisse der Bestimmung der Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des eigens entwickelten Verfahrens wurde für jede im Rahmen der Validierung eingesetzte Lebensmittelmatrix (Hackfleisch, Rohwurst, Milch, Käse, Salat) ermittelt. Die Bestimmung erfolgte sowohl für das PCR-Screening auf die Gene *ail* und *virF* als auch für die Erregerisolierung mittels kulturellem Nachweis. Um eine natürliche Kontamination dieser Lebensmittel mit pathogenen *Y. enterocolitica* auszuschließen, wurden sie vor Beginn der Vergleichsuntersuchung mit dem in Abschnitt 6.1 beschriebenen Verfahren untersucht. In keiner der Proben wurden pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen (Tabelle 20). Die Höhe der produktspezifischen Begleitflora der einzelnen Lebensmittel ist in Tabelle 17 (Gesamtkeimzahl vor Inokulation) ersichtlich. In der zur Inokulation der Proben über Nacht bebrüteten Keimsuspension des pathogenen Referenzstammes *Y. enterocolitica* DSM Nr. 11502 wurde eine Keimzahl von $7,8 \times 10^8$ erreicht. Die fünf Proben wurden jeweils mit den drei Verdünnungsstufen 10^{-5} (Keimgehalte im Bereich von ca. 10^3 KbE/10 g Lebensmittel), 10^{-6} (Keimgehalte im Bereich von ca. 10^2 KbE/10 g Lebensmittel) und 10^{-7} (Keimgehalte im Bereich von ca. 10^1 KbE/10 g Lebensmittel) inokuliert und parallel von zwei Personen (I und II) jeweils im Doppelansatz (A und B) untersucht.

Bei den vier Lebensmittelmatrizes Hackfleisch, Rohwurst, Milch und Käse wurden mithilfe des PCR-Screenings auf die Gene *ail* und *virF* in allen beimpften Ansätzen pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen. Beim Salat waren alle vier hoch beimpften Ansätze (10^3), sowie drei der vier mittel beimpften Ansätze (10^2) positiv. Dagegen konnten in einem mittel beimpften und in den vier niedrig beimpften Ansätzen (10^1) keine pathogenen *Y. enterocolitica* detektiert werden.

Im Rahmen des kulturellen Nachweises wurden in allen beimpften Ansätzen der Milch und des Käses pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen. Von den Hackfleisch- und Rohwurstproben waren jeweils die vier hoch sowie die vier mittel beimpften Ansätze positiv. Demgegenüber wurden die Erreger lediglich aus einer der niedrig beimpften Hackfleischproben und aus drei der niedrig beimpften Rohwurstproben isoliert. Die vier hoch beimpften sowie zwei der mittel beimpften Salatproben waren positiv. Allerdings konnten in keinem der niedrig beimpften Ansätze pathogene *Y. enterocolitica* kulturell nachgewiesen werden (Tabelle 17).

Bei allen positiven Salatproben erfolgte die Isolierung der Erreger ausschließlich aus der selektiven Anreicherung in ITC-Bouillon. Weder bei den mittel noch bei den hoch beimpften Ansätzen des Salates konnten aus den nicht-selektiven Über-Nacht-Anreicherungen in CASO-Bouillon mit anschließender Laugenbehandlung sowie aus den Direktausstrichen die Erreger nachgewiesen werden. Außerdem wurden bei allen Lebensmittelmatrizes außer bei einer Hackfleischprobe aus keinem der niedrig beimpften Ansätze im Direktausstrich pathogene *Y. enterocolitica* isoliert. In den restlichen Ansätzen der verschiedenen Lebensmittelmatrizes konnten keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich der Erregerisolierung mithilfe des Direktausstriches, der nicht-selektiven-Anreicherung oder der selektiven Anreicherung festgestellt werden (Tabelle 24).

Die Nachweisgrenze wurde definiert als die kleinste Anzahl anzüchtbarer Mikroorganismen, die mit einer 50 %igen Treffsicherheit nachgewiesen werden kann. Sie liegt zwischen den beiden Konzentrationen der Kontamination, die weniger bzw. mehr als in 50 % der Fälle die Nachweisgrenze ergeben. Die Nachweisgrenze wurde folglich als Bereich ausgedrückt. So ergaben sich für das PCR-Screening und den kulturellen Nachweis des eigenen Verfahrens die in Tabelle 16 gelisteten Nachweisgrenzen.

Tabelle 16: Nachweisgrenze des PCR-Screenings und des kulturellen Nachweises des eigenen Verfahrens bezogen auf die jeweiligen Lebensmittelmatrizes

Lebensmittelmatrix	Nachweisgrenze (Keimzahlbereich in KbE/10 g bzw. ml)	
	PCR-Screening	kulturell
Hackfleisch	10 ¹	10 ¹ -10 ²
Rohwurst	10 ¹	10 ¹
Milch	10 ¹	10 ¹
Käse	10 ¹	10 ¹
Salat	10 ¹ -10 ²	10 ²

Bei diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Nachweisgrenzen sowohl in Abhängigkeit der Lebensmittelmatrix als auch in Abhängigkeit der Untersuchungsmethode (PCR oder kulturell) variieren. So wurden für das PCR-Screening bei den untersuchten Lebensmitteln tierischer Herkunft (Hackfleisch, Rohwurst, Milch und Käse) Nachweisgrenzen im Bereich von 10^1 KbE/10 g bzw. ml ermittelt. Beim pflanzlichen Lebensmittel Salat ergab sich eine Nachweisgrenze für das PCR-Screening im Bereich von 10^1 - 10^2 KbE/10 g. Bei den Lebensmittelmatrizes Rohwurst und Käse wurden trotz hoher Gesamtkeimzahlen vor der Inokulation (Rohwurst: $4,1 \times 10^7$ KbE/g, Käse: $1,6 \times 10^{10}$ KbE/g), analog zum PCR-Screening, auch für den kulturellen Nachweis Nachweisgrenzen im Bereich von 10^1 KbE/10 g festgestellt. Das Wachstum der produktspezifischen Begleitflora dieser Lebensmittel wurde durch die eingesetzten Medien weitgehend gehemmt. Somit konnten auf den zur Keimisolierung eingesetzten CIN-Agar-Platten für pathogene *Y. enterocolitica* verdächtige Kolonien gut identifiziert und isoliert werden. Auch bei der pasteurisierten Milch wurde für den kulturellen Nachweis eine Nachweisgrenze von 10^1 KbE/10 ml ermittelt. Bei der Bestimmung der Gesamtkeimzahl der Milch konnten innerhalb der Nachweisgrenzen keine Begleitkeime nachgewiesen werden (Gesamtkeimzahl: $<1,0 \times 10^0$ KbE/ml), wodurch auch hier die Identifizierung und Isolierung verdächtiger Kolonien problemlos verlief. Dagegen wurde sowohl beim Hackfleisch als auch beim Salat die Identifizierung verdächtiger Kolonien durch das starke Wachstum produktspezifischer Begleitkeime auf CIN-Agar erschwert. Die Gesamtkeimzahl des Hackfleischs lag mit $5,5 \times 10^5$ KbE/g niedriger als die des Salats mit $2,2 \times 10^7$ KbE/g. Entsprechend konnte für den kulturellen Nachweis beim Hackfleisch eine niedrigere Nachweisgrenze (10^1 - 10^2 KbE/10 g) als beim Salat (10^2 KbE/10 g) ermittelt werden. Bei beiden Lebensmittelmatrizes wurde demnach für den kulturellen Nachweis eine um ca. eine Zehnerpotenz höhere Nachweisgrenze als für das PCR-Screening festgelegt. Auch im Vergleich zur Rohwurst, zum Käse und zur Milch wurden bei diesen Matrizes höhere Nachweisgrenzen erzielt.

8 Ergebnisse der Untersuchung der Lebensmittelproben

8.1 Ergebnisse des PCR-Screenings

Bei allen untersuchten Lebensmittelproben wurde aus der Über-Nacht-Anreicherung zunächst ein PCR-Screening auf das chromosomale *ail*-Gen durchgeführt. Der molekularbiologische Nachweis dieses Gens verlief bei vier der 32 Hackfleischproben positiv (12,5 %), wobei es sich bei allen vier Proben um Hackfleisch vom Schwein (Proben-Nummern 1, 6, 9, 23) handelte. Weiterhin wurde innerhalb der Warengruppe Innereien vom Schwein das Gen in einer (Proben-Nummer 86) von vier Schweinezungen (25 %) detektiert ([Abbildung 5](#)). Weder in den 44 Proben rohes Fleisch noch in den 13 Proben stabilisierte, nicht hitzebehandelte Fleischerzeugnisse konnte das *ail*-Gen festgestellt werden.

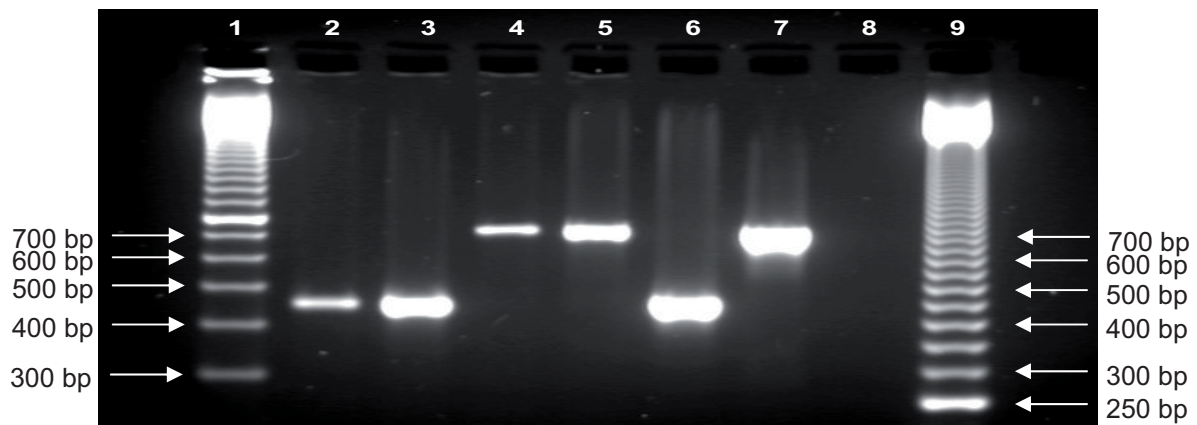


Abbildung 5: Positives Ergebnis des PCR-Screenings auf die Gene *ail* und *virF* (Schweinezunge, Proben-Nummer 86)

- 1: 100 Basenpaare (bp)-Marker
- 2: Probe „Schweinezunge“ mit positivem Ergebnis (*ail*-Gen)
- 3: Amplifikat der Inhibitionskontrolle (*ail*-Gen)
- 4: Probe „Schweinezunge“ mit positivem Ergebnis (*virF*-Gen)
- 5: Amplifikat der Inhibitionskontrolle (*virF*-Gen)
- 6: Positiv-Kontrolle *ail*-Gen
- 7: Positiv-Kontrolle *virF*-Gen
- 8: Reagenzien-Kontrolle (Thermocycler-Leerwert, TL)
- 9: 50 Basenpaare-Marker

Zur Ermittlung der vollständigen Virulenz der detektierten Erreger folgte bei den *ail*-positiven Proben eine PCR mit dem plasmoidalen Zielgen *virF*. Bei allen fünf Proben gelang der Nachweis dieses zweiten Zielgens ([Tabelle 18](#)). Somit wurden mithilfe des PCR-Screenings in fünf der insgesamt 100 untersuchten Lebensmittelproben (5 %) pathogene *Y. enterocolitica* detektiert.

Tabelle 18: Übersicht über die Ergebnisse des PCR-Screenings

Warengruppe	Produkt	Proben- Nummer	Ergebnisse PCR-Screening	
			<i>ail</i>	<i>virF</i>
Rohes Hackfleisch	Hackfleisch, Schwein (FP)	1	+	+
	Hackfleisch, Schwein (OW)	6	+	+
	Hackfleisch, Schwein (OW)	9	+	+
	Hackfleisch, Schwein (FP)	23	+	+
Innereien vom Schwein	Schweinezunge (OW)	86	+	+

FP: Fertigpackung; OW: Offene Ware

Besonderheiten bei der Durchführung der Nukleinsäureextraktion

Als Vorbereitung für das PCR-Screening wurde aus der Über-Nacht-Anreicherung eine Nukleinsäureextraktion mit dem Probenaufarbeitungs-Kit InstaGene™ Matrix von BIO RAD gemäß dem Verfahren zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* (Abschnitt 6.1 F) durchgeführt. Dieser ermöglichte die Aufreinigung der DNA innerhalb von ca. 45 min (reine Inkubationszeit laut Hersteller: 23 bis 38 min). Trotz dieser Behandlung mussten im Laufe der Untersuchungen vereinzelt Inhibitionen der PCR beobachtet werden, welche durch ein Fehlen des für die Inhibitionskontrolle spezifischen Amplifikats (Amplifikatgröße *ail*: 454 bp) auf dem Agarosegel deutlich wurden (Abbildung 6). Es handelte sich dabei ausschließlich um die drei Proben „Schweineleber“ (Proben-Nummern 72, 79 und 82, Tabelle 21). Das Ergebnis des PCR-Screenings auf das *ail*-Gen musste folglich bei diesen Proben zunächst als fraglich beurteilt werden.

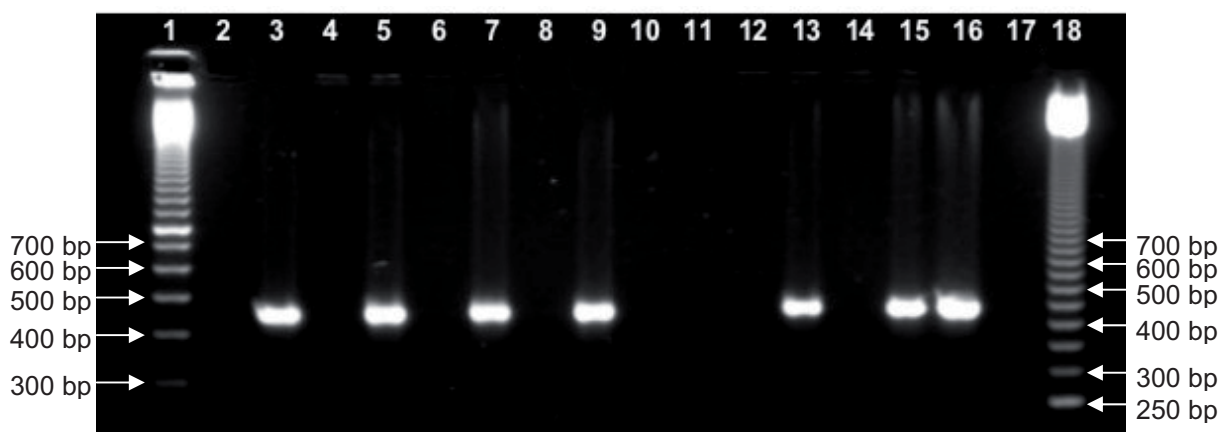


Abbildung 6: Inhibition des PCR-Screenings bei einer Probe „Schweineleber“

- 1: 100 Basenpaare (bp)-Marker
- 2, 4, 6, 8, 12, 14: Proben mit negativem Ergebnis (*ail*-Gen)
- 3, 5, 7, 9, 13, 15: Amplifikate der Inhibitionskontrollen (*ail*-Gen) zu den jeweils vorangestellten Proben
- 10: Probe „Schweineleber“ mit fraglichem Ergebnis (*ail*-Gen)
- 11: Fehlen des Amplifikats der Inhibitionskontrolle (*ail*-Gen) zur Probe „Schweineleber“ (Bahn 10)
- 16: Positiv-Kontrolle (*ail*-Gen)
- 17: Reagenzien-Kontrolle (Thermocycler-Leerwert, TL)
- 18: 50 Basenpaare-Marker

Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, wurde das PCR-Screening bei diesen drei Proben wiederholt, wobei die Nukleinsäureextraktion mithilfe des DNeasy® Blood & Tissue Kit von QIAGEN durchgeführt wurde. Dies war mit einem höheren Arbeitsaufwand sowie einem Zeitbedarf von bis zu 3,5 h verbunden (reine Inkubationszeit laut Hersteller: 1-3 h). Durch den Einsatz dieses Kits konnten die Inhibitionseffekte letztendlich ausgeschaltet werden (Abbildung 7). Die mitgeführte Inhibitionskontrolle lieferte bei allen drei untersuchten Proben „Schweineleber“ das erwartete Amplifikat. Pathogene *Y. enterocolitica* wurden jedoch in diesen Proben nicht detektiert.

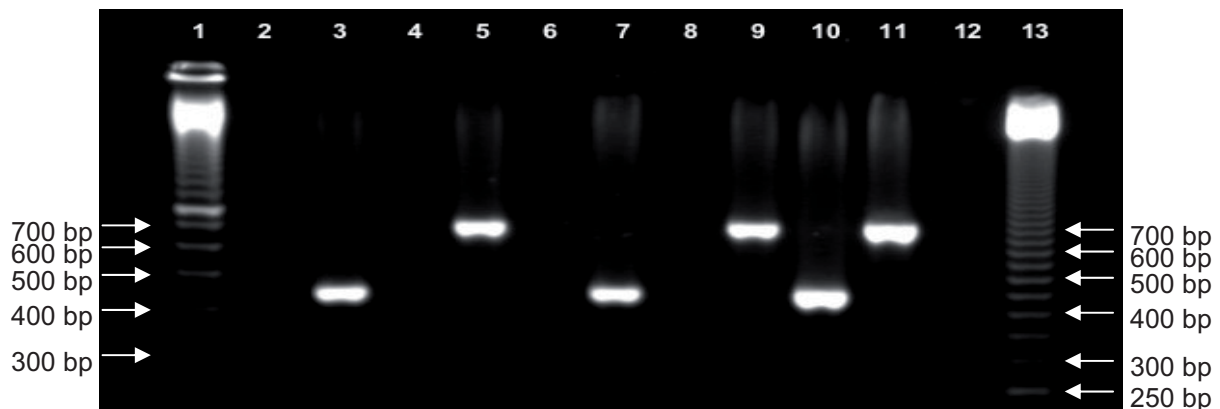


Abbildung 7: Ausschaltung der Inhibitionseffekte bei zwei Proben „Schweineleber“ nach Einsatz des DNeasy® Blood & Tissue Kit von QIAGEN

- 1: 100 Basenpaare (bp)-Marker
- 2, 6: Proben „Schweineleber“ mit negativem Ergebnis (*ail*-Gen)
- 3, 7: Amplifikate der Inhibitionskontrollen (*ail*-Gen) zu den jeweils vorangestellten Proben
- 4, 8: Proben „Schweineleber“ mit negativem Ergebnis (*virF*-Gen)
- 5, 9: Amplifikate der Inhibitionskontrollen (*virF*-Gen) zu den jeweils vorangestellten Proben
- 10: Positiv-Kontrolle *ail*-Gen
- 11: Positiv-Kontrolle *virF*-Gen
- 12: Reagenzien-Kontrolle (Thermocycler-Leerwert, TL)
- 13: 50 Basenpaare-Marker

8.2 Ergebnisse des kulturellen Nachweises

Mit dem entwickelten Verfahren zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* wurden aus insgesamt 16 der 100 untersuchten Lebensmittelproben *Yersinia* spp. isoliert (16 %). Diese 16 Proben konnten den Warengruppen „rohes Fleisch“, „rohes Hackfleisch“ und „Innereien vom Schwein“ zugeordnet werden. Dabei wurden *Yersinia* spp. in 9 der 44 Proben „rohes Fleisch“ (20,5 %), in 5 der 32 Proben „rohes Hackfleisch“ (15,6 %) sowie in 2 der 11 Proben „Innereien vom Schwein“ (18,2 %) festgestellt. In einer Probe Schweinefleisch vom Bug (Proben-Nummer 61), in drei Proben Hackfleisch vom Schwein (Proben-Nummern 6, 9, 10) sowie in einer Schweineleber (Proben-Nummer 79) konnten gleichzeitig jeweils zwei verschiedene Vertreter der Gattung *Yersinia* nachgewiesen werden (Tabelle 19). Aus keiner der Proben der Warengruppe „stabilisierte, nicht hitzebehandelte Fleischerzeugnisse“ wurden *Yersinia* spp. isoliert.

Tabelle 19: Übersicht über die Ergebnisse des kulturellen Nachweises

Warengruppe	Produkt	Proben-Nummer	Ergebnisse kulturell
Rohes Fleisch	Schweinerückensteak (OW)	16	<i>Y. frederiksenii</i>
	Schweinehalskotelett (FP)	18	<i>Y. enterocolitica-like*</i>
	Schweinemedallions (FP)	34	<i>Y. enterocolitica</i> Biotyp 1A
	Schweine-Schnitzel (FP)	39	<i>Y. frederiksenii</i>
	Schweinefleisch, Bug (OW)	61	<i>Y. kristensenii</i> <i>Y. intermedia</i>
	Fleischstücke, Schwein (OW)	67	<i>Y. enterocolitica</i> Biotyp 1A
	Schinken-Schnitzel (FP)	69	<i>Y. enterocolitica-like</i>
	Schinkengulasch, Schwein (FP)	73	<i>Y. intermedia</i>
	Brasilianische Kalbs-Kugel (FP)	98	<i>Y. enterocolitica</i> Biotyp 1A
Rohes Hackfleisch	Hackfleisch, Schwein (FP)	1	<i>Y. enterocolitica</i> Biotyp 1A
	Hackfleisch, Schwein (OW)	6	<i>Y. enterocolitica</i> Biotyp 1A <i>Y. frederiksenii</i>
	Hackfleisch, Schwein (OW)	9	<i>Y. kristensenii</i> <i>Y. frederiksenii</i>
	Hackfleisch, Schwein (OW)	10	<i>Y. enterocolitica-like</i> <i>Y. intermedia</i>
	Hackfleisch, Schwein (OW)	28	<i>Y. enterocolitica</i> Biotyp 1A
Innereien vom Schwein	Schweineleber (FP)	79	<i>Y. enterocolitica</i> Biotyp 1A <i>Y. frederiksenii</i>
	Schweinezunge (OW)	86	<i>Y. enterocolitica</i> Bioserotyp 4/O:3

FP: Fertigpackung; OW: Offene Ware

*als *Y. enterocolitica-like*-Stämme wurden diejenigen mittels API® 20 E als *Y. enterocolitica* identifizierten Isolate bezeichnet, die im Rahmen der Biotypisierung uncharakteristische Reaktionen zeigten (vgl. Ergebnisse der biochemischen (API® 20 E) und serologischen Identifizierung)

Bei den isolierten *Yersinia* spp. handelte es sich überwiegend um die ubiquitär vorkommenden apathogenen Vertreter *Y. enterocolitica* Biotyp 1A (7 Proben), *Y. enterocolitica*-like (3 Proben), *Y. frederiksenii* (5 Proben) und *Y. kristensenii* (2 Proben). Pathogene *Y. enterocolitica* wurden nur aus einer Probe (Schweinezunge, Proben-Nummer 86) isoliert. Der Stamm konnte dem Bioserotyp 4/O:3 zugeordnet werden (Abbildung 8).

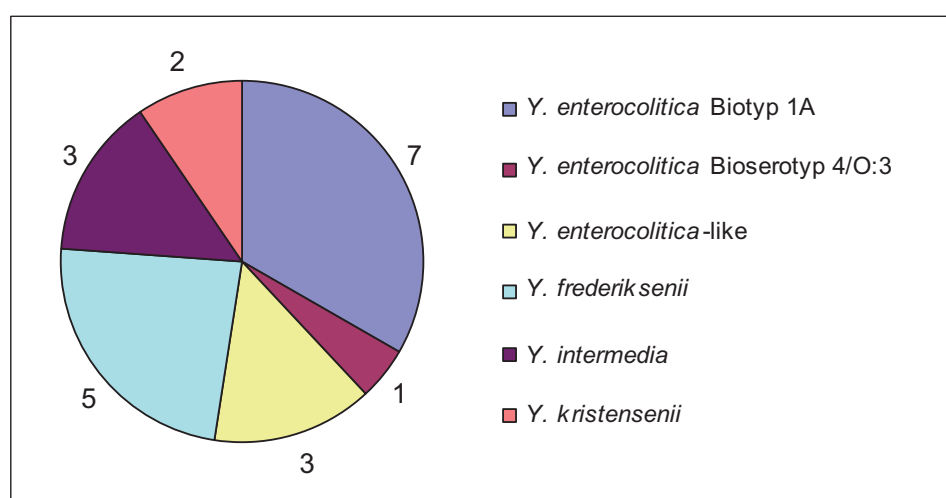


Abbildung 8: Übersicht über die isolierten *Yersinia* spp.

Ergebnisse der einzelnen Isolierungsverfahren

In dieser Arbeit wurden der Direktausstrich (Dir), die nicht-selektive Über-Nacht-Anreicherung in CASO-Bouillon mit anschließender KOH-Behandlung (KOH) und die Selektivanreicherung in ITC-Bouillon (ITC) als Isolierungsverfahren für den Nachweis von *Y. enterocolitica* eingesetzt. Die in einer Schweinezunge (Proben-Nummer 86) festgestellten pathogenen *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 konnten ausschließlich durch die Anreicherung in ITC-Bouillon isoliert werden.

Apathogene *Y. enterocolitica* Biotyp 1A wurden in 7 Proben ermittelt. Dabei wurden die Keime bei 5 Proben lediglich über den Direktausstrich nachgewiesen. In einer Probe konnten *Y. enterocolitica* Biotyp 1A nur mithilfe der Über-Nacht-Anreicherung in CASO-Bouillon mit anschließender KOH-Behandlung isoliert werden. In einer weiteren Probe verlief der Nachweis bei beiden Anreicherungsverfahren (KOH und ITC) positiv.

Ergebnisse der orientierenden Prüfung (Urea-Test)

Die nach dem Direktausstrich, der nicht-selektiven Über-Nacht-Anreicherung in CASO-Bouillon mit anschließender KOH-Behandlung sowie der Selektivanreicherung in ITC-Bouillon isolierten verdächtigen Kolonien wurden dem Urea-Test unterzogen. Bei 55

Subkulturen aus insgesamt 16 Proben wurde eine positive Urease-Reaktion innerhalb von 24 h festgestellt. Es handelte sich dabei um die in Tabelle 19 aufgelisteten Proben. Bei jeder dieser 16 Proben wurden anhand der nachfolgenden biochemischen Identifizierung *Yersinia* spp. nachgewiesen.

Ergebnisse der biochemischen Bestätigung (Biotypisierung)

Alle 55 Subkulturen aus insgesamt 16 Proben, die im Urea-Test eine positive Reaktion zeigten wurden anhand des Tween-Esterase-Tests (TWE), der Äsculinvergärung (ÄSC), des Pyrazinamidase-Nachweises (PYR) sowie der Fermentation von Xylose (XYL), Trehalose (TRE) und Salicin (SAL) biochemisch bestätigt. 9 Subkulturen wiesen bei allen Tests außer der Fermentation von Trehalose ein negatives Ergebnis auf. Bei insgesamt 32 Subkulturen konnten bei allen Tests positive Reaktionen festgestellt werden. Die Ergebnisse der übrigen 14 Subkulturen wichen in ihren Reaktionen ab und stimmten nicht mit den für die verschiedenen Biotypen von *Y. enterocolitica* charakteristischen Kombinationen überein (Abbildung 9).

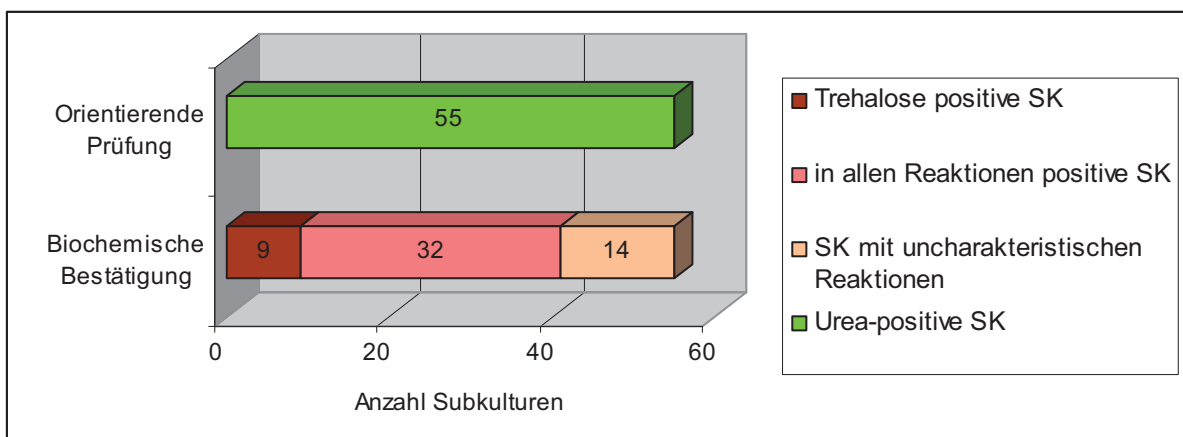


Abbildung 9: Übersicht über die biochemisch bestätigten Subkulturen (SK)

Ergebnisse der biochemischen (API® 20 E) und serologischen Identifizierung

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde aus allen Subkulturen einer Probe, die ein identisches Biotypisierungsergebnis aufwies, exemplarisch eine Subkultur ausgewählt und mithilfe des standardisierten Testsystems API® 20 E biochemisch identifiziert. Es wurden insgesamt 21 Subkulturen aus 16 Proben untersucht. Das API® 20 E-System erlaubt die Differenzierung zwischen *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii/intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*. 11 der untersuchten Isolate wurden als *Y. enterocolitica*, 8 als *Y. frederiksenii/intermedia* identifiziert. 2 weitere Subkulturen ergaben für *Y. kristensenii* typische Zahlenkombinationen.

Von den 11 mittels API® 20 E als *Y. enterocolitica* erkannten Subkulturen konnten 7 anhand der Ergebnisse der biochemischen Bestätigung dem Biotyp 1A, sowie 1 dem Biotyp 4 zugeteilt werden. Die restlichen 3 als *Y. enterocolitica* identifizierten Isolate wiesen im Rahmen der biochemischen Bestätigung uncharakteristische Reaktionen auf, weshalb eine Zuordnung zu einem der Biotypen nicht möglich war. Diese wurden als *Y. enterocolitica*-like-Stämme bezeichnet (Abbildung 10).

Die Unterscheidung zwischen *Y. frederiksenii* und *Y. intermedia* wurde mithilfe der im API® 20 E vorhandenen Tests RHA, SAC und MEL (Fermentation von L-Rhamnose, D-Saccharose und D-Melibiose, Tabelle 22) vorgenommen. Zeigten alle drei Reaktionen ein positives Ergebnis, handelte es sich um die Spezies *Y. intermedia*. Wurden jedoch nur die Substrate L-Rhamnose und D-Saccharose fermentiert, handelte es um *Y. frederiksenii*. Demnach wurden 5 der als *Y. frederiksenii/intermedia* erkannten Isolate als *Y. frederiksenii*, die übrigen 3 als *Y. intermedia* identifiziert.

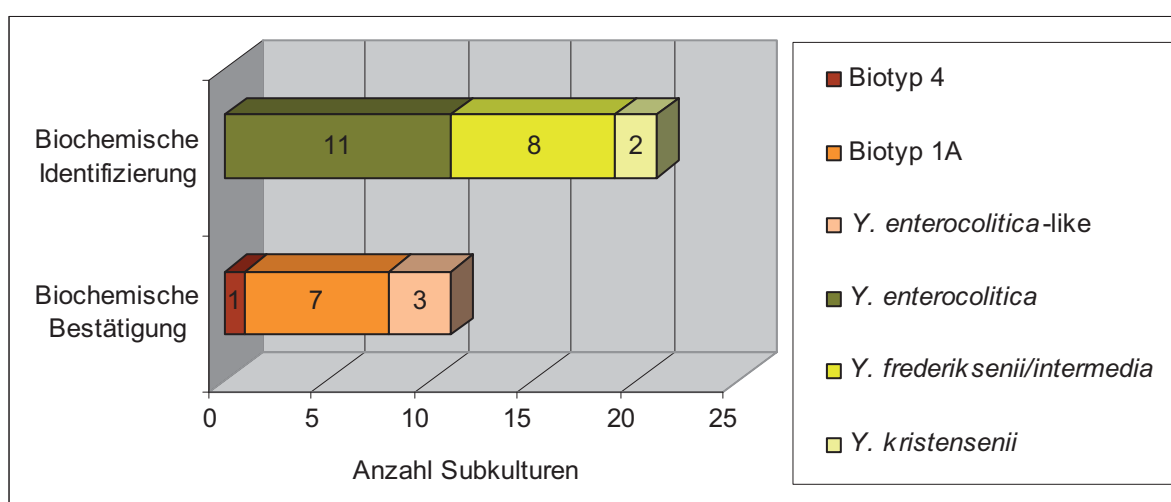


Abbildung 10: Übersicht über die biochemisch identifizierten Subkulturen

Die serologische Identifizierung des *Y. enterocolitica*-Stamms, der im Rahmen der biochemischen Bestätigung als Biotyp 4 eingestuft wurde (Schweinezunge, Proben-Nr. 86), erbrachte bei der Serotypbestimmung mittels monospezifischem Testserum Anti-*Y. enterocolitica* O:3 von SIFIN eine positive Reaktion.

Ergebnisse der Pathogenitätsprüfung mittels PCR

Der aus der Schweinezunge (Proben-Nummer 86) isolierte und innerhalb der vorangegangenen biochemischen und serologischen Tests als *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 identifizierte Stamm, wurde der Pathogenitätsprüfung mittels PCR unterzogen. Zur Feststellung der vollständigen Virulenz wurde sowohl auf das chromosomal kodierte Zielgen

ail als auch auf das plasmid kodierte Zielgen *virF* untersucht. Der Nachweis beider Zielgene *ail* und *virF* verlief positiv (Abbildung 11). Somit handelte es sich bei dem Isolat um einen vollständig virulenten Vertreter des in Europa am weitesten verbreiteten Bioserotyps 4/O:3 von *Y. enterocolitica*.

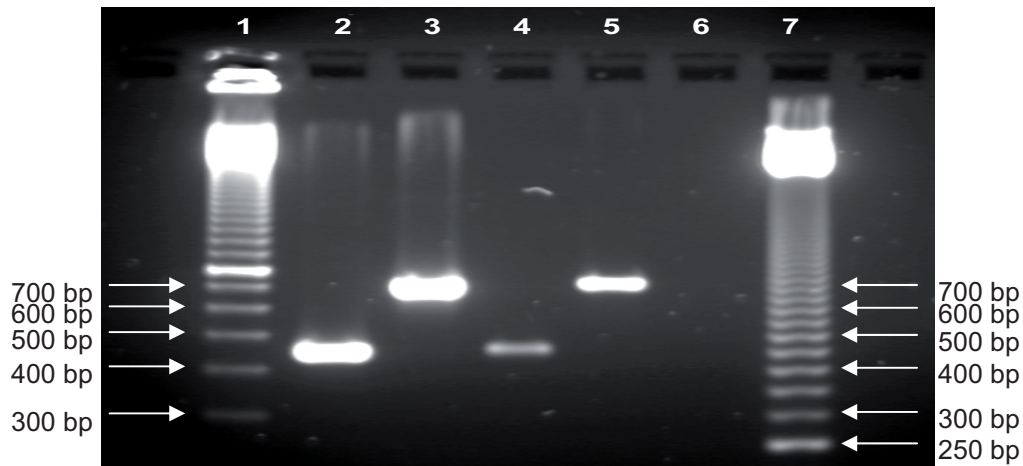


Abbildung 11: Positives Ergebnis der Pathogenitätsprüfung mittels PCR auf die Gene *ail* und *virF* (Schweinezunge, Proben-Nummer 86)

- 1: 100 Basenpaare (bp)-Marker
- 2: Isolat der Probe „Schweinezunge“ mit positivem Ergebnis (*ail*-Gen)
- 3: Isolat der Probe „Schweinezunge“ mit positivem Ergebnis (*virF*-Gen)
- 4: Positiv-Kontrolle *ail*-Gen
- 5: Positiv-Kontrolle *virF*-Gen
- 6: Reagenzien-Kontrolle (Thermocycler-Leerwert, TL)
- 7: 50 Basenpaare-Marker

8.3 Ergebnisse des PCR-Screenings und des kulturellen Nachweises im Vergleich

Im Rahmen des kulturellen Nachweises erfolgt die Isolierung der für *Y. enterocolitica* verdächtigen Kolonien auf CIN-Platten. Eine Abgrenzung von pathogenen zu apathogenen *Y. enterocolitica*-Isolaten bzw. zu den übrigen *Yersinia* spp. ist erst mithilfe der bei der biochemischen Bestätigung und Identifizierung, der serologischen Identifizierung sowie der Pathogenitätsprüfung mittels PCR erzielten Ergebnisse möglich. Im Vergleich dazu werden mit dem PCR-Screening, aufgrund des Einsatzes der Primer *ail* und *virF*, ausschließlich pathogene *Y. enterocolitica*-Stämme nachgewiesen. Apathogene Vertreter der Gattung *Yersinia* werden hingegen nicht detektiert.

Im Laufe der Untersuchungen konnten mithilfe des kulturellen Nachweises in 16 Lebensmittelproben *Yersinia* spp. nachgewiesen werden. Apathogene *Yersinia*-Stämme waren in 15 dieser Proben feststellbar. Pathogene *Y. enterocolitica* wurden aus einer Probe isoliert, wobei es sich bei dieser Probe um die auch im PCR-Screening positive Schweinezunge (Proben-Nummer 86) handelte. Insgesamt verlief der molekularbiologische Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* durch das PCR-Screening bei fünf der 100 untersuchten Proben positiv (Abbildung 12).

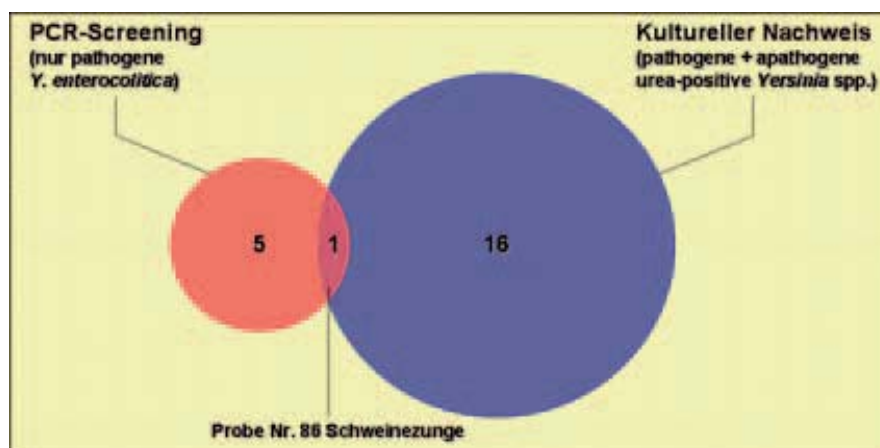


Abbildung 12: Vergleichende Darstellung der Anzahl *Yersinia*-positiver Proben mittels PCR-Screening und kulturellem Nachweis

Bei vier der im PCR-Screening positiven Proben war der kulturelle Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* nicht möglich. Aus einer dieser Proben (Proben-Nummer 23) konnten keine *Yersinia* spp. isoliert werden. In den übrigen drei Proben (Proben-Nummern 1, 6, 9) wurden kulturell lediglich apathogene Vertreter dieser Gattung festgestellt (*Y. enterocolitica* Biotyp 1A, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*).

Insgesamt wurden 35 Proben aus Fertigpackungen (FP) untersucht, wobei aus 8 (22,9 %) *Yersinia* spp. isoliert werden konnten. Mittels PCR-Screening wurden pathogene *Y. enterocolitica* in 2 der 35 Proben (5,7 %) detektiert. Bei den restlichen 65 untersuchten Proben handelte es sich um offene Ware (OW), wobei kulturell in 8 Proben (12,3 %) *Yersinia* spp., durch das PCR-Screening in 3 Proben (4,6 %) pathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen wurden (Abbildung 13, Tabelle 18, Tabelle 19).

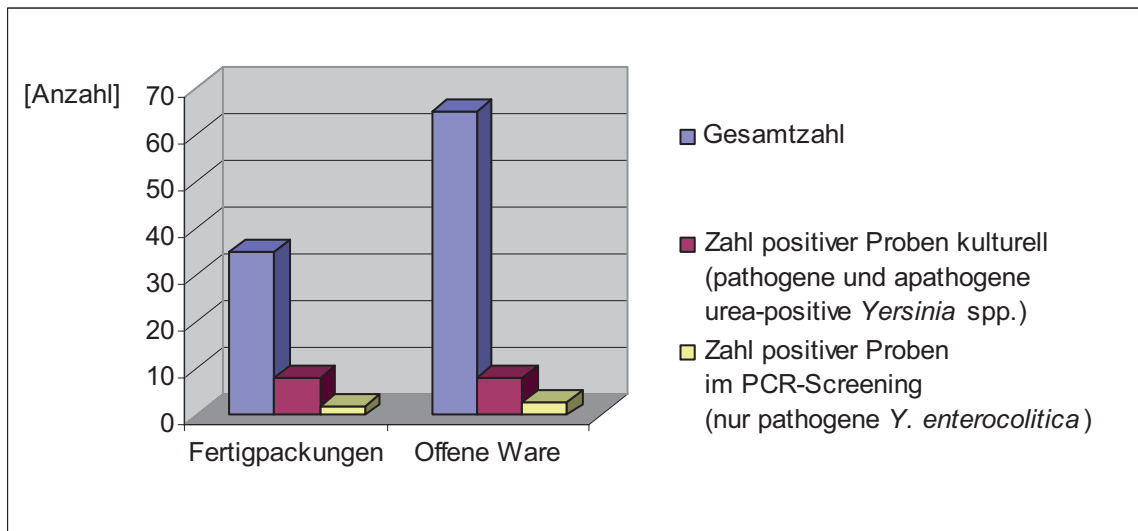


Abbildung 13: Vergleichende Darstellung der Anzahl *Yersinia*-positiver Proben aus Fertigpackungen und offener Ware

DISKUSSION

9 Aufbau des Verfahrens zum Nachweis von pathogenen *Yersinia enterocolitica*

Mit dieser Arbeit sollte ein für die amtliche Lebensmitteluntersuchung routinetaugliches Verfahren zum Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* entwickelt werden. Dabei wurde eine hohe Sensitivität und Spezifität, verbunden mit einem angemessenen Arbeits- und Zeitaufwand, angestrebt. Zur Beurteilung der Gesundheitsgefahr für den Verbraucher sollte zudem eine Aussage über die Lebensfähigkeit der Erreger getroffen werden können. Vor diesem Hintergrund erfolgte eine Kombination kultureller Methoden mit der PCR. Die PCR wurde zum einen als Screening-Verfahren, zum anderen zur Pathogenitätsbestimmung der Isolate eingesetzt. Dabei wurden das chromosomal kodierte *ail* und das plasmid kodierte *virF* als Zielgene ausgewählt. Die Primerpaare sowie das Temperatur-Zeit-Programm wurden aus der NMKL-Methode Nr. 163 A übernommen (Abschnitt 3.2). Das PCR-Screening wurde zunächst mit den *ail*-spezifischen Primern durchgeführt, wodurch das Auftreten falsch-negativer Ergebnisse, hervorgerufen durch einen Plasmidverlust, ausgeschlossen werden konnte.

Um eine Aussage über das Vorhandensein des Plasmids und somit über die vollständige Virulenz der Erreger treffen zu können, wurde bei einem Nachweis des *ail*-Gens ein weiteres Screening mit *virF*-spezifischen Primern nachgeschaltet. Durch den Einsatz des PCR-Screenings konnte bereits an Tag 2 der Untersuchung eine Kontamination der Proben mit pathogenen *Y. enterocolitica* festgestellt werden (vgl. Abschnitt 6.3). Für die Laborroutine bedeutet dies, dass im Falle eines negativen PCR-Ergebnisses die Untersuchung an diesem Punkt abgeschlossen werden kann, woraus eine Einsparung an zeit- und arbeitsaufwändigen Schritten zur Erregerisolierung und -identifizierung resultiert. Im Falle eines positiven Nachweises muss jedoch das Vorkommen lebensfähiger Keime durch kulturelle Methoden bestätigt werden. Diese verfügen, verglichen mit der PCR, über eine geringere Sensitivität beim Nachweis pathogener *Y. enterocolitica*, was auf die unterschiedlichen Ansprüche der verschiedenen Bioserotypen an die zur Anzucht eingesetzten Nährmedien, sowie auf die in Lebensmitteln häufig stark vorhandene Begleitflora zurückgeführt wird (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003; KAPPERUD, 1991; N.N., 2004b).

Um eine gewisse Empfindlichkeit zu erreichen, ist daher die Kombination verschiedener Nährmedien erforderlich (ALDOVA et al., 1990; HANK, 2003; NEUBAUER et al., 2001a). Im „Horizontalen Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Y. enterocolitica*“

L 00.00-90 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB wurde dies durch den Einsatz der beiden Anreicherungsbouillons PSB und ITC, der KOH-Behandlung sowie der beiden Agars CIN und SSSC berücksichtigt (N.N., 2004a). Auch bei dem hier entwickelten Verfahren wurden durch die parallele Durchführung eines Direktausstriches, einer nicht-selektiven Über-Nacht-Anreicherung in CASO-Bouillon sowie einer Selektivanreicherung in ITC-Bouillon die Voraussetzungen für den Nachweis eines möglichst breiten Spektrums an pathogenen Stämmen von *Y. enterocolitica* geschaffen.

Der Direktausstrich eignet sich zum Nachweis hoher Gehalte der Erreger ohne zeitaufwändige Anreicherung. Sind pathogene *Y. enterocolitica* indessen nur in niedriger Zahl in einer Probe vorhanden, besteht die Gefahr, dass sie durch das Wachstum der Begleitflora unterdrückt werden (HANK, 2003). Um auch geringe Gehalte an pathogenen *Y. enterocolitica* nachweisen zu können, wurden zwei verschiedene Anreicherungsmedien zu deren Vermehrung eingesetzt. Aufgrund der Kombination des kulturellen Nachweises mit dem PCR-Screening wurde zur Anreicherung pathogener *Y. enterocolitica* vor der PCR CASO-Bouillon ausgewählt, da im Zusammenhang mit der im amtlichen Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB vorgesehenen PSB-Bouillon von Inhibitionen berichtet wurde (ROSSEN et al., 1992). In der nicht-selektiven CASO-Bouillon können die verschiedenen Bioserotypen von *Y. enterocolitica* gleichermaßen angereichert werden, eine Hemmung der Begleitkeime bleibt jedoch aus, was die anschließende Erregerisolierung erschwert. Zur Verringerung der Begleitflora wurde daher die KOH-Behandlung nachgeschaltet, welche unter Ausnutzung der Alkalitoleranz von *Y. enterocolitica* eine Steigerung der Isolationsrate ermöglichen sollte (DE BOER, 1995). Als zweites Anreicherungsmedium wurde die selektive ITC-Bouillon verwendet, da diese sich insbesondere zum Nachweis des in Europa vorherrschenden Serotyps O:3 von *Y. enterocolitica* eignet. Durch die Hemmung der Begleitflora ist eine Isolierung auch bei geringem Ausgangsgehalt der Erreger möglich (HANK, 2003; N.N., 2004a; WAUTERS et al., 1988).

Im weiteren Verlauf kam der sowohl im amtlichen Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB, als auch in der NMKL-Methode Nr. 163 A verwendete CIN-Agar zum Einsatz. Dieser erlaubte eine Beurteilung der Koloniemorphologie bereits nach einer Bebrütungsdauer von 20 h. Da jedoch auf diesem Agar neben *Yersinia* spp. auch andere Keime wie *Citrobacter freundii*, *Serratia liquefaciens* und *Enterobacter agglomerans* verdächtige Kolonien bilden können (HEAD et al., 1982), wurde der Urea-Test nachgeschaltet, der eine einfache und kostengünstige erste Selektion der Isolate gestattete. Zur weiteren Kostenreduktion des Verfahrens folgte im Anschluss zunächst die Biotypisierung aller Urea-positiven Subkulturen einer Probe, bevor aus all denjenigen, die identische Reaktionen zeigten, exemplarisch ein

Isolat mit dem kommerziellen Testsystem API[®] 20 E identifiziert wurde. Die abschließende Charakterisierung verdächtiger Subkulturen, erfolgte durch serologische Identifizierung und Pathogenitätsprüfung. Zur Überprüfung der Pathogenität können kulturelle Verfahren, wie der Autoagglutinationstest oder die Feststellung der Calciumabhängigkeit und Kongorotaufnahme auf Kongorot-Magnesium-Oxalat-Agar, eingesetzt werden (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004; RILEY und TOMA, 1989). Auch die Anwendung der PCR ist zur Pathogenitätsprüfung geeignet (NEUBAUER et al., 2001a; THISTED LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM, 2005). Während das amtliche Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB die kulturelle Beurteilung des calciumabhängigen Wachstums auf CASO-Agar mit Magnesium und Oxalat nach 48 h Bebrütung vorsieht, wurde beim eigens entwickelten Verfahren die Pathogenität der Isolate mittels PCR festgestellt. Dadurch konnte verglichen mit dem amtlichen Verfahren eine Verkürzung der Untersuchungszeit um 2 Tage erreicht werden (Tabelle 12).

10 In house-Validierung

Die Norm DIN EN ISO 16140:2003 „Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren“ dient als Grundlage für die internationale Anerkennung und Zertifizierung mikrobiologischer Untersuchungsmethoden. Allerdings wird in der Einleitung und im Anwendungsbereich dieser Vorschrift darauf hingewiesen, dass die beschriebene Vorgehensweise wegen des Aufwandes bei einer Validierung hausinterner Routineverfahren nicht immer praktikabel ist und eine weniger strenge Validierung zweckmäßig sein kann (DIN EN ISO 16140, 2003). Aufgrund des Mangels an national oder international anerkannten Normen bezüglich der In house-Validierung mikrobiologischer Verfahren orientierten sich die hier durchgeführten Untersuchungen an den Vorgaben der von HÜBNER et al. (2002) veröffentlichten Publikation zur „In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren“ in Verbindung mit dem darauf basierenden Leitfaden der Schweizerischen Akkreditierungsstelle (N.N., 2006a), sowie der DIN EN ISO 16140:2003. Dabei wurde der Umfang der Validierung auf das Untersuchungsziel und die Erfordernisse des untersuchenden Labors abgestimmt.

10.1 Inklusivität und Exklusivität

Zunächst wurden die Inklusivität und Exklusivität des PCR-Screenings für beide Zielgene *ail* und *virF* überprüft. Die Untersuchung erfolgte gemäß DIN EN ISO 16140:2003 ohne Zugabe von Lebensmitteln, wodurch eine Beeinflussung der PCR durch verschiedene Lebensmittelkomponenten ausgeschlossen werden konnte. Als Zielkeim für die gesamte Validierung wurde der Stamm *Y. enterocolitica* DSM 11502, ein Vertreter des in Deutschland am weitesten verbreiteten pathogenen Bioserotyps 4/O:3 (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006b), eingesetzt. Die Auswahl der zur Überprüfung der Exklusivität verwendeten Nicht-Zielkeime orientierte sich an den Vorgaben der DIN EN ISO 16140:2003. Handelt es sich bei der durch das zu validierende Verfahren nachzuweisenden Zielgruppe um eine Spezies bzw. um einen Stamm, so sind bei der Auswahl der Nicht-Zielkeime andere Spezies der gleichen Gattung bzw. andere Stämme der gleichen Spezies zu berücksichtigen. Zudem müssen Mikroorganismen, die in den zu prüfenden Lebensmittelmatrizes als natürliche Begleitflora vorkommen können, in die Untersuchung einbezogen werden. Dementsprechend wurden insgesamt 28 Mikroorganismen, darunter die Spezies *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* und *Y. kristensenii* sowie ein *Y. enterocolitica* Biotyp 1A-Stamm in die Gruppe der Nicht-Zielkeime aufgenommen. Zur Anzucht und Verdünnung der Mikroorganismen wurde CASO-Bouillon verwendet, da bei dem eigens entwickelten Verfahren das PCR-Screening aus der Über-Nacht-Anreicherung in CASO-Bouillon durchgeführt wird. Auch die

Nukleinsäureextraktion erfolgte entsprechend dem Verfahren mittels InstaGene™ Matrix von BIO RAD.

Die hier verwendeten und aus der NMKL-Methode Nr. 163 A ausgewählten Primersequenzen wurden bereits in früheren Studien zur Detektion der Gene *ail* und *virF* eingesetzt (THISTED LAMBERTZ et al. 1996, 2000, 2007). THISTED LAMBERTZ et al. (1996) führten eine Überprüfung der Spezifität dieser Primer anhand von 34 Bakterienstämmen durch, darunter pathogene *Y. enterocolitica* O:3 (10 x), O:9 (3 x), O:8 (2 x), O:5,27 (1 x), apathogene *Y. enterocolitica* (7 x), *Y. pseudotuberculosis*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. ruckeri* (je 1 x) sowie 6 weitere Vertreter der Familie der *Enterobacteriaceae*. Bei diesen Untersuchungen konnte das *ail*-Gen bei allen 16 pathogenen *Y. enterocolitica*, jedoch bei keinem der übrigen Stämme detektiert werden. Das *virF*-Gen wurde lediglich bei 9 der 16 pathogenen *Y. enterocolitica* nachgewiesen, was möglicherweise auf einen Plasmidverlust zurückgeführt werden kann. Auch bei dem getesteten *Y. pseudotuberculosis*-Stamm verlief der Nachweis dieses Gens negativ. Die weiteren Stämme wurden nicht auf das Vorkommen des *virF*-Gens überprüft.

Im Rahmen dieser Dissertation, bei der auch taxonomisch weniger eng mit pathogenen *Y. enterocolitica* verwandte Mikroorganismen als Nicht-Zielkeime eingesetzt wurden (Tabelle 11), wurden alle ausgewählten Stämme auf durch die eingesetzten Primersequenzen detektierbare DNA-Abschnitte untersucht. Vergleichbar mit den Studien von THISTED-LAMBERTZ et al. (1996), war auch hier ein Nachweis der Gene *ail* und *virF* ausschließlich bei dem pathogenen *Y. enterocolitica*-Stamm möglich. Unter Verwendung der gleichen *ail*-spezifischen Primersequenz konnten THISTED-LAMBERTZ et al. (2000) ohne Zugabe von Lebensmitteln nach Probenvorbereitung mittels Buoyant density centrifugation pathogene *Y. enterocolitica* ab einem Keimgehalt von 2×10^2 KbE/ml nachweisen. Dieser Wert korreliert mit den in dieser Arbeit bei der Überprüfung der Inklusivität erhaltenen Ergebnissen, wonach der Nachweis beider Zielgene *ail* und *virF* ab einem Keimgehalt von ca. 10^2 KbE/ml möglich war.

10.2 Verfahrensvergleichsuntersuchung

Mithilfe der PCR wurden pathogene *Y. enterocolitica* in der Vergangenheit außer in rohem Fleisch auch in Rohwürsten (Salami) und in Salat detektiert (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001c; JOHANNESSEN et al., 2002; THISTED LAMBERTZ et al., 2007). Außerdem wurde pasteurisierte Milch mehrfach mit *Y. enterocolitica*-Infektionen des Menschen in Verbindung gebracht (ACKERS et al, 2000; TACKET et al., 1984). Dementsprechend wurden die Lebensmittel rohes Hackfleisch, Rohwurst, pasteurisierte Milch, Käse aus

pasteurisierter Milch und vorzerkleinerter Salat als Matrizes für die Validierung ausgewählt. Damit wurde auch die Voraussetzung, dass zur Validierung eines horizontalen Verfahrens mindestens vier Lebensmittelkategorien eingesetzt werden müssen, erfüllt (N.N., 2006). Als Referenzmethode für die Verfahrensvergleichsuntersuchung wurde das „Horizontale Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Y. enterocolitica*“ L 00.00-90 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB gewählt. Von den insgesamt 20 inokulierten Proben konnten mittels PCR-Screening in 19 Proben pathogene *Y. enterocolitica* detektiert werden. Durch den kulturellen Nachweis des eigenen Verfahrens wurde der Zielkeim aus 13 Proben, durch die Referenzmethode aus 12 Proben isoliert. Demnach wurden für das PCR-Screening eine Sensitivität von 95 % und eine Falsch-Negativ-Rate von 5 % ermittelt. Der kulturelle Nachweis des eigenen Verfahrens ergab eine Sensitivität von 65 % sowie eine Falsch-Negativ-Rate von 35 % und für die kulturelle Referenzmethode konnten mit einer Sensitivität von 60 % sowie einer Falsch-Negativ-Rate von 40 % vergleichbare Werte bestimmt werden. Diese Ergebnisse bestätigen die generell diskutierte geringere Sensitivität kultureller Nachweismethoden gegenüber der PCR (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003; JOHANNESSEN et al., 2000). Dafür werden Einflüsse verschiedener Lebensmittelinhaltsstoffe oder hohe Gehalte an Begleitkeimen, die sich negativ auf das Wachstum der Zielkeime auswirken, verantwortlich gemacht (MÄDE et al., 2004).

Während im Rahmen dieser Arbeit in allen kulturell positiven Ansätzen pathogene *Y. enterocolitica* auch mittels PCR-Screening detektiert wurden, konnten dagegen im Umkehrschluss die Erreger nicht aus allen PCR-positiven Proben isoliert werden. Als Ursache wurde vielfach das Vorkommen toter oder sublethal geschädigter Keime diskutiert, da innerhalb der PCR auch die DNA der nicht kultivierbaren Bakterienzellen amplifiziert wird (JOHANNESSEN et al., 2000; MÄDE et al., 2004; THISTED LAMBERTZ et al., 2000). Allerdings wurde bei dem hier beschriebenen Verfahren durch Einsatz einer Anreicherung vor dem PCR-Screening die Wahrscheinlichkeit erhöht ausschließlich lebensfähige Keime zu detektieren. Zudem wurde der zur Inokulation verwendete Stamm vor Beginn der Untersuchung frisch angezüchtet, weshalb eine Schädigung der Zellen ausgeschlossen werden konnte. Bei der Untersuchung natürlich kontaminierter Proben im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung muss jedoch berücksichtigt werden, dass mithilfe der PCR keine abschließende Aussage über die Lebensfähigkeit der detektierten Erreger getroffen werden kann. Zur Beurteilung einer möglichen Gesundheitsgefährdung der Verbraucher ist ihr Einsatz als alleiniges Nachweisverfahren demnach nicht geeignet. Aufgrund der bei diesen Untersuchungen festgestellten deutlich höheren Sensitivität

gegenüber kulturellen Verfahren, bietet die PCR allerdings eine adäquate Möglichkeit die zu untersuchenden Proben auf das Vorkommen pathogener *Y. enterocolitica* zu screenen.

Bei der vergleichenden Auswertung der kulturellen Nachweise konnten für das eigene Verfahren eine relative Sensitivität sowie eine relative Spezifität von je 100 % ermittelt werden. Entsprechend wurden eine relative Falsch-Positiv-Rate und eine relative Falsch-Negativ-Rate von je 0 % festgestellt. Somit kann das hier validierte Verfahren als alternatives Verfahren zum Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* eingesetzt werden.

10.3 Nachweisgrenze

Mittels PCR-Screening ergaben sich für die Lebensmittelmatrizes Hackfleisch, Rohwurst, Milch und Käse Nachweisgrenzen im Bereich von 10^1 KbE/10 g bzw. ml und für Salat im Bereich von 10^1 - 10^2 KbE/10 g. Unterschiede zwischen den Genen *ail* und *virF* konnten nicht festgestellt werden. In der NMKL-Methode Nr. 163 A wird für die Detektion pathogener *Y. enterocolitica* in rohem Fleisch und Fleischprodukten mit den gleichen *ail*-spezifischen Primern eine entsprechende Nachweisgrenze von 1-10 KbE/g Lebensmittel angegeben (NMKL, 1998). Weitere Untersuchungen mit diesem Verfahren ergaben Werte von 25 KbE/g für Hackfleisch (THISTED LAMBERTZ et al., 2007). Angaben zur Nachweisgrenze bei Einsatz der *virF*-spezifischen Primersequenzen nach NMKL-Methode Nr. 163 A liegen bislang nicht vor. HARTMANN (2007) konnte mittels konventioneller Multiplex-PCR das *ail*-Gen ab einer Keimzahl von 10^1 KbE/10 g Hackfleisch detektieren. Dagegen gelang der sichere Nachweis des *virF*-Gens erst bei höheren Impfmengen. Dies wurde auf die Konkurrenz der beiden Reaktionen innerhalb der Multiplex-PCR und die bevorzugte Amplifikation des im Vergleich zum *virF* deutlich kürzeren *ail*-Fragments zurückgeführt. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen wurden die Gene *ail* und *virF* in getrennten Reaktionsansätzen detektiert, wodurch die Probleme der Multiplex-PCR vermieden werden konnten. Zudem wurden die von HARTMANN (2007) eingesetzten Primerpaare nach der Methode von NAKAJIMA et al. (1992) ausgewählt und entsprechen somit nicht den hier verwendeten Sequenzen.

Beim kulturellen Nachweis wurde jeweils für Rohwurst und Käse eine Nachweisgrenze im Bereich von 10^1 KbE/10 g ermittelt. Diese niedrigen Nachweisgrenzen sind darauf zurückzuführen, dass es sich bei diesen Lebensmitteln um Produkte handelt, deren spezifisches Keimspektrum (gram-positive Reifungsflora) durch die eingesetzten Medien weitestgehend unterdrückt wurde. Auch bei der pasteurisierten Milch wurde aufgrund der fehlenden Begleitkeime eine Nachweisgrenze von 10^1 KbE/10 ml erreicht. Störende Effekte, verursacht durch das Wachstum kompetitiver Mikroorganismen auf CIN-Agar, konnten bei

diesen Lebensmitteln nicht beobachtet werden. Dagegen ergaben die Untersuchungen für die Matrices Hackfleisch und Salat höhere Nachweisgrenzen. So wurde für Hackfleisch der Bereich von 10^1 - 10^2 KbE/10 g und für Salat der Bereich von 10^2 KbE/10 g festgelegt. Zur Mikroflora dieser Produkte zählen häufig gram-negative Keime, die durch die verwendeten Medien nicht ausreichend gehemmt werden. Die Auswahl und Isolierung verdächtiger Kolonien auf CIN-Agar wurde bei diesen Proben durch das Wachstum der Begleitkeime erschwert. Dennoch sind die hier ermittelten Nachweisgrenzen des kulturellen Nachweises überraschend niedrig. Während in allen Ansätzen des Hackfleischs pathogene *Y. enterocolitica* ab einer Impfmenge von 10^2 KbE/10 g kulturell nachgewiesen wurden, war bei HARTMANN (2007) die Isolierung der Erreger aus Hackfleisch erst ab einem Keimgehalt von ca. 10^3 KbE/10 g und lediglich aus drei von vier Proben möglich. Erst ab einem Gehalt von ca. 10^4 KbE/10 g waren alle Ansätze positiv. Wie bei dem hier beschriebenen Verfahren wurden auch bei HARTMANN (2007) ein Direktausstrich, eine Über-Nacht-Anreicherung in CASO-Bouillon mit anschließender Laugenbehandlung sowie eine Anreicherung in ITC-Bouillon durchgeführt. Die Isolierung erfolgte auf CIN-Agar. Die abweichenden Ergebnisse sind daher möglicherweise auf unterschiedlich hohe Keimzahlen des zur Untersuchung eingesetzten Hackfleischs zurückzuführen. In rohem Hackfleisch, rohem Fleisch und Fleischprodukten konnten THISTED-LAMBERTZ et al. (2000) bei einer Impfmenge von 10 KbE/g nach Über-Nacht-Anreicherung in CASO-Bouillon kultivierbare pathogene *Y. enterocolitica* auf CIN-Agar nachweisen. In den Proben wurden Gesamtkeimzahlen zwischen $0,9 \times 10^4$ KbE/g und $5,4 \times 10^7$ KbE/g ermittelt. Die Gesamtkeimzahl des hier zur Bestimmung der Nachweisgrenze eingesetzten Hackfleischs lag mit $5,5 \times 10^5$ KbE/g in diesem Bereich.

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben in Abhängigkeit der Methode (PCR oder kulturell) und der untersuchten Lebensmittelmatrices unterschiedliche Nachweisgrenzen. Insbesondere bei Hackfleisch und Salat wurden aufgrund des Wachstums störender Begleitkeime für den kulturellen Nachweis höhere Werte erzielt als für das PCR-Screening. Diese Tendenz konnte auch durch andere Autoren bestätigt werden (BOYAPALLE et al., 2001; HARTMANN, 2007). Allerdings beziehen sich die bei diesen Studien ermittelten Nachweisgrenzen auf rohes Hackfleisch bzw. rohes Fleisch und können somit nicht auf alle hier untersuchten Lebensmittel übertragen werden.

11 Nachweis von pathogenen *Yersinia enterocolitica* in Lebensmittelproben

11.1 PCR-Screening

Es wurden 44 Proben rohes Fleisch (40 x Schwein, 4 x Rind), 32 Proben rohes Hackfleisch (31 x Schwein, 1 x gemischt Schwein/Rind), 13 Proben stabilisierte, nicht hitzebehandelte Fleischerzeugnisse verschiedener Tierarten und 11 Proben Innereien vom Schwein untersucht. Mit dem PCR-Screening konnten die beiden Gene *ail* und *virF* in 12,5 % der Hackfleischproben, jedoch in keiner der Proben rohes Fleisch detektiert werden. Bezogen auf die Gesamtzahl der rohen Schweinefleischproben (40 x rohes Schweinefleisch, 32 x Hackfleisch) ergibt sich somit eine Prävalenz von 5,5 %. Bei weiteren Untersuchungen von rohem Schweinefleisch in Deutschland wurde das *ail*-Gen mittels konventioneller PCR in 12 % der Proben nachgewiesen (HARTMANN, 2007). Auch in Norwegen und Schweden wurden in rohem Schweinefleisch mit 17 % und 10 % höhere Nachweisraten als bei den hier durchgeführten Untersuchungen festgestellt (JOHANNESSEN et al., 2000; THISTED LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM, 2005). In rohem Hackfleisch vom Schwein konnten durch die konventionelle PCR in der Vergangenheit Werte zwischen 10 % (BOYAPALLE et al., 2001) und 35 % (THISTED LAMBERTZ et al., 2007) erzielt werden. Allerdings wurde die hohe Nachweisrate von 35 % durch Einsatz einer nested PCR erreicht, welche im Vergleich zur einfachen PCR eine höhere Sensitivität aufweist (THISTED LAMBERTZ et al., 2007). FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999) konnten mittels nested PCR in 25 % der untersuchten Hackfleischproben pathogene *Y. enterocolitica* detektieren. Die hier festgestellte Nachweisrate in Hackfleisch von 12,5 % ist mit dem von BOYAPALLE et al. (2001) ebenfalls durch einfache PCR ermittelten Wert vergleichbar.

In keinem der 13 stabilisierten, nicht hitzebehandelten Fleischerzeugnisse wurde das *ail*-Gen nachgewiesen. Dies korreliert mit Ergebnissen von THISTED LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM (2005), die pathogene *Y. enterocolitica* in verzehrfertigen Schweinefleischprodukten nicht detektieren konnten. Dagegen wiesen THISTED LAMBERTZ et al. (2007) mittels nested PCR das *ail*-Gen in 11 % der untersuchten Salamipproben nach. Auch in Bayern ermittelte HARTMANN (2007) unter Verwendung einer konventionellen PCR in verzehrfertigen Wurstwaren vom Schwein eine hohe Nachweisrate von 16 %. Im Gegensatz zu diesen Studien wurden bei den hier durchgeführten Untersuchungen außer Schweinefleischerzeugnissen auch Produkte anderer Tierarten überprüft. In Rohwürsten aus Schweine-, Rind- bzw. Geflügelfleisch konnten in einer

weiteren Arbeit aus Bayern analog zu den eigenen Ergebnissen keine pathogenen *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden (GRÖTZBACH, 2007).

Innerhalb der Warengruppe Innereien vom Schwein wurden die Gene *ail* und *virF* in einer von vier Zungen detektiert, was einer Nachweisrate von 25 % entspricht. Weder in den vier untersuchten Nieren, noch in den drei Lebern wurden mittels PCR-Screening positive Ergebnisse erzielt. Weitere Studien zum PCR-Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* in Innereien vom Schwein auf Handelsebene in Deutschland liegen bislang nicht vor. Untersuchungen in Finnland ergaben Prävalenzen pathogener *Y. enterocolitica* von 92 % und 83 % in Schweinezungen sowie von 63 % in Schweinenieren auf Handelsebene (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 1999, 2001c). Damit liegen die hier ermittelten Ergebnisse deutlich unter diesen Werten. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass innerhalb dieser Arbeit lediglich eine sehr begrenzte Anzahl dieser Produkte untersucht wurde.

Der zur Nukleinsäureextraktion verwendete Kit InstaGene Matrix™ von BIO RAD zeichnete sich aufgrund der einfachen Handhabung in Verbindung mit einem geringen Zeitaufwand für den Einsatz im Routinelabor aus. Allerdings wurden bei der Untersuchung der Schweinelebern Inhibitionen der PCR festgestellt. Dies unterstreicht die Vermutung von HARTMANN (2007), dass Inhibitoren durch diesen Extraktionskit nur mäßig entfernt werden. Durch Aufreinigung der Proben mittels DNeasy® Blood & Tissue Kit von QIAGEN wurden die Inhibitionseffekte ausgeschaltet. Allerdings erforderte dieser einen erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand. Als alternative Methode zur Probenvorbereitung im Falle einer Inhibition erwies sich der Kit dennoch als geeignet. Darüber hinaus unterstreichen diese Beobachtungen die Wichtigkeit des Einsatzes einer Inhibitionskontrolle bei jeder Reaktion, um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden.

11.2 Kultureller Nachweis

Mit dem kulturellen Nachweis konnten pathogene *Y. enterocolitica* in einer Schweinezunge nachgewiesen werden. Bezogen auf die Gesamtprobenzahl entspricht dies einem Anteil von 1 %. Diese niedrige Nachweisrate ist mit den Ergebnissen weiterer deutscher Studien vergleichbar: Weder bei HARTMANN (2007) noch bei GRÖTZBACH (2007) war die Isolierung pathogener *Y. enterocolitica* aus rohem Fleisch, Hackfleisch und verzehrfertigen Fleischerzeugnissen möglich. Dagegen ermittelte HANK (2003) hohe Prävalenzen der Erreger in rohem Hackfleisch (9 %) und Muskelfleisch (7,4 %). Auch im internationalen Vergleich schwanken die kulturellen Nachweisraten pathogener *Y. enterocolitica*. THISTED LAMBERTZ et al. (2007) konnten mit dem Verfahren nach ISO 10273:2003 die Erreger weder in rohem Hackfleisch vom Schwein noch in verzehrfertigen Wurstproben

nachweisen. Weitere Untersuchungen in Skandinavien zeigten positive Ergebnisse in 2 % der Hackfleischproben (FREDRIKSSON AHOMAA et al., 1999; JOHANNESSEN et al., 2000). Während bei Studien in den USA von BOYAPALLE et al. (2001) keine pathogenen *Y. enterocolitica* aus Hackfleisch isoliert werden konnten, verlief der kulturelle Nachweis bei VISHNUBHATLA et al. (2001) in 32 % der untersuchten Proben positiv. In Zungen vom Schwein konnten mittels kulturellen Verfahren deutlich höhere Prävalenzen pathogener *Y. enterocolitica* ermittelt werden. So stellten FREDRIKSSON AHOMAA et al. (1999, 2001c) die Erreger in 78 % bzw. 80 % und WAUTERS et al. (1988) in 96,5 % der untersuchten Proben fest.

Während innerhalb dieser Arbeit pathogene *Y. enterocolitica* lediglich aus einer Probe isoliert werden konnten, wurden apathogene *Yersinia* spp. in 15 Proben (15 %) nachgewiesen. Dies korreliert mit früheren Studien, in denen ebenfalls häufiger apathogene Stämme festgestellt wurden. In Hackfleisch isolierten WAUTERS et al. (1988) pathogene *Y. enterocolitica* aus 24 %, apathogene *Yersinia* spp. dagegen aus 80 % der Proben und DE BOER (1995) berichtete von Nachweisraten von 1 % für pathogene *Y. enterocolitica* sowie von 11,5 % für apathogene *Yersinia* spp. Zudem konnten apathogene *Yersinia* spp. außer in Schweinefleisch auch in weiteren rohen Lebensmitteln, wie Rinderhackfleisch, Geflügelfleisch, Fisch, Gemüse und Salat nachgewiesen werden (DE BOER, 1995; FREDRIKSSON AHOMAA et al., 2001c). Zahlreiche dieser Stämme wurden dem Biotyp 1A von *Y. enterocolitica* zugeordnet. Die weite Verbreitung apathogener *Yersinia* spp. in Lebensmitteln unterstreicht die Notwendigkeit des Einsatzes von Methoden, die eine eindeutige Abgrenzung pathogener *Y. enterocolitica* ermöglichen.

Die Isolierung pathogener *Y. enterocolitica* aus der Schweinezunge erfolgte nach selektiver Anreicherung in ITC-Bouillon. Durch das starke Wachstum der Begleitflora konnten verdächtige Kolonien weder beim Direktausstrich noch nach nicht-selektiver Anreicherung in CASO-Bouillon mit anschließender KOH-Behandlung festgestellt werden. Vergleichbare Beobachtungen wurden bei der Bestimmung der Nachweisgrenze der kulturellen Methode in Salat gemacht. Dort gelang der Nachweis der Zielkeime – auch bei der höchsten Impfmenge – ebenfalls ausschließlich nach selektiver Anreicherung. Während sich demnach die ITC-Bouillon zur Isolierung pathogener *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 aus stark mit Begleitkeimen belasteten Proben eignete, konnte durch Einsatz der KOH-Behandlung keine ausreichende Verminderung der kompetitiven Mikroflora erreicht werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bei vergleichenden Untersuchungen verschiedener Anreicherungsverfahren erzielt, bei denen nach KOH-Behandlung ebenfalls keine pathogenen *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden konnten (HANK, 2003). Apathogene

Y. enterocolitica Biotyp 1A wurden sowohl durch den Direktausstrich als auch durch die beiden Anreicherungsverfahren isoliert. Allerdings konnten mit keiner Methode alle Isolate nachgewiesen werden. In 5 der 7 kontaminierten Proben erfolgte der Nachweis über den Direktausstrich, was für einen hohen Ausgangskeimgehalt spricht.

11.3 Vergleich des PCR-Screenings und des kulturellen Nachweises

Beide Gene *ail* und *virF* wurden in fünf der 100 untersuchten Proben (5 %) detektiert, wohingegen pathogene *Y. enterocolitica* lediglich aus einer Probe (1 %) isoliert werden konnten. Auch in früheren Studien wurden trotz des Einsatzes unterschiedlicher Methoden und unabhängig von der Art der untersuchten Lebensmittel durch die PCR höhere Prävalenzen pathogener *Y. enterocolitica* festgestellt als durch kulturelle Verfahren. FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999) detektierten das *yadA*-Gen in 25 % der untersuchten Hackfleischproben, die Isolierung der Erreger gelang dagegen lediglich aus 2 %. Ebenfalls in Hackfleisch verlief der Nachweis des *ail*-Gens in 10 %, der kulturelle Nachweis jedoch bei keiner der Proben positiv (BOYAPALLE et al., 2001). JOHANNESSEN et al. (2000) ermittelten in rohem Schweinefleisch für die PCR eine Nachweisrate von 17 % und für das kulturelle Verfahren eine Nachweisrate von 2 %. In Salat konnten sowohl FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001c) als auch JOHANNESSEN et al. (2002) pathogene *Y. enterocolitica* mittels PCR nachweisen, die Isolierung der Erreger gelang jedoch bei keiner der Proben. Die höheren Nachweisraten pathogener *Y. enterocolitica* mittels PCR verglichen mit kulturellen Methoden, korrelieren mit der in dieser Arbeit im Rahmen der In house-Validierung ermittelten höheren Sensitivität des PCR-Screenings.

Aus 22,9 % der Proben aus Fertigpackungen sowie aus 12,3 % der offenen Ware wurden *Yersinia* spp. isoliert. LOGUE et al. (1996) wiesen *Yersinia* spp. dagegen hauptsächlich in offenen Proben aus Delikatessen-Läden nach, während vergleichbare Proben aus Fertigpackungen seltener belastet waren. Auch bei DUFFY et al. (2001) waren im Verarbeitungsbetrieb fertig verpackte Proben seltener mit *Y. enterocolitica* kontaminiert. In beiden Fällen wurden die Ergebnisse auf eine erhöhte Kontaminationsgefahr während des Handlings der Produkte zurückgeführt. Bei den eigenen Untersuchungen wurden pathogene *Y. enterocolitica* aus einer Schweinezunge isoliert, wobei es sich dabei um offene Ware handelte. Mittels PCR-Screening konnten in zwei offenen sowie in zwei fertig verpackten Hackfleischproben die Gene *ail* und *virF* detektiert werden. Obwohl in diesen vier Proben pathogene *Y. enterocolitica* kulturell nicht nachgewiesen werden konnten, wurden aus drei der Proben *Yersinia* spp. isoliert. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Ausgangskeimgehalt an pathogenen *Y. enterocolitica* in diesen Proben gering war und darüber hinaus ihre Isolierung durch das gleichzeitige Wachstum der apathogenen *Yersinia*

spp. behindert wurde. Aufgrund der Psychrotrophie der Erreger ist jedoch bei einer längeren Lagerung, welche insbesondere bei Produkten aus Fertigpackungen nicht auszuschließen ist, eine Keimvermehrung zu erwarten, die zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko der Verbraucher führen kann. Von besonderer Bedeutung ist dabei der Nachweis der Erreger in Schweinehackfleisch, da dieses Produkt in Deutschland vielfach roh, als Schweinemett oder Hackepeter, verzehrt wird, wodurch eine direkte Infektionsgefahr besteht. Dagegen werden die Keime in bestimmungsgemäß durcherhitzt zu verzehrenden Produkten, wie beispielsweise der rohen Schweinezunge, während des Garvorgangs abgetötet. Allerdings besteht bei der Zubereitung die Gefahr der Kreuzkontamination verzehrsfertiger Lebensmittel, weshalb das Einhalten bestimmter lebensmittelhygienischer Regeln, wie Vermeidung des direkten Kontaktes der Lebensmittel, Wechsel der Arbeitsutensilien (Messer, Schneidbrett) sowie regelmäßiges Händewaschen, im Umgang mit diesen Produkten erforderlich ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Pathogene *Y. enterocolitica* gelten als wichtige Erreger gastrointestinaler Erkrankungen des Menschen. Dabei wird der alimentären Übertragung durch kontaminierte Lebensmittel die größte Bedeutung beigemessen. Dennoch ist die Nachweisrate pathogener *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln insbesondere bei Einsatz kultureller Verfahren gering. Diese erfordern zudem eine Vielzahl an zeitaufwändigen Tests zur Differenzierung und Bestätigung verdächtiger Isolate. Die PCR ermöglicht dagegen den Nachweis der Erreger mit höherer Sensitivität in kürzerer Zeit. Um in der amtlichen Lebensmitteluntersuchung über ein routinetaugliches Verfahren zum Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* zu verfügen, wurde ein kombiniertes Verfahren aus kulturellen Methoden und der PCR entwickelt.

Die Charakterisierung des Verfahrens erfolgte anhand einer In house-Validierung im Anwenderlabor. Dazu wurde zunächst die Inklusivität und Exklusivität des PCR-Screenings mit reinen Bakterienkulturen überprüft. Beide Gene *ail* und *virF* wurden bei dem eingesetzten Zielkeim (*Y. enterocolitica* DSM 11502) ab einem Keimgehalt im Bereich von ca. 10^2 KbE/ml, jedoch bei keinem der 28 Nicht-Zielkeime detektiert.

Zur Durchführung der Verfahrensvergleichsuntersuchung wurden fünf verschiedene Lebensmittelmatrizes (rohes Schweinehackfleisch, Rohwurst, pasteurisierte Milch, Käse aus pasteurisierter Milch, vorzerkleinerter Salat) mit dem Zielkeim inokuliert. Für das eigene Verfahren wurden Sensitivitäten von 95 % (PCR-Screening) bzw. 65 % (kulturell) ermittelt. Die Sensitivität des als Referenzverfahren ausgewählten, auf kulturellen Methoden basierenden „Horizontalen Verfahrens zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Y. enterocolitica*“ L 00.00-90 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 10273:2003) betrug 60 %. Der direkte Vergleich der kulturellen Nachweise ergab sowohl für die relative Sensitivität wie auch für die relative Spezifität des eigenen Verfahrens einen Wert von 100 %.

Die Nachweisgrenzen des PCR-Screenings und des kulturellen Nachweises des eigenen Verfahrens wurden für jede der fünf Lebensmittelmatrizes berechnet. Mittels PCR-Screening (*ail* und *virF*) konnten für Hackfleisch, Rohwurst, Milch und Käse Nachweisgrenzen im Bereich von 10^1 KbE/10 g bzw. ml und für Salat im Bereich von 10^1 - 10^2 KbE/10 g bestimmt werden. Auch kulturell wurden für Rohwurst, Milch und Käse Nachweisgrenzen im Bereich von 10^1 KbE/10 g erzielt. Dagegen wurde die Isolierung des Zielkeims aus Hackfleisch und Salat durch das Wachstum kompetitiver Mikroflora erschwert, weshalb für diese Lebensmittel

kulturell Nachweisgrenzen im Bereich von 10^1 - 10^2 KbE/10 g (Hackfleisch) und 10^2 KbE/10 g (Salat) festgelegt wurden.

Weiterhin wurden 100 Lebensmittelproben auf das Vorkommen pathogener *Y. enterocolitica* untersucht. Mithilfe des PCR-Screenings konnte eine Kontaminationsrate von 5 % festgestellt werden. Beide Gene *ail* und *virF* wurden in vier Proben Hackfleisch vom Schwein sowie in einer Schweinezunge detektiert, wohingegen kulturell pathogene *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 lediglich aus der Schweinezunge isoliert werden konnten.

Aufgrund der innerhalb dieser Arbeit bestätigten hohen Empfindlichkeit der PCR, bietet diese eine geeignete Möglichkeit Lebensmittelproben auf das Vorkommen pathogener *Y. enterocolitica* zu screenen. Die Feststellung einer Kontamination ist bereits am 2. Tag der Untersuchung möglich. Im direkten Vergleich lieferten der kulturelle Nachweis des eigenen Verfahrens sowie das amtliche Verfahren L 00.00-90 nach § 64 LFGB vergleichbare Ergebnisse. Darüberhinaus wurde eine Verkürzung der Untersuchungsdauer um 2 Tage gegenüber dem amtlichen Verfahren erreicht.

SUMMARY

Evaluation and validation of a combined culture and PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods

Pathogenic *Y. enterocolitica* is a significant pathogen causing gastrointestinal infections in humans. Transmission through contaminated food is of great importance. However, the detection rate of pathogenic *Y. enterocolitica* in food has been low, especially using culture methods. Moreover, these methods require various time-consuming tests for differentiation and confirmation of presumptive pathogenic isolates. In contrast, the PCR enables the detection of pathogenic *Y. enterocolitica* more sensitively and rapidly. For detection of pathogenic *Y. enterocolitica* a combined culture and PCR method was developed for routine use in official food control.

The method was characterised by in house-validation. For this purpose the inclusivity and exclusivity of the PCR-screening was tested using pure microbiological cultures. Both *ail* and *virF* genes were detected from 10^2 cfu/ml of the target strain (*Y. enterocolitica* DSM 11502), whereas none of the 28 non-target microorganisms gave a positive result.

To compare the developed method with the reference method five different food matrices (raw minced pork, raw sausage, pasteurized milk, cheese from pasteurized milk, mixed salad) were inoculated with the target strain. The developed method revealed a sensitivity of 95 % for PCR-screening and 65 % for culturing. The sensitivity of the reference method, „Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*” according to ISO 10273:2003, was 60 %. A relative sensitivity and a relative specificity of 100 % was obtained for the developed culture method.

The detection limits of the PCR-screening and the culture method were calculated for the five food matrices. Using PCR-screening (*ail* und *virF*), detection limits of 10^1 cfu/10 g in raw minced pork, raw sausage, pasteurized milk and pasteurized cheese and 10^1 - 10^2 cfu/10 g in mixed salad were obtained. For raw sausage, pasteurized milk and pasteurized cheese the detection limits of 10^1 cfu/10 g were achieved by culturing. In contrast, the isolation of the target strain from raw minced pork and mixed salad was complicated due to the growth of competitive background flora. Therefore, detection limits of 10^1 - 10^2 cfu/10 g in raw minced pork and 10^2 KbE/10 g in mixed salad were defined by culturing.

Furthermore, 100 food samples were analyzed for the occurrence of pathogenic *Y. enterocolitica*. Using PCR-screening, a contamination rate of 5 % was obtained. Both *ail* und *virF* genes were detected in four raw minced pork samples and in a pig tongue, whereas pathogenic *Y. enterocolitica* bioserotype 4/O:3 was isolated only from the pig tongue.

Because of the high sensitivity of the PCR revealed in this study, it is considered a suitable screening method for detecting pathogenic *Y. enterocolitica* in food. Positive samples can be detected already on the second day of analysis. Compared to the reference method the developed culture method gives similar results. Moreover, a 2-day reduction of analysis was achieved.

13 Mikroorganismenstämme

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH:

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

OXOID GmbH:

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

Ludwig-Maximilians-Universität München, Institut für Hygiene und Technologie der

Lebensmittel tierischen Ursprungs:

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

Andere Herkunft:

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

14 Nährmedien

14.1 Flüssige Medien

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (CASO-Bouillon) oder Tryptische Soja Bouillon (TSB)

Zusammensetzung:

CASO-Bouillon, MERCK 5459 30g

Herstellung:

- 1.) 30 g CASO-Bouillon suspendieren in 1000 ml destilliertem Wasser
- 2.) Abfüllen in Schott-Flaschen á 92 ml
- 3.) Autoklavieren: 15 min/121 °C
- 4.) pH-Wert kontrollieren: $7,3 \pm 0,2$ (bei ca. 25 °C)
- 5.) haltbar 8 Wochen

IrgasanTM-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Bouillon (ITC)

Zusammensetzung:

Basisnährmedium:

Trypton, OXOID LP0042	10 g
Hefe Extrakt, OXOID L21	1 g
MgCl ₂ x6H ₂ O, MERCK 105833	60 g
NaCl, MERCK 106404	5 g
KClO ₃ , MERCK 104944	1 g
Malachitgrün (0,2 %ige wässrige Lsg.), MERCK 101398	5 ml

Supplemente:

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

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

Herstellung:

- 1.) Substanzen abwiegen und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen, mischen und gegebenenfalls unter Erwärmen im Wasserbad lösen
- 2.) pH-Wert einstellen: $7,3 \pm 0,2$
- 3.) abfüllen à 9 ml in Reagenzglasröhrchen
- 4.) autoklavieren: 15 min/121 °C
- 5.) pH-Wert kontrollieren: $7,3 \pm 0,2$ (bei ca. 25 °C)
- 6.) haltbar 4 Wochen
- 7.) vor Gebrauch: Sterile Zugabe von jeweils 10 µl der Supplement-Lösungen zu jedem Reagenzglas

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

Ticarcillin Disodium, DUCHEFA T 0180

Herstellung:

- 1.) 10 mg Ticarcillin Disodium in 10 ml sterilem destilliertem Wasser lösen und sterilfiltrieren
- 2.) haltbar 4 Wochen

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

Irgasan DP 300, CIBA

Ethanol absolut (vergällt), MERCK 100974

Herstellung:

- 1.) 10 mg Irgasan DP 300 in 10 ml Ethanol in einem sterilen Röhrchen lösen
- 2.) haltbar 4 Wochen

Medium für die Kohlenhydratfermentation (KOFER)**Zusammensetzung:****Basisnährmedium:**

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

Supplemente:

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

Hilfsmittel:

Rote, blaue, silberne Metallkappen

Herstellung:

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

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

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

Herstellung:

- 1.) 10 g Xylose in 100 ml sterilem destilliertem Wasser lösen und steril filtrieren
- 2.) haltbar 4 Wochen

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

D(+)-Trehalose, SIGMA T-5251

Herstellung:

- 1.) 10 g Trehalose in 100 ml sterilem destilliertem Wasser lösen und steril filtrieren
- 2.) haltbar 4 Wochen

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

Salicin, SIGMA S-0625-25G

Herstellung:

- 1.) 10 g Salicin in 200 ml sterilem destilliertem Wasser lösen und steril filtrieren
- 2.) haltbar 4 Wochen

MRS-Bouillon (Bouillon nach de Man, Rogosa und Sharpe)**Zusammensetzung:**

M.R.S. Broth, OXOID CM 0359 52 g

Herstellung:

- 1.) 52 g M.R.S. Broth suspendieren in 1000 ml destilliertem Wasser
- 2.) Abfüllen in Reagenzglasröhrchen á 10 ml
- 3.) Autoklavieren: 15 min/121 °C
- 4.) pH-Wert kontrollieren: $6,2 \pm 0,2$ (bei ca. 25 °C)
- 5.) haltbar 4 Wochen

Pepton-Sorbit-Gallensalz-Bouillon (PSB)**Zusammensetzung:**

Casein, enzymatisch verdaut (Bacto Tryptone), BD 211705	5 g
Sorbit, FLUKA 85530	10 g
Natriumchlorid, MERCK 1.06404.1000	5 g
Dinatriumhydrogenphosphatdodecahydrat, MERCK 1.06579.0500	8,23 g

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, FLUKA 71506	1,2 g
Gallensalze, OXOID LP 0056	1,5 g

Herstellung:

- 1.) Die Bestandteile in 1000 ml destilliertem Wasser suspendieren
- 2.) Abfüllen in Schott-Flaschen á 92 ml
- 3.) Autoklavieren: 15 min/121 °C
- 4.) pH-Wert kontrollieren: $7,6 \pm 0,2$ (bei ca. 25 °C)
- 5.) haltbar 4 Wochen

14.2 Feste Medien

Äsculin-Agar (ÄSC)

Zusammensetzung:

Nutrient Agar Bacto[®], DIFCO 2130000

Äsculin, MERCK 1.00842.0025

Herstellung:

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

Casein-Soja-Agar

CASO-Agar, HEIPHA Dr. Müller GmbH, D-69214 Eppelheim, Art. Nr. 307e

Casein-Soja-Agar mit Magnesium und Oxalat (CSMOX)

Zusammensetzung:Basisnährboden:

CASO-Agar, MERCK 1.05458.0500

Supplemente:

Magnesiumchloridlösung (siehe Rezept Magnesiumchloridlösung)

Natriumoxalatlösung (siehe Rezept Natriumoxalatlösung)

Glucoselösung (siehe Rezept Glucoselösung)

Herstellung:

- 1.) 40 g CASO-Agar in 1000 ml destilliertem Wasser mischen und gegebenenfalls unter Erwärmen im Wasserbad lösen

- 2.) autoklavieren: 15 min/121 °C
- 3.) sterile Zugabe von je 80 ml Magnesiumchloridlösung und Natriumoxalatlösung, sowie 10 ml Glucoselösung zu 830 ml des auf ca. 45 °C abgekühlten Basisnährbodens
- 4.) steril Platten gießen (15 ml)
- 5.) haltbar 2 Wochen

Supplement 1 für Casein-Soja-Agar mit Magnesium und Oxalat:

Magnesiumchloridlösung

Zusammensetzung:

Magnesiumchlorid-Hexahydrat, MERCK 1.05833.0250

Herstellung:

- 1.) 5,09 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat in 100 ml sterilem destillierten Wasser lösen und steril filtrieren
- 2.) haltbar 2 Wochen

Supplement 2 für Casein-Soja-Agar mit Magnesium und Oxalat: Natriumoxalatlösung

Zusammensetzung:

Natriumoxalat, FLUKA 71799

Herstellung:

- 1.) 3,35 g Natriumoxalat in 100 ml sterilem destillierten Wasser lösen und steril filtrieren
- 2.) haltbar 2 Wochen

Supplement 3 für Casein-Soja-Agar mit Magnesium und Oxalat: Glucoselösung

Zusammensetzung:

D(+)-Glucose, MERCK 1.08337.0250

Herstellung:

- 1.) 18 g Glucose in 100 ml sterilem destillierten Wasser lösen und steril filtrieren
- 2.) haltbar 2 Wochen

CIN-Agar

Yersinia Agar (CIN), HEIPHA Dr. Müller GmbH, D-69214 Eppelheim, Art. Nr. 395e

Columbia-Blutagar

Columbia-Blutagar, HEIPHA Dr. Müller GmbH, D-69214 Eppelheim, Art. Nr. 109e

Harnstoffagar nach Christensen

Harnstoffagar nach Christensen (6 ml), HEIPHA Dr. Müller GmbH, D-69214 Eppelheim, Art. Nr. 398r

MRS-Agar (Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe)

MRS-Agar, HEIPHA Dr. Müller GmbH, D-69214 Eppelheim, Art. Nr. 184e

Mueller-Hinton-Agar (MH)**Zusammensetzung:**

Mueller-Hinton-Agar, MERCK 5437 34 g

Herstellung:

- 1.) 34 g Mueller-Hinton-Agar in 1000 ml destilliertem Wasser unter Erhitzen auflösen
- 2.) autoklavieren: 15 min/121 °C
- 3.) steril Platten gießen (15 ml)
- 4.) pH-Wert kontrollieren: Soll $7,3 \pm 0,2$ (bei ca. 25 °C)
- 5.) haltbar 2 Wochen

Nähr-Agar (NA)**Zusammensetzung:**

Nutrient-Agar, DIFCO 213000 23 g

Herstellung:

- 1.) 23 g Nutrient-Agar in 1000 ml destilliertem Wasser unter Erhitzen auflösen
- 2.) autoklavieren: 15 min/121 °C
- 3.) steril Platten gießen (15 ml)
- 4.) pH-Wert kontrollieren: Soll $6,8 \pm 0,2$ (bei ca. 25 °C)
- 5.) haltbar 2 Wochen

Plate-Count-Agar (PC)

Plate-Count-Agar, HEIPHA Dr. Müller GmbH, D-69214 Eppelheim, Art. Nr. 306e

Pyrazinamidase-Agar (PYR)**Zusammensetzung:**

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

Herstellung:

- 1.) Mischen der Komponenten mit 800 ml destilliertem Wasser

- 2.) Auffüllen mit destilliertem Wasser auf 1000 ml
- 3.) Abfüllen zu je 5 ml in Reagenzglasröhrchen
- 4.) autoklavieren: 15 min /121 °C
- 5.) pH-Wert kontrollieren: Soll: $6,0 \pm 0,2$ (bei ca. 25 °C)
- 6.) Abkühlen in schräger Position
- 7.) haltbar 4 Wochen

Indikator für Pyrazinamidase-Agar: Ammoniumferrosulfat-Lösung (AFS)

Zusammensetzung:

Ammonium-Eisen-II-Sulfat Hexahydrat, MERCK 103792

Herstellung:

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

Salmonella-Shigella-Agar mit Natriumdesoxycholat und Calciumchlorid (SSDC)

Zusammensetzung:

SSDC-Agar, MERCK 1.16724.0500

Herstellung:

- 1.) 76 g SSDC-Agar in 1000 ml destilliertem Wasser unter Erhitzen auflösen
- 2.) Unter Rühren Abkühlen auf ca. 50 °C
- 3.) steril Platten gießen (20 ml)
- 4.) pH-Wert überprüfen: Soll $7,4 \pm 0,2$ (bei ca. 25 °C)
- 5.) **Nicht autoklavieren, nicht Überhitzen**
- 6.) haltbar 1 Woche bei $8 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ in Kunststoffbeutel im Dunkeln

Tween-Esterase-Agar (TWE)

Zusammensetzung:

Nutrient Agar Bacto, DIFCO 2130000

Tween 80 zur Synthese, MERCK 822187

Herstellung:

- 1.) 14 g Nutrient Agar Bacto mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen und unter Erhitzen auflösen
- 2.) Zugabe von 5 ml Tween 80 und erneut für 5 min erhitzen
- 3.) autoklavieren: 15 min/121 °C

- 4.) steril Platten gießen (15 ml)
- 5.) pH-Wert überprüfen: Soll $6,8 \pm 0,2$ (bei ca. 25 °C)
- 6.) haltbar 4 Wochen

15 Reagenzien und Chemikalien

Kaliumhydroxid-Lösung (KOH)

Zusammensetzung:

Potassiumhydroxid (KOH), MERCK 105033.0500

Natriumchlorid (NaCl), MERCK 106404

Herstellung:

- 1.) 2,5 g Potassiumhydroxid und 8,5 g NaCl in 989 ml destilliertem Wasser lösen
- 2.) abfüllen zu je 4,5 ml in Reagenzglasröhrchen
- 3.) autoklavieren: 15 min/121 °C

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

Zusammensetzung:

Casein-Pepton, trypt. verdaut, MERCK 1.07213.1000 8,5 g

Natriumchlorid, MERCK 1.06404.1000 1 g

Herstellung:

- 1.) Die Bestandteile in 1000 ml destilliertem Wasser suspendieren
- 2.) pH-Wert einstellen: $6,5 \pm 0,2$ (bei ca. 25 °C)
- 3.) Abfüllen in Reagenzglasröhrchen á 9,2 ml (oder ggf. 5 l in großer Schottflasche)
- 4.) Autoklavieren: 15 min/121 °C
- 4.) pH-Wert kontrollieren: 7,0 (Schwankungsbreite: 6,8-7,6; bei ca. 25 °C)
- 5.) haltbar 4 Wochen

Ringerlösung (viertelstarke)

Zusammensetzung:

Ringer-Tabletten, MERCK 15525

Herstellung:

- 1.) 1 Tablette lösen in 500 ml destilliertem Wasser
- 2.) Abfüllen in Vierkantflaschen á 92 ml
- 3.) Autoklavieren: 15 min/121 °C
- 4.) pH-Wert kontrollieren: 7,0 (Schwankungsbreite: 6,8-7,8; bei ca. 25 °C)
- 5.) haltbar 4 Wochen

API® 20 E

System zur Identifizierung von *Enterobacteriaceae* und anderen gramnegativen, nicht anspruchsvollen Stäbchen, BIOMÉRIEUX 20100

Zusätzlich benötigte Reagenzien:

TDA Reagenz, BIOMÉRIEUX 70402; JAMES Reagenz, BIOMÉRIEUX 70542; VP1 + VP2 Kit, BIOMÉRIEUX 70422; Paraffinöl, BIOMÉRIEUX 70100; McFarland Kit, BIOMÉRIEUX 70900

Tabelle 22: Ablesetabelle des API® 20 E

Tests	Reaktionsenzyme/ Aktive Bestandteile	Ergebnisse	
		Negativ	Positiv
ONPG	β-Galaktosidase	farblos	gelb
ADH*	Arginindihydrolase	gelb	rot/orange
LDC*	Lysindecaboxylase	gelb	rot/orange
ODC*	Ornithindecaboxylase	gelb	rot/orange
CIT**	Citratverwertung	hellgrün/gelb	blau-grün/blau
H ₂ S*	H ₂ S-Bildung	farblos/gräulich	schwarzer Niederschlag
URE*	Urease	gelb	rot/orange
TDA	Tryptophandesaminase	TDA/sofort	
		gelb	rotbraun
IND	Indol-Bildung	JAMES/sofort	
		farblos/hellgrün/gelb	rosa
VP**	Acetoinbildung	VP 1+VP 2/10 min	
		farblos	rosa/rot
GEL**	Gelatinase	keine Diffusion	Diffusion der Tusche
GLU	D-Glucose	blau/blau-grün	gelb/gelb grau
MAN	D-Mannit	blau/blau-grün	gelb
INO	Inosit	blau/blau-grün	gelb
SOR	D-Sorbit	blau/blau-grün	gelb
RHA	L-Rhamnose	blau/blau-grün	gelb
SAC	D-Saccharose	blau/blau-grün	gelb
MEL	D-Melibiose	blau/blau-grün	gelb
AMY	Amygdalin	blau/blau-grün	gelb
ARA	L-Arabinose	blau/blau-grün	gelb

* Überschichten der Röhrcchen mit Paraffinöl

** Befüllung von Röhrcchen und Becher

Serotypisierung

Monospezifische Testseren „Anti-*Yersinia enterocolitica*“, SIFIN

Anti- <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	1 ml, lyophilisiert	TS 1701
Anti- <i>Yersinia enterocolitica</i> O:5	1 ml, lyophilisiert	TS 1704
Anti- <i>Yersinia enterocolitica</i> O:8	1 ml, lyophilisiert	TS 1705
Anti- <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	1 ml, lyophilisiert	TS 1703
Anti- <i>Yersinia enterocolitica</i> O:27	1 ml, lyophilisiert	TS 1706

PCR und Elektrophorese

- Primer *ail1* (Sequenz: 5'GTT TAT CAA TTG CGT CTG TTA ATG TGT ACG 3')
- Primer *ail2* (Sequenz: 5'CTA TCG AGT TTG GAG TAT TCA TAT GAA GCG 3')
- Primer *virF1* (Sequenz: 5'AAG GTT GTT GAG CAT TCA CAA GAT GG 3')
- Primer *virF2* (Sequenz: 5'TTT GAG TGA AAT AAG ACT GAC TCG AGA ACC 3')
- APARA BIOSCIENCE, 79211 Denzlingen, Deutschland
- InstaGene™ Matrix, BIORAD 7326030
- DNeasy® Blood & Tissue Kit, QIAGEN 69506
- HotStarTaq Master Mix Kit, QIAGEN 203443
- Nu Sieve 3:1 Agarose, BIOZYM 850094
- TBE-Fertigpuffer (TRIS-Borat-EDTA), FLUKA 93309
- Ethidiumbromid, FLUKA 46065
- Bromphenolblau, MERCK 1.08122.0005
- Glycerin, FLUKA 49767
- 50 Base Pair Ladder, GE HEALTHCARE 27-4005-01
- 100 Base Pair Ladder, GE HEALTHCARE 27-4007-01

16 Geräte und Laborbedarf

16.1 Geräte

- Cryobank von MAST DIAGNOSTICA GmbH, Stammhaltungssystem zur Langzeitlagerung von Mikroorganismen bei -70 °C
- Laborwaage SARTORIUS BP 2100
- Bag Mixer von INTERSCIENCE
- Thermomixer comfort von EPPENDORF
- Labortischzentrifuge Biofuge pico von HERAEUS INSTRUMENTS
- Reax top von HEIDOLPH
- Vortex Mixer von NEOLAB®
- Reference Pipetten von EPPENDORF, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl

- Magnetrührer Speedsafe™ von HANNA
- Reinraumbank aura PCR von NUNC™
- Gene Amp® PCR System 2700 von APPLIED BIOSYSTEMS
- Gelelektrophoresesystem Agagel Maxi (Elektrophoresekammer inklusive Zubehör Agagel Maxi, Netzgerät Standard Power Pack P 25) von BIOMETRA biomedizinische Analytik GmbH
- Video-Dokumentationssystem BioDocII (Controller inklusive Folientastatur und Monitor, CCD Kamera Interline transfer, Dunkelhaube BDR-6, Thermofotodrucker Sony UP-D890) von BIOMETRA biomedizinische Analytik GmbH

16.2 Laborbedarf

- Stomacherbeutel mit Filter, TRANSIA 85002
- Impfösen mit Nadel und Schlinge 1 µl, BRAND 425201
- Impfösen mit Nadel und Schlinge 10 µl, BRAND 452210
- Psipetten 5ml, einzeln, steril, BIOMÉRIEUX 70 250
- Pipettenspitzen Tip One® STARLAB
 - 0,5-10 µl S 1121-4810
 - 1-100 µl S 1120-1840
 - 101-1000 µl S 1126-7810
- Safe Lock Tubes, PCR clean 2ml, EPPENDORF 0030 123.344
- Thin-Wall 8-Tube Strip, farblos, BIOZYM 712130
- MicroAmp® Base, APPLIED BIOSYSTEMS N801-5531
- MicroAmp® Tray Retainer Assembly, APPLIED BIOSYSTEMS N801-5530
- Mikrowellplatten, MERCK 391H8387
- Nitrilhandschuhe XS, STARLAB FFS-INT-XS
- Glaswaren: DRIGALSKI-Spatel, Reagenzglasröhrchen mit Metallkappen, Pipetten (Volumina 10 ml und 1 ml), Demeterpipetten

Tabelle 24: Ergebnisse der Bestimmung der Nachweisgrenze

Produkt	Keimgehalt <i>Y. enterocolitica</i> (KbE/10 g bzw. ml)	Person	Ansatz	Spezies	Dir	ITC	KOH	Urea	TWE	ASC	PYR	XYL	TRE	SAL	IND	API	O:3	aII	virF	
Hackfleisch	10 ³	I	A	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
		II	A	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
	10 ²	I	A	Y.e.	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
		II	A	Y.e.	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
	10 ¹	I	A	Y.e.	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
		II	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+
			B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+
Rohwurst	10 ³	I	A	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
		II	A	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
	10 ²	I	A	Y.e.	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
		II	A	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
	10 ¹	I	A	Y.e.	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
		II	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+
			B	Y.e.	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
Milch	10 ³	I	A	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
		II	A	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
	10 ²	I	A	Y.e.	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
		II	A	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
	10 ¹	I	A	Y.e.	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
		II	A	Y.e.	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	

Produkt	Keimgehalt <i>Y. enterocolitica</i> (KbE/10 g bzw. ml)	Person	Ansatz	Spezies	Dir	ITC	KOH	Urea	TWE	ASC	PYR	XYL	TRE	SAL	IND	API	O:3	ail	virF	
Käse	10 ³	I	A	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+
		II	A	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+
			B	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+
	10 ²	I	A	Y.e.	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
		II	A	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
	10 ¹	I	A	Y.e.	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
		II	A	Y.e.	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
Salat	10 ³	I	A	Y.e.	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+		
			B	Y.e.	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
		II	A	Y.e.	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
	10 ²	I	A	Y.e.	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
		II	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	Y.e.	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1115521	+	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
	10 ¹	I	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
		II	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	
			B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Anr.:+ Iso.:+	Anr.:+ Iso.:+	

LITERATURVERZEICHNIS

ACKERS M.L., SCHOENFELD S., MARKMAN J., SMITH M.G., NICHOLSON M.A., DE WITT W., CAMERON D.N., GRIFFIN P.M., SLUTSKER L. (2000)

An outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:8 infections associated with pasteurized milk
J. Infect. Dis., 181: 1834-1837.

ALDOVA E., SVANDOVA E., VOTYPKA J., SOUREK J. (1990)

Comparative study of culture methods to detect *Yersinia enterocolitica* serogroup O3 on swine tongues
Zentralbl. Bakteriol., 272: 306-312.

ALEKSIC S. und BOCKEMÜHL J. (1990)

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

AMMON A. und BRÄUNIG J. (2002)

Lebensmittelbedingte Erkrankungen in Deutschland
Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 01/02. www.rki.de (10.08.2007).

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

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

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

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

ARNOLD T., NEUBAUER H., GANTER M., NIKOLAOU K., ROESLER U., TRUYEN U., HENSEL A. (2006)

Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in goat herds from Northern Germany
J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health, 53: 382-386.

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

Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods

Appl. Environ. Microbiol., 39: 135-140.

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

The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR

Mol. Cell. Probes, 10: 159-164.

BHADURI S. und PICKARD A.R. (1995)

A method for isolation of chromosomal and plasmid DNA from *Yersinia enterocolitica* for simultaneous amplification by polymerase chain reaction: a possible model for other bacteria

J. Rapid Methods Autom. Microbiol., 4: 107-113.

BHADURI S. und COTTRELL B. (1998)

A simplified sample preparation method from various foods for PCR detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*: a possible model for other food pathogens

Mol. Cell. Probes, 12: 79-83.

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

Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains in pigs in the United States

Appl. Environ. Microbiol., 71: 7117-7121.

BHADURI S. (2005)

Survival, injury, and virulence of freeze-stressed plasmid-bearing virulent *Yersinia enterocolitica* in ground pork

Foodborne Pathog. Dis., 2: 353-356.

BHADURI S. (2006)

Enrichment, isolation, and virulence of freeze-stressed plasmid-bearing virulent strains of *Yersinia enterocolitica* on pork

J. Food Prot., 69: 1983-1985.

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

Role of YadA, Ail and lipopolysaccharide in serum resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3

Infect. Immun., 73: 2232-2244.

BIN-KUN H., DE-SHENG X., HONG-BI O., ZHANG S.X., SLEE K.J. (1994)

Yersiniosis in sheep due to *Yersinia enterocolitica*

Br. Vet. J., 150: 473-479.

BLAIS B.W. und PHILLIPPE L.M. (1995)

Comparative analysis of *yadA* and *ail* polymerase chain reaction methods for virulent *Yersinia enterocolitica*

Food Control, 6: 211-214.

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

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

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3561-3565.

BOCKEMÜHL J. und ROGGENTIN P. (2004)

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

BOTTONE E.J. (1997)

Yersinia enterocolitica: The charisma continues

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

BOTTONE E.J. (1999)

Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates

Microbes Infect., 1: 323-333.

BOYAPALLE S., WESLEY I.V., SCOTT HURD H., GOPAL REDDY P. (2001)

Comparison of culture, multiplex, and 5'Nuclease polymerase chain reaction assays for the rapid detection of *Yersinia enterocolitica* in swine and pork products

J. Food Prot., 64: 1352-1361.

- BOYCE J.M., EVANS D.J. JR., EVANS D.G., DUPOND H.L. (1979)
Production of heat-stable, methanol-soluble enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*
Infect. Immun., 25: 532-537.
- BUCHER M., FREDRIKSSON-AHOMAA M., STOLLE A. (2002)
Vorkommen von *Yersinia*-Arten in Kälbern und Jungrindern
Fleischwirtschaft, 9: 125-127.
- BUCHER M., FREDRIKSSON-AHOMAA M., STOLLE A. (2005a)
Yersinia enterocolitica in der Lebensmittelkette
Teil I: Vorkommen
Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, 3: 161-165.
- BUCHER M., FREDRIKSSON-AHOMAA M., STOLLE A. (2005b)
Yersinia enterocolitica in der Lebensmittelkette
Teil II: Nachweis und lebensmittelhygienische Aspekte
Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, 4: 234-239.
- CORNELIS G.R. (1998)
The *Yersinia* deadly kiss
J. Bacteriol., 180: 5495-5504.
- CORNELIS G.R., BOLAND A., BOYD A.P., GEUIJEN C., IRIARTE M., NEYT C., SORY M., STAINIER I. (1998)
The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome
Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62: 1315-1352.
- CORNELIS G.R. (2003)
How Yops find their way out of *Yersinia*
Mol. Microbiol., 50: 1091-1094.
- DE BOER E. (1992)
Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods
Int. J. Food Microbiol., 17: 75-84.

DE BOER E. (1995)

Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods
Contrib. Microbiol. Immunol., 13: 71-73.

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

Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*
Infect. Immun., 63: 3790-3795.

DELOR I., KAECKENBEECK A., 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 nonpathogenic *Yersiniae*
Infect. Immun., 58: 2983-2988.

DEVENISH J.A. und SCHIEMANN D.A. (1981)

An abbreviated scheme for identification of *Yersinia enterocolitica* isolated from food enrichments on CIN (cefsulodin-irgasan-novobiocin) agar
Can. J. Microbiol., 27: 937-941.

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

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

DICKINSON J.H., KROLL R.G., GRANT K.A. (1995)

The direct application of the polymerase chain reaction to DNA extracted from foods
Lett. Appl. Microbiol., 20: 212-216.

DIN EN ISO 10273 (2003)

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln –
Horizontales Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Yersinia enterocolitica* (ISO 10273:2003); Deutsche Fassung EN ISO 10273:2003
DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

DIN EN ISO 16140 (2003)

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln –
Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren (ISO 16140:2003);
Deutsche Fassung EN ISO 16140:2003
DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

DIN EN ISO 20837 (2006)

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Polymerase-Kettenreaktion
(PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln –
Anforderungen an die Probenvorbereitung für den qualitativen Nachweis
(ISO 20837:2006); Deutsche Fassung EN ISO 20837:2006
DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

DIN EN ISO 20838 (2006)

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Polymerase-Kettenreaktion
(PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln –
Anforderungen an Amplifikation und Nachweis bei qualitativen Verfahren
(ISO 20838:2006); Deutsche Fassung EN ISO 20838:2006
DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

DIN EN ISO 22174 (2005)

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Polymerase-Kettenreaktion
(PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln –
Allgemeine Anforderungen und Begriffe (ISO 22174:2005); Deutsche Fassung
EN ISO 22174:2005
DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

DUFFY EA., BELK KE., SOFOS JN., BELLINGER GR., PAPE A., SMITH GC. (2001)

Extent of microbial contamination in United States pork retail products
J. Food Prot., 64: 172-178.

FEARNLEY C., ON S.L., KOKOTOVIC B., MANNING G., CHEASTY T., NEWELL D.G.
(2005)

Application of fluorescent amplified fragment length polymorphism for comparison of
human and animal isolates of *Yersinia enterocolitica*
Appl. Environ. Microbiol., 71: 4960-4965.

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

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

J. AOAC Int., 85: 1187-1200.

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

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction

Lancet, 337: 496-497.

FENWICK S.G., MADIE P., WILKS C.R. (1994)

Duration of carriage and transmission of *Yersinia enterocolitica* biotype 4, serotype O:3 in dogs

Epidemiol. Infect., 113: 471-477.

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 pig slaughterhouse

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

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

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

Lett. Appl. Microbiol., 32: 375-378.

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

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

Epidemiol. Infect., 127: 37-47.

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

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

Arch. Lebensmittelhyg., 52: 66-68.

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

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

Clin. Microbiol. Rev., 16: 220-229.

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

Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections.

FEMS Immunol. Med. Microbiol., 47: 315-329.

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

Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O:3 originate mainly from pigs.

J. Med. Microbiol., 55: 747-749.

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.

GOURDON F., BEYTOUT J., REYNAUD A., ROMASZKO J.P., PERRE D., THEODORE P., SOUBELET H., SIROT J. (1999)

Human and animal epidemic of *Yersinia enterocolitica* O:9, 1989-1997, Auvergne, France

Emerg. Infect. Dis., 5: 719-721.

GRÖTZBACH B. (2007)

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.

GROSDENT N., MARIDONNEAU-PARINI I., SORY M., CORNELIS G.R. (2002)

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

HANK C. (2003)

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

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

HARTMANN B. (2007)

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

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

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

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

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

Real-time quantitative PCR
Genome Res., 6: 986-994.

HEIM D., FEHLHABER K., SCHEIBNER G. (1985)

Untersuchungen über das Verhalten von *Yersinia enterocolitica* in Lebensmitteln tierischer Herkunft

Vet. Med., 40: 95-98.

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

Identification of foodborne pathogens by nucleic acid hybridization
Int. J. Food Microbiol., 12: 67-75.

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

In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren
Mitt. Lebensm. Hyg., 93: 118-139.

IBRAHIM A. und MAC RAE I.C. (1991)

Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from red meat and milk
J. Food Science, 56: 1524-1526.

ISO 10273 (2003)

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica* (ISO 10273:2003)
International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 16140 (2003)

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods (ISO 16140:2003)
International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

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

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

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

Bacteriological analysis of fresh produce in Norway
Int. J. Food Microbiol., 77: 199-204.

KANDOLO K. und WAUTERS G. (1985)

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

KAPPERUD G. (1991)

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

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.

KITTELBERGER R., HILBINK F., HANSEN M.F., ROSS G.P., JOYCE M.A., FENWICK S.,
HEESEMANN J., WOLF-WATZ H., NIELSEN K. (1995)

Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9 II
the use of *Yersinia* outer proteins for the specific detection of *Yersinia enterocolitica*
infections in ruminants

Vet. Microbiol., 47: 271-280.

KLEER J. (2003)

Yersinia enterocolitica

In: *Einführung in die Lebensmittelhygiene*, Sinell H.J. (eds.), Parey 37-40.

KNUTSSON R. und RÅDSTRÖM P. (2002)

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a swab enrichment PCR procedure

In: *Methods in molecular biology, vol. 216: PCR Detection of microbial pathogens: methods and protocols*, Sachse K. and Frey J. (eds.), Humana Press Inc., Totowa, NJ 311-324.

KNUTSSON R., BLIXT Y., GRAGE H., BORCH E., RÅDSTRÖM P. (2002)

Evaluation of selective enrichment PCR procedures for *Yersinia enterocolitica*

Int. J. Food Microbiol., 73: 35-46.

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.

KWAGA J. und IVERSEN J.O. (1993)

Plasmids and outer membrane proteins of *Yersinia enterocolitica* and related species
of swine origin

Vet. Microbiol., 36: 205-214.

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

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a
multiplex PCR: a study of sample preparation and PCR-inhibitory components

Int. J. Food Microbiol., 45: 93-105.

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

Microbiological baseline study of broiler chickens at Swedish slaughterhouses
J. Food Prot., 69: 2875-2882.

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

A rapid sample preparation method for PCR detection of food pathogens based on buoyant density centrifugation
Lett. Appl. Microbiol., 24: 306-310.

MACKAY I.M. (2004)

Real-time PCR in the microbiology laboratory
Clin. Microbiol. Infect., 10: 190-212.

MÄDE D., PETERSEN R., TRÜMPER K., STARK R., GROHMANN L. (2004)

In-house validation of a real-time PCR method for rapid detection of *Salmonella* ssp. in food products
Eur. Food Res. Technol., 219: 171-177.

MC NALLY A., CHEASTY T., FEARNLEY C., DALZIEL R.W., PAIBA G.A., MANNING G., NEWELL D.G. (2004)

Comparison of the biotypes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs, cattle and sheep at slaughter and from humans with yersiniosis in Great Britain during 1999-2000
Lett. Appl. Microbiol., 39: 103-108.

MEWIS A., VERHAEGEN J., BOURGEOIS S., HIELE M., SCHELSTRAETE B. (1997)

Fatal *Yersinia enterocolitica* transfusion reaction
J. Clin. Pathol., 50: 796.

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

The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease
Infect. Immun., 57: 121-131.

MOBLEY H.L.T., ISLAND M.D., HAUSINGER R.P. (1995)

Molecular biology of microbial ureases
Microbiol. Rev., 59: 451-480.

N.N. (1999)

Yersinia enterocolitica

Stellungnahme des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit

Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 42: 613-621.

N.N. (2000)

Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen
(Infektionsschutzgesetz) vom 20. Juli 2000

Bundesgesetzblatt I, 1045.

N.N. (2004a)

Untersuchung von Lebensmitteln

Horizontales Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Yersinia enterocolitica* (L 00.00-90)

Ämtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

N.N. (2004b)

Spezifische Detektion plasmidtragender (pYV⁺) *Yersinia enterocolitica*-Isolate mittels
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Arbeitskreis Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik, AVID Anweisung.

N.N. (2006a)

Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der
Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie

Schweizerische Akkreditierungsstelle (SAS), Dokument Nr. 328.dw.

N.N. (2006b)

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und
Futtermittelgesetzbuch) i. d. F. vom 26.04.2006

Bundesgesetzblatt I, 945.

N.N. (2007)

Protocol for the validation of alternative microbiological methods

NordVal, c/o National Veterinary Institute, Oslo, Norway.

- NAKAJIMA H., ITOH K., ARAKAWA E., INOUE M., MORI T., WATANABE H. (1992)
Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method
J. Clin. Microbiol., 30: 2484-2486.
- NAKAJIMA H., ITOH K., ARAKAWA E., INOUE M., MORI T., WATANABE H. (1994)
Degradation of a polymerase chain reaction (PCR) product by heat-stable deoxyribonuclease (DNase) produced from *Yersinia enterocolitica*
Microbiol, Immunol., 38: 153-156.
- NESBAKKEN T. (1988)
Enumeration of *Yersinia enterocolitica* O:3 from the porcine oral cavity, and its occurrence on cut surfaces of pig carcasses and the environment in a slaughterhouse
Int. J. Food Microbiol., 6: 287-293.
- NESBAKKEN T., KAPPERUD G., DOMMARSNES K., SKURNIK M., HORNES E. (1991)
Comparative study of a DNA hybridization method and two isolation procedures for detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 in naturally contaminated pork products
Appl. Environ. Microbiol., 57: 389-394.
- NEUBAUER H., SAUER T., BECKER H., ALEKSIC S., MEYER H. (1998)
Comparison of systems for identification and differentiation of species within the genus *Yersinia*
J. Clin. Microbiol., 36: 3366-3368.
- NEUBAUER H., HENSEL A., ALEKSIC S., MEYER H. (2000)
Evaluation of a *Yersinia* adhesion gene (*yadA*) specific PCR for the identification of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica*
Int. J. Food Microbiol., 57: 225-227.
- NEUBAUER H., SPRAGUE L.D., SCHOLZ H., HENSEL A. (2001a)
Die Diagnostik der *Yersinia enterocolitica*-Infektionen: Eine Übersicht über klassische Nachweistechiken und neue molekularbiologische Methoden
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 114: 1-7.

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

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

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

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

NEWTON C.R. und GRAHAM A. (1994)

In: *PCR*
Spektrum Akademischer Verlag, 19-60.

NILSSON A., LAMBERTZ S.T., STALHANDSKE P., NORBERG P., DANIELSSON-THAM M.L. (1998)

Detection of *Yersinia enterocolitica* in food by PCR amplification
Lett. Appl. Microbiol., 26: 140-144.

NMKL (1998)

Pathogenic *Yersinia enterocolitica*. PCR methods for detection in foods.
Nordic Committee on Food Analysis, Method no. 163. Oslo, Norway.

PIERSON D.E. und FALKOW S. (1990)

Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional *inv*-homologous sequences
Infect. Immun., 58: 1059-1064.

PORTNOY D.A. und FALKOW S. (1981)

Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*
J. Bacteriol., 148: 877-883.

RAKIN A. (2003)

Yersinia pestis. Eine Bedrohung für die Menschheit
Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 46: 949-955.

RILEY G. und TOMA S. (1989)

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using Congo red-magnesium oxalate agar medium

J. Clin. Microbiol., 27: 213-214.

ROBERT KOCH INSTITUT (2004a)

Bakterielle Gastroenteritiden: Situationsbericht 2003

Epidemiologisches Bulletin, 31. www.rki.de (20.09.2005).

ROBERT KOCH INSTITUT (2004b)

Fallberichte: Enteritis durch *Yersinia enterocolitica*, Serogruppe O:8, Biotyp 1B

Epidemiologisches Bulletin, 43. www.rki.de (20.09.2005).

ROBERT KOCH INSTITUT (2006)

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

Epidemiologisches Bulletin, 41. www.rki.de (08.08.2006).

ROBERT KOCH INSTITUT (2007)

Yersinia enterocolitica, darmpathogen (Yersiniose)

Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern, Ausgabe 2007. www.rki.de (10.08.2007).

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.

SACHS L. (2002)

Angewandte Statistik

Springer Verlag, Berlin, 2002: 468-473.

SCHIEMANN D.A. und TOMA S. (1978)

Isolation of *Yersinia enterocolitica* from raw milk

Appl. Environ. Microbiol., 35: 54-58.

SCHIEMANN D.A. (1978)

Association of *Yersinia enterocolitica* with the manufacture of cheese and occurrence in pasteurized milk

Appl. Environ. Microbiol., 36: 274-277.

SCHIEMANN D.A. (1979)

Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*

Can. J. Microbiol., 25: 1298-1304.

SCHIEMANN D.A. (1982)

Development of a two-step enrichment procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from food

Appl. Environ. Microbiol., 43: 14-27.

SCHIEMANN D.A. (1983)

Alkalotolerance of *Yersinia enterocolitica* as a basis for selective isolation from food enrichments

Appl. Environ. Microbiol., 46: 22-27.

SCHIEMANN D.A. und OLSON S.A. (1984)

Antagonism by gram-negative bacteria to growth of *Yersinia enterocolitica* in mixed cultures

Appl. Environ. Microbiol., 48: 539-544.

SCHIEMANN D.A. (1987)

Yersinia enterocolitica in milk and dairy products

J. Dairy Sci., 70: 383-391.

SLEE K.J. und BUTTON C. (1990)

Enteritis in sheep and goats due to *Yersinia enterocolitica* infection

Aust. Vet. J., 67: 396-398.

SLEE K.J. und SKILBECK N.W. (1992)

Epidemiology of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* infections in sheep in Australia

J. Clin. Microbiol., 30: 712-715.

SPRAGUE L.D. und NEUBAUER H. (2005)

Yersinia aleksiciae sp. nov.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55: 831- 835.

TACKET C.O., NARAIN J.P., SATTIN R., LOFGREN J.P., KONIGSBERG C.Jr.,
RENDTORFF R.C., RAUSA A., DAVIS B.R., COHEN M.L. (1984)

A multistate outbreak of infections caused by *Yersinia enterocolitica* transmitted by
pasteurized milk

JAMA., 251: 483-486.

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

Yersinia enterocolitica infections and pork: the missing link

Lancet, 1: 1129-1132.

THISTED LAMBERTZ S., BALLAGI-PORDANY A., NILSSON A., NORBERG P.,
DANIELSSON-THAM M.L. (1996)

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

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

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. (2005)

Development of a PCR-based method for detection of pathogenic *Yersinia
enterocolitica* in pork

Doctoral thesis No. 2005:123

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

Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by
PCR and pulsed-field gel electrophoresis

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

THISTED LAMBERTZ S., GRANATH K., FREDRIKSSON-AHOMAA M., 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., 70: 335-340.

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.

TOBBACK E., DECOSTERE A., HERMANS K., HAESBROUCK F., CHIERS K. (2007)

Yersinia ruckeri infections in salmonid fish

J. Fish Dis., 30: 257-268.

VERHAEGEN J., CHARLIER J., LEMMENS P., DELMÉE M., VAN NOYEN R., VERBIST L., WAUTERS G. (1998)

Surveillance of human *Yersinia enterocolitica* infections in Belgium: 1967-1996

Clin. Infect. Dis., 27: 59-64.

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

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

Urease activity of Enterobacteriaceae: Which medium to choose

Appl. Microbiol., 26: 850-854.

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

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

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

WAUTERS G. (1973)

Improved methods for the isolation and the recognition of *Yersinia enterocolitica*
Contrib. Microbiol. Immunol., 2: 68-70.

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

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

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

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

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

Modified enrichment broth for isolation of *Yersinia enterocolitica* from nonfood
sources
Appl. Environ. Microbiol., 45: 468-471.

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

Detection of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 by a PCR method
J. Clin. Microbiol., 34: 1224-1227.

WREN B.W. und TABAQCHALI S. (1990)

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction
Lancet, 336: 693.

WUTHE H.H. und ALEKSIC S. (1992)

Yersinia enterocolitica Serovar 1, 2a, 3 Biovar 3 in Chinchillas
Zentralbl Bakteriol., 277: 403-405.

WUTHE H.H. und ALEKSIC S. (1997)

Yersinia enterocolitica Serovar 2a, 2b, 3b,c Biovar 5 bei Infektionen von Feldhase
und Schaf
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 110: 176-177.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Verfahrensdiagramm gemäß dem „Horizontalen Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen <i>Y. enterocolitica</i> “ L 00.00-90 aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches	38
Abbildung 2: Anzahl der Proben bezogen auf die untersuchten Warengruppen	52
Abbildung 3: Verfahrensdiagramm zum Nachweis von pathogenen <i>Y. enterocolitica</i>	64
Abbildung 4: Vergleichende Darstellung der Sensitivität und der Falsch-Negativ-Rate der untersuchten Verfahren	79
Abbildung 5: Positives Ergebnis des PCR-Screenings auf die Gene <i>ail</i> und <i>virF</i> (Schweinezunge, Proben-Nummer 86)	86
Abbildung 6: Inhibition des PCR-Screenings bei einer Probe „Schweineleber“	87
Abbildung 7: Ausschaltung der Inhibitionseffekte bei zwei Proben „Schweineleber“ nach Einsatz des DNeasy® Blood & Tissue Kit von QIAGEN	88
Abbildung 8: Übersicht über die isolierten <i>Yersinia</i> spp.	90
Abbildung 9: Übersicht über die biochemisch bestätigten Subkulturen (SK).....	91
Abbildung 10: Übersicht über die biochemisch identifizierten Subkulturen	92
Abbildung 11: Positives Ergebnis der Pathogenitätsprüfung mittels PCR auf die Gene <i>ail</i> und <i>virF</i> (Schweinezunge, Proben-Nummer 86)	93
Abbildung 12: Vergleichende Darstellung der Anzahl <i>Yersinia</i> -positiver Proben mittels PCR-Screening und kulturellem Nachweis	94
Abbildung 13: Vergleichende Darstellung der Anzahl <i>Yersinia</i> -positiver Proben aus Fertigpackungen und offener Ware	95

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Biotypen von <i>Y. enterocolitica</i> (nach WAUTERS et al., 1987)	12
Tabelle 2:	Darstellung wichtiger Virulenzfaktoren von <i>Y. enterocolitica</i> (nach BOTTONNE, 1999)	13
Tabelle 3:	Nachweis pathogener <i>Y. enterocolitica</i> in Lebensmitteln vom Schwein	20
Tabelle 4:	Nachweis pathogener <i>Y. enterocolitica</i> in anderen Lebensmitteln	21
Tabelle 5:	Vergleichende Darstellung der alternativen PCR-Methoden A und B gemäß NMKL Nr. 163, 1998	40
Tabelle 6:	Auswerteschema für qualitative Nachweisverfahren (nach HÜBNER et al., 2002)	46
Tabelle 7:	Übereinstimmungsstufen in Bezug auf den Konkordanzindex Kappa (nach SACHS, 2002)	49
Tabelle 8:	PCR-Programm	57
Tabelle 9:	Übersicht der verwendeten Primerpaare, Zielgene und spezifischen Amplifikatgrößen	58
Tabelle 10:	Biotypisierung von <i>Y. enterocolitica</i>	60
Tabelle 11:	Übersicht über die zur Überprüfung der Exklusivität eingesetzten Mikroorganismen	67
Tabelle 12:	Vergleichende Darstellung des chronologischen Ablaufes der Verfahrensvergleichsuntersuchung	70
Tabelle 13:	Ergebnisse der Überprüfung der Inklusivität des PCR-Screenings (Gene <i>ail/virF</i>)	75
Tabelle 14:	Ergebnisse der Verfahrensvergleichsuntersuchung im Überblick	77
Tabelle 15:	Auswerteschema zur Verfahrensvergleichsuntersuchung	80
Tabelle 16:	Nachweisgrenze des PCR-Screenings und des kulturellen Nachweises des eigenen Verfahrens bezogen auf die jeweiligen Lebensmittelmatrizes	83
Tabelle 17:	Ergebnisse der Bestimmung der Nachweisgrenze im Überblick	84
Tabelle 18:	Übersicht über die Ergebnisse des PCR-Screenings	87
Tabelle 19:	Übersicht über die Ergebnisse des kulturellen Nachweises	89
Tabelle 20:	Übersicht über das zur In house-Validierung eingesetzte Probenmaterial	113
Tabelle 21:	Übersicht über das untersuchte Probenmaterial	113
Tabelle 22:	Ablesetabelle des API® 20 E	124
Tabelle 23:	Ergebnisse der Verfahrensvergleichsuntersuchung	127
Tabelle 24:	Ergebnisse der Bestimmung der Nachweisgrenze	128

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Dr. h.c. A. Stolle für die Überlassung des Themas meiner Dissertation.

Mein ganz besonderer Dank geht an Frau Dr. M. Fredriksson-Ahomaa, die mir trotz der räumlichen Distanz jederzeit beratend zur Seite stand. Ich danke ihr für die herzliche und ebenso kompetente Betreuung sowie für die fachliche Durchsicht meiner Arbeit.

Außerdem danke ich dem Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe für die Möglichkeit das Thema zu bearbeiten.

Ein herzliches Dankeschön gilt Herrn Dr. M. Lohneis, Frau Dr. D. Noack und Frau Dr. A. Sabrowski für die Unterstützung bei der Anforderung der Proben und die stets kollegiale Zusammenarbeit sowie Frau Dr. J. Holtbecker für die hilfreichen Tipps zur Anfertigung dieser Dissertation.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau K. Hoernicke für die Unterstützung bei der Validierung des Verfahrens sowie Herrn A. Völzke für die Einarbeitung in die Techniken der PCR. Dank gebührt ebenso allen weiteren Mitarbeitern im mikrobiologischen Labor für die freundliche Hilfe.

Besonders danke ich meinem Freund Michael, der mir stets den Rücken frei hielt, für die geistige Unterstützung, für die unermüdliche Geduld bei der Vertiefung meiner PC-Kenntnisse sowie für die Korrektur des Manuskriptes.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir in allen Situationen zur Seite standen und mich stets gefördert haben. Ich danke ihnen und meiner übrigen Familie, dass sie immer für mich da sind.

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name	Christine Knödl
Geburtsdatum	22.05.1980
Geburtsort	Annweiler am Trifels
Eltern	Karl Anton Knödl Elsbeth Karoline Knödl, geb. Krieg

Schul Ausbildung

1986–1990	Grundschule Annweiler am Trifels
1990–1999	Trifels Gymnasium Annweiler am Trifels
19.06.1999	Abitur

Studium

1999–2005	Studium der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
05.04.2005	Approbation als Tierärztin

Berufliche Tätigkeit

seit Mai 2005	Angestellt als Laborleiterin am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe
---------------	---