

Aus der Klinik für kleine Klauentiere und forensische Medizin
und Ambulatorischen Klinik
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

**Untersuchungen zum Nachweis von *Yersinia enterocolitica* im Kot
von Mastschweinen mittels Immunfluoreszenztest**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DER VETERINÄRMEDIZIN
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

**vorgelegt von
Anne Lisa Louis
aus Essen**

Hannover 2005

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. K.-H. Waldmann

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. K.-H. Waldmann

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. G. Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2005

Allen, die mich unterstützt haben

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	11
2 Literaturübersicht.....	13
2.1 Systematik.....	13
2.2 Historie	14
2.3 Taxonomie.....	15
2.4 Nachweismöglichkeiten für <i>Yersinia enterocolitica</i>	22
2.4.1 Bakteriologischer Nachweis.....	22
2.4.1.1 Anzucht und Identifizierung	22
2.4.1.2 Serotypisierung.....	25
2.4.1.3 Biochemische Pathogenitätstests.....	26
2.4.2 Diagnostik mittels PCR	27
2.4.2.1 Detektion plasmidkodierter Gene	29
2.4.2.2 Detektion chromosomalkodierter Gene	29
2.4.2.3 Kombinierte Detektion chromosomal- und plasmidkodierter Gene.....	30
2.4.3 Serologischer Nachweis	31
2.4.3.1 Antikörpernachweis	31
2.4.3.2 Antigennachweis	32
2.5 Infektion und Krankheitsbild beim Menschen	33
2.6 Infektion und Krankheitsbild beim Tier.....	36
2.6.1 Infektion des Schweines.....	37
2.6.1.1 Experimentelle Infektion des Schweines	37
2.6.1.2 Natürliche Infektion des Schweines.....	38
2.6.2 Infektion des Rindes	38
2.6.3 Infektion bei Schaf und Ziege	39
2.6.4 Infektion des Hundes.....	40
2.6.5 Infektion der Katze.....	41
2.6.6 Infektion bei Hasen und Kaninchen	42
2.7 Epidemiologie	42
2.7.1 Epidemiologie der humanen Infektion	42
2.7.2 Verbindung zwischen humaner und porciner Infektion	46

2.7.3 Epidemiologie der porzinen Infektion.....	49
2.7.4 Vergleich der epidemiologischen Situationen verschiedener Länder	51
2.7.4.1 Humane Infektionen.....	51
2.7.4.2 Porzine Infektionen.....	52
3 Eigene Untersuchungen	55
3.1 Material.....	55
3.1.1 Herkunft der Proben, Probenzahl und Entnahme	55
3.1.2 Konservierung und Aufbereitung der Proben.....	56
3.1.3 Auswahl der zu untersuchenden Bestände	57
3.2 Methode.....	57
3.2.1 Bakteriologische Untersuchung	57
3.2.2 Serologische Untersuchung.....	58
3.2.3 Indirekter Immunfluoreszenztest.....	59
3.2.3.1 Arbeitsprotokoll zur Durchführung des Immunfluoreszenztests.....	59
3.2.3.2 Gebrauchsverdünnungen und Hintergrundfluoreszenz	60
3.2.3.3 Beurteilung des Immunfluoreszenztests	61
3.2.3.4 Ermittlung der Nachweisgrenze	63
3.2.3.5 Absicherung der Methode, Wiederholbarkeit der Ergebnisse.....	64
3.2.4 PCR	64
3.2.5 Statistische Auswertung	65
4 Ergebnisse	67
4.1 Gebrauchsverdünnung und Nachweisgrenze.....	67
4.2 Ergebnisse der Wiederholungsuntersuchung	67
4.3 Ergebnisse des Immunfluoreszenztests	67
4.4 Betriebsergebnis.....	70
4.5 Ergebnisse der PCR	71
4.6 Statistische Auswertung	71
4.7 Materialkosten für die Durchführung des Immunfluoreszenztests	73
5 Diskussion	75
6 Zusammenfassung	90
7 Summary	92

8 Literaturverzeichnis.....	94
9 Anhang.....	134
9.1 Chemikalien und Reagenzien.....	134
9.1.1 Pufferlösung für den Immunfluoreszenztest	134
9.1.2 Reinsubstanzen, Lösungen und Medien.....	134
9.2 Geräte.....	135
9.3 Tabellenverzeichnis.....	136
9.4 Abbildungsverzeichnis	137

Verzeichnis der Abkürzungen

16s	Untereinheit eines Ribosoms
Ail	attachment-invasion locus
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
Da	Dalton
DNA	desoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GALT	gut associated lymphoid tissue
IfSG	Infektionsschutzgesetz
Ig	Immunglobulin
Inv	Invasin
ITC	Irgasan-Ticarillin-Kaliumchlorat
Kb	Kilobasen
KBR	Komplementbindungsreaktion
LB-BSI	Luria-Bertani-Galle-Salz-Irgasan
LPS	Lipopolysaccharid
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
O-Antigen	Oberflächenantigen
OD	optische Dichte
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
p.inf.	post infectionem
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pYV	Virulenzplasmid von <i>Yersinia spp.</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
sp.	spezies
SSDC	<i>Salmonella</i> Shigella Agar
ssp.	subspezies
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
vgl.	vergleiche
VYE	virulent <i>Yersinia enterocolitica</i>
yadA	<i>Yersinia</i> -Adhäsionsprotein
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Yops	<i>Yersinia</i> outer proteins
YopT	<i>Yersinia</i> outer protein T

1 Einleitung

Nach dem europäischen Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonoseninfektionen aus dem Jahr 2002 ist *Yersinia spp.* der dritthäufigste Zoonoseerreger bei den gemeldeten Humanerkrankungen (EUROPÄISCHE UNION 2002b). In Deutschland werden die Infektionen des Menschen durch die virulenten Stämme der Serogruppen O:3 und O:9 verursacht (ALEKSIC u. BOCKEMÜHL 1996; KRAUSS et al. 2004). Am häufigsten wird die Serogruppe O:3 nachgewiesen (STOLK-ENGELAAR u. HOOGKAMP-KORSTANJE 1996). Schweine sind ein bedeutsames Reservoir für humanpathogene *Yersinia enterocolitica*. Insbesondere der Verzehr von rohem Schweinefleisch oder ungenügend erhitzten Innereien ist ein Risikofaktor für den Verbraucher (TAUXE et al. 1987; KAPPERUD et al. 1995). In der Richtlinie 2003/99/EG zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern ist die Yersiniose im Anhang I, Teil B aufgeführt und ist daher bei entsprechender epidemiologischer Situation im jeweiligen Mitgliedsstaat zu überwachen. Artikel 4 (4) der Richtlinie führt aus, dass die Situation auf der Grundlage des Vorkommens des Erregers in Human- und Tierpopulationen, der Schwere der Auswirkungen auf den Menschen, der wirtschaftlichen Konsequenzen z.B. für die Lebensmittelindustrie und der epidemiologischen Entwicklungstendenzen zu beurteilen ist. Letzteres ist für *Yersinia enterocolitica* erst seit dem Inkrafttreten des Infektionsschutzgesetzes im Jahr 2001 fundiert möglich, da zuvor keine gesonderte Meldung der akuten Infektion mit darmpathogenen *Yersinia enterocolitica* vorgeschrieben war und die Erkrankungen lediglich als „Enteritis infectiosa – übrige Formen“ erfasst wurden.

Vor dem Hintergrund der im Dezember 2003 erlassenen europäischen Verordnung zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerregern, die die Verlagerung der Hauptverantwortung für die Sicherheit von Lebensmitteln auf die Lebensmittelunternehmer einschließlich der Landwirte fordert, ist vor allem die Bestandsdiagnostik als Basis für das mögliche Ergreifen von Präventivmaßnahmen von zentraler Bedeutung. Um eine zukunftsweisende Methode zur Durchführung der Bestandsdiagnostik von *Yersinia*

enterocolitica zu entwickeln, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob der Nachweis von *Yersinia enterocolitica* im Kot von Mastschweinen mit einem indirekten Immunfluoreszenztest möglich ist. Immunfluoreszenztests sind einfach und schnell durchführbar und außerdem kostengünstig. Das Probenmaterial Kot ermöglicht die Diagnostik im Bestand am lebenden Tier.

2 Literaturübersicht

2.1 Systematik

Die Gattung *Yersinia* gehört zu der Familie der Enterobacteriaceae und umfasst derzeit 10 Spezies, nämlich *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia rhodei* und die apathogenen Spezies *Yersinia aldovae*, *Yersinia bercovieri* und *Yersinia mollaretii* (BERCOVIER u. MOLLARET 1984). Ausgegliedert aus der Spezies *Yersinia enterocolitica* wurden apathogene Umweltkeime, wie z.B. *Yersinia aldovae*, *Yersinia bercovieri*, und *Yersinia mollaretii* (HOLT 1994). Pathogene Eigenschaften in Form von Virulenzfaktoren besitzen nur die Stämme der drei erstgenannten Spezies. Die übrigen Spezies des Genus *Yersinia* sind in der Regel Umweltkeime, die in seltenen Fällen zu transienten Infektionen von warm- und kaltblütigen Wirten führen. Die Zuordnung von *Yersinia ruckeri*, einem fischpathogenen Keim, zu dem Genus *Yersinia* ist derzeit noch unklar (BOCKEMÜHL u. WONG 2003).

Yersinia enterocolitica ist eine in Bio- und Serovare aufgeteilte Spezies. Einige Sero-/Biovarkombinationen kommen auch beim Menschen vor und sind oft mit Erkrankungen verbunden. Die Mehrzahl wird jedoch aus Proben von Haus- und Wildtieren isoliert (HAMMERSCHMIDT u. HELLMANN 1981).

Anhand von Untersuchungen an dem 16S rRNA-Gen konnte nachgewiesen werden, dass *Yersinia enterocolitica* im Gegensatz zu den anderen Spezies der Gattung *Yersinia* nochmals in Untergruppen unterteilt werden kann. Zunächst wurde eine Unterscheidung in europäische und amerikanische Stämme vorgenommen (IBRAHIM 1995, NEUBAUER et al. 1999). NEUBAUER et al. (2000a) regten an, *Yersinia enterocolitica* in zwei Subspezies zu unterteilen. Die Autoren schlugen die Namen *Yersinia enterocolitica* ssp. *enterocolitica* für den ATCC-9610-Stammtyp (ehemals „amerikanische“ Stämme) und *Yersinia enterocolitica* ssp. *palaearctica* für Y-711-Typen (ehemals „europäische“ Stämme) vor, da nach Isolierung eines

„europäischen“ Stammes in den USA die Einteilung in europäische und amerikanische Stämme nicht mehr haltbar war.

2.2 Historie

Die Gattung *Yersinia* wurde nach dem Bakteriologen Alexandre Emil Jean YERSIN benannt, der 1894 als Erster den Erreger der menschlichen Pest isolierte.

Die Etablierung dieser Gattung ist VAN LOGHEM zuzuschreiben. Er schlug im Jahre 1944 vor, zwei der bis dahin den Pasteurellen zugeordneten Spezies aufgrund wichtiger Unterschiede auszugliedern, in die Gattung *Yersinia* zu übernehmen und diese in die Familie der Enterobacteriaceae einzuordnen.

Die erste anerkannte Beschreibung von *Yersinia enterocolitica* wurde 1934 in den USA durch McIVER und PIKE verfasst. Sie berichteten unter dem Namen *Flavobacterium pseudomallei* über ein kleines gramnegatives Stäbchenbakterium, welches aus zwei Abszessen im Gesicht eines Farmbewohners isoliert worden war. Betroffen waren außerdem die zervikalen Lymphknoten. Aufgrund der Beteiligung der Stirnhöhlen vermuteten die Autoren Krankheiten, wie Aktinomykose, Rotz oder Tuberkulose. Allerdings konnte biochemisch keine Übereinstimmung zwischen dem isolierten Erreger und *Pseudomonas mallei* (heute *Burkholderia mallei*, Erreger des Rotzes) oder *Pseudomonas pseudomallei* festgestellt werden. McIVER und PIKE folgerten, dass es sich um eine bisher unbekannte Bakterienspezies handele oder dass eine atypische Form von bereits beschriebenen Spezies aufgetreten sei.

SCHLEIFSTEIN und COLEMAN schenken der Beschreibung von McIVER und PIKE im Jahre 1939 Beachtung, als sie einen Keim untersuchten, der Ähnlichkeit mit *Actinobacillus lignieresii* und *Pasteurella pseudotuberculosis* hatte. Der Keim wurde aus Darminhalt isoliert, deshalb schlugen sie den Namen „Bacterium enterocoliticum“ vor. HÄSSIG et al. isolierten 1949 ähnliche Keime aus menschlichen Proben, die sie aufgrund der Ähnlichkeit zu Pasteurellen als „Pasteurella pseudotuberculosis rodentium“ bezeichneten. 1963 benannten KNAPP und THAL diese Keimgruppe als „Pasteurella X“. 1964 schlug FREDRIKSEN aufgrund der Ergebnisse biochemischer

Vergleichsstudien an verschiedenen Stämmen die Schaffung einer eigenen Spezies mit dem Namen *Yersinia enterocolitica* vor.

2.3 Taxonomie

Yersinia ssp. sind gramnegative, gerade bis kokkoide Stäbchen, die etwa 1-3 µm lang und etwa 0,5-0,8 µm breit sind. Sie sind fakultativ anaerob, in der Regel wird jedoch aerob angezüchtet. Yersinien sind psychrotroph und alkalistabil. Sie gehören zur Familie der Enterobacteriaceae, sind Oxidase-negativ, Katalase-positiv, meist Urease-positiv (75% aller Spezies) und fermentieren unter Säurebildung Kohlenhydrate. Gas und Sulfid werden nicht gebildet. Yersinien wachsen nicht in Anwesenheit von Kaliumcyanid; Phenylalanin und Tryptophan werden nicht desaminiert, Gelatine wird nicht verflüssigt, Lysin nicht decarboxyliert und Arginin nicht dehydroxyliert. Nitrat wird zu Nitrit reduziert (BOCKEMÜHL u. WONG 2003).

Bei Anzucht unter 28°C sind Yersinien aufgrund peritricher Begeißelung beweglich, bei höheren Temperaturen sind sie unbeweglich (SELBITZ 2002). *Yersinia pestis* ist immer und einige Stämme von *Yersinia ruckeri* sind manchmal unbeweglich (HOLT 1994).

Yersinien wachsen auf nichtselektiven Medien, wie zum Beispiel Standard I oder II Agar, der Peptone verschiedener Herkunft, Hefeextrakt, Natriumchlorid und D-(+)-Glucose enthält. Auch Blutagar (Zusatz von Schafblut zu Standard I Agar (50-80ml Blut/l fertigen Agar)) eignet sich für die Anzucht von *Yersinia*. Lediglich *Yersinia pestis* benötigt für die Anzucht bestimmte Aminosäuren.

Mit Hilfe von DNA-Hybridisierungen kann festgestellt werden, in welchem Maße die genetische Information zweier Bakterienstämme übereinstimmt. Dabei wird der Guanin- und Cytosingehalt der DNA bestimmt und mit Referenzstämmen verglichen (ALEKSIC u. BOCKEMÜHL 1990). Für die Abgrenzung einer Spezies muss die DNA-Verwandtschaft unter 70% liegen (BRENNER 1989). Brenner et al. (1976) führten diese Untersuchung für *Yersinia-enterocolitica*- und *Yersinia-pseudotuberculosis*-Isolate durch. Innerhalb der Spezies *Yersinia enterocolitica* waren drei „Verwandtschaftsgruppen“ deutlich und eine vierte weniger deutlich zu

erkennen. Diese Gruppen unterschieden sich in ihrer Fähigkeit, Zucker, wie Rhamnose, Melibiose und Raffinose, zu verwerten (BRENNER et al. 1976). Später diente die DNA-Hybridisierung der Abgrenzung der den von BRENNER et al. beschriebenen „Verwandtschaftsgruppen“ entsprechenden Spezies *Yersinia rhodei* (ALEKSIC et al. 1987), *Yersinia mollaretii* und *Yersinia bercovieri* (WAUTERS et al. 1988a) von *Yersinia enterocolitica*.

Die Gattung *Yersinia* umfasst heute elf Spezies (vgl. Abbildung 1). Die Spezies *Yersinia intermedia*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia aldovae*, *Yersinia rohdei*, *Yersinia mollaretii* und *Yersinia bercovieri* wurden ursprünglich *Yersinia enterocolitica* zugerechnet und stellen inzwischen eigenständige Spezies dar.

<p><i>Yersinia pestis</i> (VAN LOGHEM 1944; MOLLARET u. THAL 1974)</p> <p><i>Yersinia pseudotuberculosis</i> (MALASSEZ u. VIGNAL 1883)</p> <p><i>Yersinia enterocolitica</i> (SCHLEIFSTEIN u. COLEMAN 1939)</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>enterocolitica</i> (NEUBAUER et al. 2000a) - <i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>palaearctica</i> (NEUBAUER et al. 2000a) <p>ursprünglich <i>Yersinia enterocolitica</i> zugerechnet und inzwischen zusätzliche Spezies:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Yersinia intermedia</i> (BRENNER et al. 1980) - <i>Yersinia kristensenii</i> (BERCOVIER et al. 1980) - <i>Yersinia frederiksenii</i> (URSING et al. 1980) - <i>Yersinia aldovae</i> (BERCOVIER et al. 1984) - <i>Yersinia rohdei</i> (ALEKSIC et al. 1987) - <i>Yersinia mollaretii</i> (WAUTERS et al. 1988b) - <i>Yersinia bercovieri</i> (WAUTERS et al. 1988b) <p><i>Yersinia ruckeri</i> (EWING et al. 1978; DE GRANDIS et al. 1988)</p>

Abbildung 1: Übersicht über die heute zur Gattung *Yersinia* gehörigen Spezies und ihre Erstbeschreibung, erweitert nach CARNIEL (2003)

Die verschiedenen *Yersinia*-Spezies lassen sich auf Grund ihrer biochemischen Reaktionen unterscheiden (vgl. Tabelle 1). *Yersinia enterocolitica* Biovar 1-4 weist mit fünf positiv oder negativ ausfallenden Reaktionen (Indolspaltung, Voges-Proskauer-Reaktion, Sorboseverwertung, Autoagglutination und Pyrazin-

amidaseaktivität) die größte Variabilität in den Ergebnissen auf. Daher kann die Diagnose „*Yersinia enterocolitica* Biovar 1-4“ nur gestellt werden, wenn 6 der 7 bei diesen Biotypen eindeutig ausfallenden Reaktionen durchgeführt werden.

Tabelle 1: Biochemische Differenzierung der *Yersinia*-Spezies, modifiziert nach ALEKSIC u. BOCKEMÜHL (1990) und NEUBAUER et al. (2000a)

<i>Yersinia</i> -Spezies	Motilität bei 28°C	Indol	Voges-Proskauer	Citrat	ODC	Saccharose	Cellobiose	Melibiose	Rhamnose	Sorbitose	Muc	AA	Pyrazinamidase
<i>Y. pestis</i>	nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nu
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	ja	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>Y. enterocolitica</i> Biovar 1-4	ja	+/-	+/-	-	+	+	+	-	-	+/-	-	+/-	+/-
<i>Y. enterocolitica</i> Biovar 5	ja	-	+	-	+/-	+/-	+	-	-	+/-	-	+	+
<i>Y. intermedia</i>	ja	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-	+
<i>Y. frederiksenii</i>	ja	+	+/-	+/-	+	+	+	-	+	+	+/-	-	+
<i>Y. kristensenii</i>	ja	+/-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
<i>Y. aldovae</i>	ja	-	+	+/-	+	-	-	-	+	+	+/-	-	+
<i>Y. rhodei</i>	ja	-	-	+	+	+	+	+/-	-	+	-	-	+
<i>Y. mollaretii</i>	ja	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>Y. bercorvieri</i>	ja	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+

Alle Reaktionen werden bei 22°-28°C für 48h durchgeführt; ODC=Ornithindecaboxylase; AA=Autoagglutination in Voges-Proskauer-Bouillon; + =positiv, mehr als 90% positiv; - =negativ, weniger als 10% positiv; +/- =variabel, 10-90% positiv; nu=nicht untersucht

Zur Durchführung der Speziesdiagnostik stehen kommerzielle biochemische Identifikationssysteme zur Verfügung. ARNOLD et al. (2004) gaben dem API-20E-System (Fa. bioMérieux, Nürtingen) gegenüber dem *Yersinia*-identifikation-kit (Fa. Merlin, Bornheim-Hersel) den Vorzug. ALEKSIC und BOCKEMÜHL (1999) verglichen das API-20E-System mit der separaten Durchführung der einzelnen

Identifizierungsreaktionen. Die Autoren ermittelten bei einer Anzuchttemperatur von 28°C eine Identifikationsrate für *Yersinia enterocolitica* von 93%.

Da nicht alle Vertreter der Spezies *Yersinia enterocolitica* pathogen sind, ist es von großer Bedeutung, die Pathogenität des jeweiligen Isolates zu ermitteln. Zur Pathogenitätsbestimmung wird auf das Vorhandensein von Virulenzfaktoren bzw. der Gene für diese Faktoren untersucht.

Die Gene für die Virulenzfaktoren von pathogenen *Yersinia enterocolitica* liegen sowohl auf einem 70-75 Kilobasen (kb) großen Plasmid namens pYV (PORTNOY u. FALKOW 1981) als auch auf der chromosomalen DNA der Bakterien (vgl. auch Tabelle 5, S. 28). PYV ist essentiell für die Virulenz eines Stammes und kodiert für z.B. die *Yersinia*-outer-proteins (Yops), die antiphagozytäre Eigenschaften haben. Ein Vertreter der Yops ist YopT, ein Protein, das auch für die PCR-Diagnostik Bedeutung hat. Weitere auf dem Plasmid lokalisierte Faktoren, die dem Nachweis von pYV dienen können, sind die Fähigkeit zur Autoagglutination (LAIRD u. CAVANAUGH 1980) und die Fähigkeit, die Farbstoffe Kongorot (PRPIC et al. 1983) oder Kristallviolett (BHADURI et al. 1987) zu binden. Auch der Calciumbedarf für das Wachstum (GEMSKI et al. 1980) und die von LACHICA und ZINK (1984) beschriebene Hydrophobizität sind Eigenschaften, die auf pYV kodiert sind. Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren sind zum Beispiel Invasin (Inv) und attachment-invasion-locus (ail). Beide Faktoren sind Adhäsine (MILLER u. FALKOW 1988) und unterstützen das Eindringen der Bakterien in die epitheliale Barriere durch die phagozytierenden M-Zellen des Darmepithels. Stämme des Biovars 1B der Spezies *Yersinia enterocolitica* besitzen einen weiteren chromosomalen Virulenzfaktor namens Yersiniabactin. Dabei handelt es sich um ein Siderophor, das die Eisenversorgung der Bakterien sicherstellt und daher die Pathogenität dieser Stämme erhöht (BOCKEMÜHL u. WONG 2003). Eventuell mitverantwortlich für die Pathogenese der akuten Enterokolitis durch *Yersinia enterocolitica* bei Kindern ist das chromosomal kodierte hitzestabile Enterotoxin Yst. Dieses Enterotoxin führte isoliert im Tierversuch mit jungen Kaninchen zu Enterokolitis (DELOR u. CORNELIS 1992). Nur pathogene *Yersinia-enterocolitica*-Stämme besitzen Yst (DELOR et al.

1990). Sowohl chromosomal als auch plasmoidal kodiert sind die von SCHIEMANN und DEVENISH (1984) beschriebene Fähigkeit zur Adhäsion an Zellkulturen und die Serumresistenz der virulenten Stämme (CHIESA u. BOTTONE 1983).

Im Laufe der Anzucht bei 37°C können die plasmidkodierten Pathogenitätsfaktoren humanpathogener Yersinien verloren gehen (BERCOVIER u. MOLLARET 1984).

Zur Differenzierung innerhalb der Spezies *Yersinia enterocolitica* erfolgt eine Einteilung in Serotypen und Biovare. WAUTERS et al. schlugen 1981 vor, Serotypen in der Spezies *Yersinia enterocolitica* zu bestimmen. 1984 folgte eine Erweiterung des Schemas durch ALEKSIC und BOCKEMÜHL. Die Zuordnung zu einem Serotyp erfolgt anhand der Antigeneigenschaften der Oberfläche (O), der Kapsel (K) und der Geißeln (H). Dementsprechend werden die Antigene (Ag) O-, K- und H-Ag genannt (NICOLET 1985). Aufgrund der O-Antigene erfolgt die Unterscheidung in 28 Serotypen (bezeichnet mit O:3, O:9 usw.) und anhand der H-Antigene in weitere 14 Serotypen (bezeichnet als a, b, c,...). ALEKSIC und BOCKEMÜHL (1990) kombinierten beide Einteilungen zur Differenzierung von weiteren Serotypen innerhalb eines O-Antigen-Serotyps.

Yersinia enterocolitica wird aufgrund biochemischer Reaktionen in 5 Biovare eingeteilt. Der erste Vorschlag kam 1969 von NILEHN. WAUTERS et al. (1987) ergänzten die für die Differenzierung durchgeführten Reaktionen und schlugen eine Erweiterung der bisherigen Biovareinteilung vor. Einige dieser Reaktionen, z.B. die Voges-Proskauer-Reaktion oder die Aktivitätsmessung der Pyrazinamidase, finden auch bei der Speziesdiagnostik Verwendung. Die Kriterien für die Biovarzugehörigkeit sind in Tabelle 2 dargestellt. Stämme des Biovars 1A zeigen variable Ergebnisse in der Prolinpeptidaseaktivität. Die weiteren Reaktionen fallen positiv aus. Vertreter des Biovars 1B dagegen können Äskulin und Salicin nicht verstoffwechseln. Stämme des Biovars 2 besitzen zusätzlich keine Lipasen und zeigen nur schwache Indolspaltung. Die Fähigkeit zur Indolspaltung ist bei Stämmen des Biovars 3 nicht vorhanden. Stämme, die zum Biovar 4 gerechnet werden, können außerdem keine Xylose verwerten. Innerhalb des Biovars 5 ist diese Reaktion variabel, und es findet keine Trehalosespaltung statt.

Tabelle 2: Biochemische Differenzierung der Biovare von *Yersinia enterocolitica*, nach WAUTERS et al. (1987)

Reaktion	Biovare					
	1A	1B	2	3	4	5
Lipase	+	+	-	-	-	-
Äskulin	+	-	-	-	-	-
Salizin	+	-	-	-	-	-
Indol	+	+	(+)	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	-	+/-
Trehalose	+	+	+	+	+	-
Pyrazinamidase	+	-	-	-	-	-
β-Glucuronidase	+	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	(+)
Prolinpeptidase	+/-	-	-	-	-	-

Alle Reaktionen werden bei 28°C mit einer Inkubationszeit von 48h durchgeführt; (+) = schwach positive Reaktion; + = positiv, >90% positiv; - = negativ, <10% positiv; +/- = variabel, 10-90% positiv

In Europa kommen von den humanpathogenen Biovaren vor allem die Biovare 2, 3 und 4 vor. Im Biovar 1A werden bisher apathogene Stämme und Saprophyten zusammengefasst. Vertreter dieses Biovars können aber opportunistische Infektionen hervorrufen. Die Apathogenität des Biovars 1A aufgrund der Abwesenheit des pYV-Virulenzplasmids wird derzeit diskutiert und untersucht (TENNANT et al. 2003). Tabelle 3 zeigt die geographische Verbreitung sowie die Wirte der verschiedenen Biovare. Beim Schwein dominiert in Europa das O-Antigen 3 mit den H-Antigenen a, b, c oder v des Biovars 4. Außerdem kommt bei dieser Tierart in Europa das O-Antigen 9 mit den H-Antigenen a oder b des Biovars 2 vor. Andere O-Antigene, wie O:8, werden in den USA oder Kanada isoliert (ALEKSIC u. BOCKEMÜHL 1990).

Tabelle 3: O- und H-Antigene, Biovarzugehörigkeit, Herkunft und Verbreitung humanpathogener *Yersinia-enterocolitica*-Stämme nach ALEKSIC u. BOCKEMÜHL (1990)

O-Antigen	H-Antigen	Biovar	Herkunft	Verbreitung
1, 2a, 3	a, b, c	3	Chinchilla	Europa, USA
2a, 2b, 3	b, c	5	Hase, Ziege, Kaninchen, Affe	Europa
3	a, b, c	4	Mensch, Schwein, Hund,	Europa, Südafrika, Kanada, Japan, USA, Australien
	a, b, c, v a, c		Ratte, Katze	
	c	4	Mensch, Schwein, Hühnerfleisch	Deutschland, Norwegen
4, 32	b, e, f, i	1B	Mensch, Lebensmittel	USA
5, 27	a, b, c	2 oder 3	Mensch, Hund, Affe, Milch	Deutschland, Niederlande
	b, c	2 oder 3	Milchprodukte, Oberflächenwasser	USA, Kanada, Australien, Japan
8	b, e, f, i b, e, f, i, v	1B	Mensch, Schwein, Milch, Wasser, Milchprodukte	USA, Kanada, Niederlande
9	a, b	2	Mensch, Schwein	Europa
	a, b, c	selten	Hund, Katze	Japan
	a, b, c, v	3	Ratte	
	a, c			
13a, 13b	a, b, i	1B	Mensch, Affe, Milch	USA
18	b, e, f, i	1B	Mensch	USA
20	b, e, f, i	1B	Mensch, Ratte, Hund	USA
21	b, e, f, i	1B	Mensch, Stamm 'Tacoma'	USA

2.4 Nachweismöglichkeiten für *Yersinia enterocolitica*

Für *Yersinia enterocolitica* existieren vielfältige verschiedene Nachweismethoden, die für unterschiedliche Probenmaterialien und Fragestellungen geeignet sind.

2.4.1 Bakteriologischer Nachweis

Für die Routinediagnostik ist der bakteriologische Nachweis von *Yersinia enterocolitica* bis heute die Standardmethode.

Als Untersuchungsmaterial vom Schwein eignen sich in erster Linie die Tonsillen, da schon kurze Zeit nach der Infektion der Erreger dort nachzuweisen ist und über Monate in den Tonsillen persistieren kann (THIBODEAU et al. 1999). Wird der Keim mit dem Kot ausgeschieden, ist auch dieser als Probenmaterial für die bakteriologische Diagnostik verwendbar. Die Ausscheidung erfolgt jedoch nicht kontinuierlich, daher ist *Yersinia enterocolitica* trotz Isolierung aus den Tonsillen nicht immer im Kot desselben Tieres nachweisbar (KAPPERUD 1991). Ein Nachweis des Erregers aus Darmteilen oder Lymphknoten ist ebenfalls möglich.

2.4.1.1 Anzucht und Identifizierung

In der Routinediagnostik kann man eine ausreichende Sensitivität für den Nachweis von *Yersinia enterocolitica* nur durch Kombination mehrerer Isolierungsverfahren oder durch selektive und nichtselektive Voranreicherungsschritte mit folgendem Ausstrich auf Selektivnährböden erreichen (ALDOVA et al. 1990).

Für *Yersinia enterocolitica* existiert eine Vielzahl von Untersuchungsschemata. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde der Versuch gemacht, mit einer einheitlichen Vorgabe ein allgemein verbindliches Verfahren für die Diagnostik von *Yersinia enterocolitica* aus Nahrungs- und Futtermitteln zu etablieren.

Das Ergebnis dieses Versuchs findet sich im internationalen Standard ISO 10273 „Microbiology“ von 1994 mit dem Titel „General guidance for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*“. In dem dort vorgegebenen Untersuchungsgang kommen zwei Voranreicherungsmethoden zum Einsatz. Das

Untersuchungsmaterial wird in Irgasan-Ticarillin-Kaliumchlorat-Bouillon (ITC-Bouillon) bei 25°C für 48h angereichert und anschließend auf Salmonella-Shigella-Agar mit Desoxycholat und Calcium (SSDC-Agar) ausgestrichen. Nach Inkubation bei 30°C für 24-48h werden fünf typische Kolonien (Kuhaugen- oder Spiegeleiform) auf Standard II Agar überimpft. Nach erneuter Inkubation bei 30°C für 24h folgen die biochemische Identifizierung und Pathogenitätstests. Die zweite Voranreicherung wird über 2-3 Tage in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) bei 22-25°C vorgenommen. Aus der PBS-Anreicherung wird einmal direkt und ein zweites Mal nach Behandlung mit Kalilauge auf je einen Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar (CIN-Agar) überimpft. Von den beiden CIN-Agarplatten werden ebenfalls je fünf typische Kolonien auf Standard II Agar überimpft und für die biochemische Identifizierung und Pathogenitätstests genutzt. Es handelt sich dabei um in der Durchführung arbeits- und zeitaufwendige Einzeltests (vgl. Tabelle 4); daher ist die Praktikabilität in der Routinediagnostik nicht gegeben. Als Methodensammlung ist das Standardverfahren gemäß ISO 10273 allerdings umfangreich und wertvoll.

Tabelle 4: Biochemische Reaktionen bei vermutlich pathogenen *Yersinia enterocolitica* gemäß ISO 10273

Test	Reaktion	Ergebnis
biochemische Verdachtstests	Urease	positiv
	Tryptophandesaminase	negativ
	Glucose	positiv
	Gasbildung aus Glucose	negativ
	Laktose	negativ
	Hydrogensulfit	negativ
	Oxidase	negativ
biochemische Bestätigungstests	Lysindecaboxylase	negativ
	Ornithindecaboxylase	positiv
	Saccharose	negativ
	Rhamnose	negativ
	Citrat	negativ
Pathogenitätstests	Salizin	negativ
	Äskulin	negativ
	Pyrazinamidase	negativ
	calciumabhängiges Wachstum bei 37°C	positiv

In der Routinediagnostik wird als *Yersinia-enterocolitica*-Selektivmedium meist der von SCHIEMANN (1979) entwickelte CIN-Agar genutzt. Zur Hemmung der Begleitflora dienen dabei zwei Antibiotika, zunächst Irgasan mit Wirkung auf gramnegative Keime, wie *Escherichia coli* oder *Proteus mirabilis*, und außerdem Cefsulidon gegen *Pseudomonas aeruginosa*. Yersinien fermentieren den im Nährboden enthaltenen Zucker Mannitol; aufgrund dessen sind die Kolonien durch den Indikator Neutralrot im Zentrum rot gefärbt. Im schräg auftreffenden Licht sehen die Kolonien feingranuliert aus und irisieren nicht. Differentialdiagnostisch zu beachten sind morphologisch ähnliche Kolonien von *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Proteus* und *Citrobacter* (DE BOER u. SELDMAN 1987).

Der SSDC-Agar wurde von WAUTERS (1973) als *Yersinia-enterocolitica*-Selektivmedium entwickelt. *Yersinia enterocolitica* toleriert Desoxycholat in einer Konzentration von bis zu 3%, so dass durch Zusatz von 1% Natriumdesoxycholat und Calcium zu Salmonella-Shigella-Agar die Selektivität für diesen Erreger erhöht werden konnte.

Der Direktausstrich auf die Selektivmedien ist möglich; allerdings ist die Ausbeute nach Anreicherung in einem Selektivmedium (z.B. ITC oder Luria-Bertani-Gallesalz-Irgasan-Bouillon (LB-BSI)) höher (WAUTERS et al. 1988a; HUSSEIN et al. 2001).

Für kontaminiertes Probenmaterial bietet sich die Behandlung mit 0,25% Kalilauge an, um die Begleitflora zu reduzieren (AULISIO et al. 1980; ALEKSIC u. BOCKEMÜHL 1990). Außerdem kann über die selektive Anreicherung in ITC-Bouillon oder im modifizierten Rappaportmedium (mit Zusatz von Carbencillin) auch bei hoher Keimbelastung die Anzucht von *Yersinia* ermöglicht werden (WAUTERS et al. 1988a; ALEKSIC u. BOCKEMÜHL 1990).

Eine Unterscheidung in pathogene und apathogene Stämme kann anhand der Kulturmorphologie mit dem Virulent-*Yersinia-enterocolitica*-Agarmedium (VYE) vorgenommen werden. Nach Anzucht bei 32°C für 24-48 h bilden durch den Zusatz von Josamycin, Oleandomycin und Äskulin pathogene Stämme rote und apathogene Stämme aufgrund der Äskulinspaltung dunkle Kolonien (FUKUSHIMA 1987).

Eine Methode zur Detektion von virulenten Stämmen der *Yersinia-enterocolitica*-Serotypen O:3, O:8, O:5,27, O:13 und O:21 beschrieben BHADURI et al. (1997). Die Autoren führten eine Voranreicherung bei 12°C in mit Hefeextrakt, Gallelsalz und Irgasan angereicherter Trypticase-Soja-Bouillon durch. Es schlossen sich die Anzucht auf einem Selektivmedium und Identifizierung der Keime an. Diese Methode umfasste jedoch nicht den in Europa vorkommenden Serotyp O:9.

Die Kälteanreicherung, durchgeführt für drei bis vier Wochen bei 4°C in PBS mit wöchentlichem Ausstrich auf CIN-Agar, eignet sich für die Kotprobendiagnostik weniger, da die apathogenen Isolate von *Yersinia enterocolitica* die pathogenen Stämme meist überwuchern (VAN NOYEN et al. 1980). Bei Patienten ohne klinische Symptome führt eventuell nur die Kälteanreicherung über mehrere Wochen zur Isolierung von *Yersinia enterocolitica*, so dass man in der Hygieneüberwachung oder bei epidemiologischen Untersuchungen nicht darauf verzichten sollte (ALDOVA et al. 1990). In der Untersuchung von HUSSEIN et al. (2001) lag die Nachweisrate mit dieser Methode bei Patienten ohne klinische Zeichen einer Infektion bei 52%. Auch in der Diagnostik aus Tonsillenmaterial des Schweins erzielten ATANASSOVA et al. (2003) mit der Kälteanreicherung bessere Ergebnisse als mit der Warmanreicherung.

2.4.1.2 Serotypisierung

Die Zuordnung zu einem Serotyp von *Yersinia enterocolitica* erfolgt über eine Agglutinationsreaktion von serotypspezifischen Antikörpern mit der Bakterienoberfläche. Diese Typisierung wird auf einem Objektträger durchgeführt. Bei Raumtemperatur ist die Reaktion am deutlichsten, da die O-Antigene nicht durch Adhäsinfibrillen verdeckt sind (HEESEMAN 1990). Durch die Bestimmung der Serogruppe kann nicht auf die Pathogenität des Isolates geschlossen werden (ALEKSIC u. BOCKEMÜHL 1990). Allerdings ist mit dem Nachweis von Antigen der Gruppe O:3, O:5,27, O:9 oder O:8 die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass es sich um eine pathogene Spezies handelt.

2.4.1.3 Biochemische Pathogenitätstests

Die pathogenen Eigenschaften von *Yersinia enterocolitica* werden sowohl chromosomal als auch plasmidkodiert. Im Rahmen der bakteriologischen Untersuchung wird die Pathogenität eines Stammes mit Hilfe der Durchführung verschiedener biochemischer Reaktionen festgestellt. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss bedacht werden, dass virulenzplasmidkodierte Faktoren im Zuge der Kultivierung verloren gehen können (ZINK et al. 1980; SCHIEMANN 1989).

Der Autoagglutinationstest in Voges-Proskauer-Medium mit Methylrot dient dem Nachweis des Adhäsionsfaktors *yadA*. Dieser ist plasmidkodiert und bei pathogenen Stämmen verantwortlich für die Autoagglutination nach Inkubation bei Raumtemperatur und bei 37°C (SCHIEMANN u. DEVENISH 1982; LAIRD u. CAVANAUGH 1980). Virulente Stämme zeigen außerdem calciumabhängiges Wachstum bei 37°C (GEMSKI et al. 1980) und Bindung der Farbstoffe Kongorot (PRPIC et al. 1983) und Kristallviolett (BHADURI et al. 1987) während des Wachstums. Die Kolonien sind dementsprechend gefärbt. Die Hydrophobizität (LACHICA u. ZINK 1984; SCHIEMANN u. SWANZ 1985) und die Induzierbarkeit der Yop-Sekretion (HEESEMAN et al. 1986) sind ebenfalls plasmidkodierte Pathogenitätsmerkmale. Ein weiteres Pathogenitätsmerkmal ist die Expression des chromosomal kodierten hitzestabilen Enterotoxins (PAI u. MORS 1978). Sowohl im Genom als auch auf Plasmiden verankert ist die Serumresistenz (CHIESA u. BOTTONE 1983) der virulenten Stämme.

Apathogene Stämme können, chromosomal bedingt, Äskulin hydrolysieren und Salizin fermentieren (SCHIEMANN u. DEVENISH 1982). Zusätzlich zeigen sie Pyrazinamidaseaktivität (KANDOLO u. WAUTERS 1985).

Aufgrund des Ergebnisses eines einzigen Tests kann keine Aussage hinsichtlich der Pathogenität getroffen werden. Erst die Kombination verschiedener Untersuchungen ermöglicht eine Abschätzung der Virulenz. Die Eignung der Tests wurde in den Studien von PRPIC et al. (1985) und von KWAGA und IVERSEN (1992) überprüft. Beide Arbeitsgruppen stellten fest, dass die Fähigkeit zur Bindung von Kongorot oder Kristallviolett, das calciumabhängige Wachstum sowie die Fähigkeit zur

Autoagglutination bereits relativ verlässliche Hinweise auf das Vorliegen von pathogenen Stämmen geben. KWAGA und IVERSEN untersuchten zusätzlich die Fähigkeit zur Invasion von Zellen in der Zellkultur und konnten anhand der Ergebnisse die sicherste Aussage mit einem Einzeltest bezüglich der Pathogenität treffen.

Nach den Ergebnissen einer neueren Untersuchung von CIEBIN et al. (2003) über die fehlende Fähigkeit der D-Arabitolverwertung der pathogenen Stämme eignet sich dieses Kriterium unter Umständen, um mit nur einer weiterführenden Untersuchung eine Aussage über die Pathogenität eines Isolates zu machen.

2.4.2 Diagnostik mittels PCR

Die DNA-Amplifikation dient einer sichereren Speziesdiagnose bei *Yersinia enterocolitica*-Isolaten. Dabei ist das Ziel der PCR-Untersuchung nicht nur der Nachweis der Spezies, sondern auch die Pathogenitätsprüfung durch Detektion der Gene für bestimmte Virulenzfaktoren (plasmid- oder chromosomal kodiert). Für die Pathogenitätsbestimmung mittels biochemischer Untersuchung (vgl. Abschnitt 2.4.1.3) müssen stets mehrere Reaktionen für ein sicheres Ergebnis durchgeführt werden. Im Gegensatz dazu kann in der PCR aufgrund des direkten Nachweises der Virulenzgene die Amplifikation nur eines Zielgens den Pathogenitätsnachweis erbringen. Nach NEUBAUER (2001) können als Untersuchungsmaterial entweder Reinkulturen aus der Anzucht oder Kot- oder Fleischproben dienen. Methoden, die direkt aus dem Probenmaterial durchgeführt werden können, bieten den Vorteil, dass ein möglicher Verlust des Virulenzplasmids während der Anzucht von *Yersinia enterocolitica* vermieden wird. JOHANNESSEN et al. (2000) zeigten, dass die PCR achtmal häufiger als die bakteriologische Untersuchung *Yersinia enterocolitica* in Schweinefleischproben nachwies und somit die PCR die höhere Sensitivität besitzt. Es existieren PCR-Verfahren, die ein einzelnes Gen als Zielgen haben oder die Kombinationen verschiedener Gene in Multiplex-PCR-Untersuchungen analysieren (vgl. Tab. 5).

Tabelle 5: Übersicht über PCR-Methoden zur Identifizierung und Pathogenitätsprüfung und über die Virulenzgene von *Yersinia enterocolitica*, erweitert nach BOCKEMÜHL u. WONG (2003) und NEUBAUER (2001)

PCR-Methode	Gen	Genprodukt	Funktion	Diagnost. Nutzen	Referenz
einfache PCR	yopT°	YopT	cytotoxisch für Makrophagen	PCR zur Detektion pathogener Stämme	ARNOLD et al. (2001)
	yadA°	Membranprotein	Adhäsion	PCR zur Detektion pathogener Stämme, Autoagglutinationstest	LAIRD u. CAVANAUGH (1980); KAPPERUD et al. (1993)
	virF°	VirF Protein	aktiviert Transkription für Yop-Expression	PCR zur Detektion pathogener Stämme	WREN u. TABAQCHALI (1990); KWAGA et al. (1992)
	invA*	Invasin	Adhäsion	PCR zur Detektion pathogener Stämme	RASMUSSEN et al. (1994)
	yst*	hitzestabiles Enterotoxin	Enterotoxin	PCR, yst ist spezifisch für <i>Yersinia enterocolitica</i>	DURISIN et al. (1998)
	ail*	Attachment-invasion-locus Protein	Adhäsion	PCR zur Detektion pathogener Stämme	FENWICK u. MURRAY (1991); JOURDAN et al. (2000)
Multiplex-PCR	virF°, ail*	VirF Protein, ail-Protein	aktiviert Transkription für Yop-Expression, Adhäsion	PCR zur Detektion pathogener Stämme	NAKAJIMA et al. (1992); FENG et al. (1992); NILSSON et al. 1998
	virF°, ail*, yst*	VirF Protein, ail-Protein, hitzestabiles Enterotoxin	aktiviert Transkription für Yop-Expression, Adhäsion, Enterotoxin	PCR zur Detektion pathogener Stämme, yst ist <i>Y. enterocolitica</i> spezifisch	HARNETT et al. (1996)

° = Gen liegt auf dem Virulenzplasmid; * = Gen liegt auf dem Chromosom

Die Expression der verschiedenen Gene ist von der Anzuchttemperatur abhängig. Bei 28°C wird beispielsweise das Gen *invA* verstärkt exprimiert; bei 37°C sind es *ail*, *yadA* und die *yop*-Gene (BOTTONNE 1999). Die drei letztgenannten Gene liefern Produkte, die bedeutend für die Adhäsionsfähigkeit der Erreger im warmblütigen Wirtsorganismus sind (*ail* und *yadA*) oder zusätzlichen Schutz vor Phagozytose durch körpereigene Makrophagen bieten (*yop*).

2.4.2.1 Detektion plasmidkodierter Gene

Zur Detektion pathogener *Yersinia-enterocolitica*-Stämme eignet sich der Nachweis von *virF* (WREN u. TABAQCHALI 1990) oder *yadA* (KAPPERUD et al. 1993). Eine *virF*-spezifische PCR erfasst allerdings nicht alle pathogenen Isolate, da dieses Gen nicht in allen pathogenen Stämmen vorhanden ist. Die Nachweisgrenze lag bei der von WREN und TABAQCHALI beschriebenen Methode bei 50 koloniebildenden Einheiten (kbE)/ml Reinkultursuspension; KAPPERUD et al. wiesen bei der Durchführung ihrer PCR ohne Voranreicherung der Fleischproben noch Zahlen von 10-30 kbE/g Fleisch nach. Mit Voranreicherung lag die Nachweisgrenze bei 2 kbE/g Fleisch. Eine hochspezifische One-step-PCR, die zugleich als Pathogenitätsnachweis dienen kann, wurde von ARNOLD et al. (2001) entwickelt. Bei dieser Methode wurde das Gen *yopT* detektiert. Die PCR eignete sich für Kot und Organmaterialien bzw. Lymphknoten und wies nach Voranreicherung eine Sensitivität von 10^2 Keimen/g Kot auf.

Zu beachten ist bei dem Nachweis plasmidkodierter Gene der mögliche Verlust des Plasmids während der Kultivierung. Es bietet sich daher eher der Nachweis einer Kombination aus chromosomal- und plasmidkodierten Genen an (vgl. Abschnitt 2.4.2.3).

2.4.2.2 Detektion chromosomalkodierter Gene

Das *ail*-Gen ist bisher nur bei pathogenen *Yersinia-enterocolitica*-Isolaten gefunden worden. Somit ist sein Nachweis nicht nur ein Diagnostikum für die Spezies sondern auch ein Pathogenitätsnachweis (KWAGA et al. 1992). NILSSON et al. (1998) konnten mit Hilfe des *ail*-Gens noch eine Anzahl von 10^2 *Yersinia enterocolitica* in

10^5 - 10^6 Bakterien anderer Spezies bzw. Gattungen identifizieren. JOURDAN et al. (2000) erreichten nach einer Voranreicherung über 24h bei der Detektion von *ail* eine Nachweisgrenze von 1 kbE/ml Voranreicherungsbouillon in Kotproben.

Ein funktionsfähiges *invA*-Gen besitzen nach Untersuchungen von CARNIEL (1995) nur enteropathogene *Yersinia enterocolitica*. NAKAJIMA et al. (1992) nutzten *invA* zur Speziesdiagnostik. Die Differenzierung zwischen pathogenen und apathogenen *Yersinia enterocolitica* anhand von *invA* beschrieben RASMUSSEN et al. (1994). Die Autoren erreichten eine Nachweisgrenze von 10 Keimen pro PCR-Ansatz.

Die Speziesdiagnose kann außerdem mittels Untersuchung des 16S rRNA-Gens durchgeführt werden. Es ergeben sich für *Yersinia enterocolitica* zwei Cluster (IBRAHIM 1995). Diese Cluster entsprechen der Einteilung in Stämme, die vorwiegend entweder in Europa oder Nordamerika vorkommen. NEUBAUER et al. (2000a) regten aus diesem Grund die Unterteilung der Spezies *Yersinia enterocolitica* in zwei Subspezies an (vgl. auch Abschnitt 2.1).

2.4.2.3 Kombinierte Detektion chromosomal- und plasmidkodierter Gene

Zur Vermeidung falsch negativer Ergebnisse nach anzuchtbedingtem Verlust des plasmidgebundenen Virulenzgens bietet sich die Kombination des Nachweises von Genen, wie zum Beispiel *ail* und *yadA*, an (BLAIS u. PHILLIPE 1995). Die Autoren unterschieden so pathogene *Yersinia-enterocolitica*-Stämme von apathogenen Stämmen. Eine andere Möglichkeit des kombinierten Nachweises ist die gleichzeitige Detektion von *ail*, *yst* und *virF* in einer Multiplex-PCR. Diese eignet sich nach HARNETT et al. (1996) für verschiedenste Probenmaterialien und erreicht eine Nachweisgrenze von 5-10 kbE/ml Bakteriensuspension. FENG et al. (1992) wiesen *virF* und *ail* in einer Multiplex-PCR nach. Als Probenmaterial diente Blut, so dass auch das Vorliegen einer Bakteriämie mit dieser PCR überprüft werden kann. Die Nachweisgrenze der Methode lag bei 500 Keimen/100µl Blut.

Die PCR ist gemäß den bisher in der Literatur beschriebenen Protokollen als alleiniges Diagnostikum jedoch nicht einsetzbar (NEUBAUER et al. 2001). Im Gegensatz zu der Multiplex-PCR ist im Allgemeinen für die Durchführung der PCR

die Anzucht der Erreger notwendig, da das Ausgangsmaterial meistens die Reinkultur ist.

2.4.3 Serologischer Nachweis

Der Nachweis einer zurückliegenden oder bestehenden Infektion mit *Yersinia enterocolitica* kann über die Detektion von Antikörpern gegen die Yops in Testverfahren, wie dem Immunoblot oder dem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), erfolgen. Außerdem ist es möglich, mittels markierter Antikörper Antigene von *Yersinia enterocolitica* zu detektieren. Ein mögliches Testverfahren dazu ist der Immunfluoreszenztest.

2.4.3.1 Antikörpernachweis

Der serologische Nachweis einer Yersiniose beim Patienten wird in der Humanmedizin mit dem Immunoblot auf der Basis von *Yersinia*-outer-proteins (Yops) bzw. von sog. „released proteins“ geführt. Detektiert werden im Yop-Immunoblot die Antikörperisotypen IgG oder IgA in Patientenserum. Dabei weist der Immunoblot mit plasmidkodierten Antigenen eine deutlich höhere Spezifität und Sensitivität auf als z.B. der Widal-Agglutinationstest, der dem Nachweis von Brucellose dient und Kreuzreaktionen mit *Yersinia enterocolitica* O:9 zeigt (HEESEMANN et al. 1987; HEESEMANN u. KARCH 1995).

Trotz länger zurückliegender Erstinfektion können erhöhte Konzentrationen von spezifischen Antikörpern (IgG, IgA, IgM) auftreten, die die Interpretation der Ergebnisse erschweren. HOOGKAMP-KORSTANJE et al. (1992) vermuteten, dass diese erhöhten Konzentrationen auf der bakteriellen Besiedlung von Geweben mit langer Lebensdauer basieren. Ein solches Gewebe ist z.B. das Gut Associated Lymphoid Tissue (GALT).

Auch für die Diagnostik der Yersiniose bei Nutztieren findet der Immunoblot Verwendung. Erfolgreich eingesetzt wurde er bei Schafen mit experimenteller Yersiniose (ROBINS-BROWNE et al. 1993). Der Immunoblot dient außerdem der Aufdeckung von falsch positiven Ergebnissen der Komplement-Bindungs-Reaktion

(KBR) in der Brucellosediagnostik bei Nutztieren. Antikörper gegen *Yersinia enterocolitica* Serotyp O:9 zeigen Kreuzreaktionen mit dem in der KBR verwendeten Brucellenantigen.

NIELSEN et al. (1995) beschrieben einen ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *Yersinia-enterocolitica*-O:3-spezifisches Lipopolysaccharid (LPS). Die Autoren konnten in einer späteren Untersuchung mit diesem Test den Verlauf der Antikörperbildung gegen den Serotyp O:3 nach experimenteller Infektion verfolgen (NIELSEN et al. 1996a). Mit dem ELISA nach THIBODEAU et al. (2001) können Antikörper gegen LPS der in Europa wichtigsten Serotypen (O:3, O:9 und O:5, 27) gleichzeitig detektiert werden. Die Autoren empfahlen, aufgrund der nach ihren Angaben relativ niedrigen Sensitivität eine größere Probenzahl pro Bestand zu untersuchen. Den genauen Wert für die Sensitivität gaben THIBODEAU et al. nicht an. Für die Einzeltierdiagnostik ist dieser ELISA weniger geeignet.

Im ELISA zum Nachweis der Brucellose des Rindes kommt es, der Immunoblot-Untersuchung entsprechend, mit O:9 zu Kreuzreaktionen (LIMET et al. 1988).

2.4.3.2 Antigennachweis

LI et al. (1992) beschrieben einen Immunoblot zur Diagnostik von *Yersinia enterocolitica* O:3 aus Reinkulturen mittels monoklonaler Antikörper. Als Probenmaterial für die Anzucht dienten aufbereitete Kotproben.

Die indirekte Immunfluoreszenztechnik kann für die Diagnose von *Yersinia-enterocolitica*-Infektionen durch direkte Untersuchung von Probenmaterial, wie Lymphknoten, Biopäten aus Darm oder Haut und Eiter, verwendet werden. Die zu erreichende Sensitivität ist mit der indirekten Methode höher als mit der direkten (KARLSSON et al. 1973). Verschiedene Autoren ermittelten eine hohe Spezifität und konnten auch Serotypbestimmungen per Immunfluoreszenz durchführen, wobei die eingesetzten polyklonalen Antikörper insbesondere in niedriger Verdünnung Kreuzreaktionen zwischen den Serotypen aufwiesen (HOOGKAMP-KORSTANJE et al. 1986; DE KONING et al. 1989). Bei polyklonalen Antikörpern, die nicht mit anderen Serotypen agglutiniert wurden, erschweren die Kreuzreaktionen die Beurteilung des Tests (KARLSSON et al. 1973).

Mit monoklonalen Antikörpern ist die indirekte Immunfluoreszenzuntersuchung auch an Reinkulturen nach deren Ausstrich auf Objektträger möglich (LI et al. 1992). SHERIDAN et al (1998) gelang es, Kulturmateriale von *Yersinia enterocolitica* an eine Polycarbonatmembran zu binden und anschließend per Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörpern nachzuweisen.

SCHMIDT und SETHI (1987) berichteten von sieben monoklonalen Antikörpern, die mittels Hybridoma-Technik produziert wurden. Sie waren gegen verschiedene Serotypen von *Yersinia enterocolitica* gerichtet. Diese Antikörper wurden in der Immunfluoreszenz an Kulturmateriale getestet und zeichneten sich auch durch fehlende Kreuzreaktivität mit zahlreichen anderen Bakterienspezies bzw. Serotypen aus. Getestet wurden *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Campylobacter sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Salmonella Paratyphus*, *Salmonella Typhi*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia aldovae*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia pseudotuberculosis* sowie *Yersinia enterocolitica* Serogruppe O:4 bis O:24. Die Autoren regten eine Verwendung dieser hochspezifischen Antikörper zum Nachweis von pathogenen *Yersinia enterocolitica* in klinischem Material oder Lebensmitteln an.

2.5 Infektion und Krankheitsbild beim Menschen

Der Mensch infiziert sich vor allem durch orale Aufnahme mit *Yersinia enterocolitica*. Seltener kommt es bei Bluttransfusionen zur Infektion (STENHOUSE u. MILNER 1982). Infektionsquellen können kontaminiertes Wasser (KEET 1974), Milch (SAUER 1996) oder auch rohes Schweinefleisch bzw. Innereien vom Schwein sein. Auch Sojasprossen können den Erreger beherbergen (BOTTONNE 1997). In Ausnahmefällen ist die direkte Übertragung von Mensch zu Mensch, zum Beispiel in Kindergärten, Schulen oder Krankenhäusern, möglich (BOCKEMÜHL u. WONG 2003).

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass Schweinefleisch und Schweinefleischprodukte aus dem Handel eine wichtige Infektionsquelle für den

Menschen sein können (KAPPERUD et al. 1991; OSTROFF et al. 1994; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a). Neben dem Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln konnte in den USA eine Beziehung zwischen dem Beiwohnen der Zubereitung von Schweinekutteln und der Erkrankung an *Yersinia enterocolitica* bei Kleinkindern unter einem Jahr nachgewiesen werden (JONES 2003). Aufgrund einer hohen Toleranz gegenüber Kälte und Hitze konnte der Erreger sowohl nach Gefrieren bei -18°C (GUNSEN 2003) als auch in gekochtem Schweinefleisch (LOGUE et al. 1996) noch nachgewiesen werden.

Infektionen mit *Yersinia enterocolitica* rufen als Hauptsymptom beim Menschen eine akute Enteritis mit wässrigem bis blutigem Durchfall hervor. Blutige Diarrhoe tritt in erster Linie bei Erwachsenen und seltener bei Kindern auf. Meist sind diese Symptome von Fieber, Erbrechen und abdominalem Schmerz begleitet. Weitere Erscheinungen der intestinalen Yersiniose können terminale Ileitis, mesenteriale Lymphadenitis mit Pseudoappendizitis und Septikämie sein. Zur Septikämie kommt es meist nur bei Patienten, die aufgrund einer anderen schweren Erkrankung Vorschädigungen aufweisen. Als Folge der Erregerausbreitung im gesamten Organismus sind fokale Abszesse in Leber und Milz, Pneumonie, septische Arthritis, Meningitis, Endokarditis und Osteomyelitis beschrieben worden (BOTTONE 1997; BECKER 2002). Sonderfälle sind Septikämien in Verbindung mit Erkrankungen, die aufgrund von hämolytischer Anämie zu einem erhöhten Eisenspiegel im Blut führen, wie zum Beispiel Thalassämie, Sichelzellanämie und aplastische Anämie. *Yersinia*-Stämme, die über das Siderophor Yersiniabactin verfügen, können das Eisen nutzen; daher begünstigt der erhöhte Eisengehalt des Blutes ihr Wachstum (HEESEMANN et al. 1993). Stämme ohne Yersiniabactin, wie zum Beispiel die Serotypen O:3 und O:9, können therapeutisch an Patienten mit Eisenüberschuss im Blut verabreichtes Deferrioxamin als Siderophor nutzen und dann ebenfalls gute Wachstumsbedingungen finden (CHIU et al. 1986). Als postinfektiöse Komplikationen können in allen Altersgruppen immunvermittelte extraintestinale Erkrankungen, wie Reaktive Arthritis, Erythema nodosum, Uveitis und Thyreoiditis, auftreten (NEUBAUER et al. 2001). Ein möglicher Grund für das Entstehen von Arthritiden und Thyreoiditiden

kann die Ähnlichkeit zwischen den *Yersinia*-Antigenen und den körpereigenen Oberflächenstrukturen in den Gelenken und der Schilddrüse sein. So werden im Rahmen der Immunabwehr mit dem körpereigenen Gewebe kreuzreagierende Antikörper gebildet (TOIVANEN u. TOIVANEN 1994). Diese Folgekrankheiten haben in der Regel eine gute Prognose, können aber über Jahre bestehen bleiben (BOCKEMÜHL u. WONG 2003).

Die intestinale Yersiniose dauert bei Erwachsenen etwa 1-2 Wochen, bei Kindern kann sie bis zu 4 Wochen anhalten (BOTTONNE 1997). Klinische Erscheinungen treten vor allem bei Kindern auf (VERHAEGEN et al. 1998).

Der indirekte oder direkte Nachweis von *Yersinia enterocolitica* mit Hinweis auf eine akute Infektion ist nach § 7 IfSG vom 20.07.2000 meldepflichtig.

Einen tabellarischen Überblick über die möglichen Erkrankungen des Menschen durch *Yersinia enterocolitica* gibt Tabelle 6.

Yersinia enterocolitica zeigt eine Affinität zu Lymphgewebe und dringt durch die M-Zellen der Peyerschen Platten in die Darmwand ein, um von der basolateralen Seite in die Zellen des Darmepithels zu gelangen. Die Erreger entgehen mit Hilfe der Sekretion von Yops der Phagozytose, da die Yops verschiedene Effektormechanismen der Makrophagen auf zellulärer Ebene unterbinden. Beispielsweise verhindern sie die Aktivierung des oxidatory-burst-Mechanismus, hemmen die TNF- α -Produktion der Makrophagen und leiten die Apoptose der Makrophagen ein. Somit können die Yersinien durch die Yops der körpereigenen Abwehr entgehen und sich in den Lymphknoten vermehren. Die Immunantwort und Entzündung verursachen Schmerzen in der Unterbauchregion, die als Symptome für Appendizitis missgedeutet werden können (Pseudoappendizitis) (RUCKDESCHEL 2002; BOCKEMÜHL u. WONG 2003).

Der Nachweis von andauernd hohen Spiegeln an *Yersinia*-spezifischen IgA im Serum lässt die Vermutung zu, dass die Erreger im Körper persistieren. Nach DE KONING et al. (1989) und GRANFORS et al. (1998) besiedelt *Yersinia* beim Menschen wahrscheinlich die intestinalen Lymphknoten oder die Darmschleimhaut.

Im Gegensatz dazu persistieren die Erreger beim Schwein in erster Linie in den Tonsillen (KAPPERUD 1991) (vgl. Abschnitt 2.4.1).

Tabelle 6: Übersicht über die Erkrankungen des Menschen durch *Yersinia enterocolitica*, modifiziert nach BOTTONE (1999)

Infektionsart	Manifestation
Gastrointestinale Infektion	Enterocolitis: vor allem kleine Kinder, evt. begleitende Bakteriämie
	Pseudoappendizitis: Kinder unter 5 Jahren, Erwachsene
	Akute mesenteriale Lymphadenitis
	Terminale Ileitis
Septikämie	Immunsuppressive Personen, bei Eisenüberschuß bzw. Deferrioxaminbehandlung
	Transfusionsassoziiert (führt meist zu septischem Schock)
Metastatische Infektion	Abszesse: Leber, Niere, Milz, Lunge
	Hauterkrankung: pustulöse oder bullöse Läsionen
	Pneumonie
	Meningitis
	Panophthalmitis
	Endocarditis
Folgeerkrankungen nach Infektion	Osteomyelitis
	Arthritis
	Myocarditis
	Glomerulonephritis
	Erythema nodosum
	Thyreoiditis

2.6 Infektion und Krankheitsbild beim Tier

Die Infektion mit *Yersinia enterocolitica* ist bei vielen Tierarten nachgewiesen worden. In der Regel handelt es sich allerdings um subklinische Infektionen. Kommt es zu einer klinischen Erkrankung, so ist diese zunächst im Darmtrakt lokalisiert; in selteneren Fällen kann auch eine Allgemeininfektion vorliegen. Die direkte Übertragung des Erregers auf den Menschen ist von vielen Tierarten noch ungeklärt. Humanpathogene Serotypen sind bei verschiedenen Arten isoliert worden (BOTTONE 1997).

2.6.1 Infektion des Schweines

Das Schwein gilt im Allgemeinen als symptomloser Träger von *Yersinia enterocolitica*. In Ausnahmen sind klinische Yersiniosen bei Jungtieren festzustellen.

2.6.1.1 Experimentelle Infektion des Schweines

Die Untersuchung der Pathogenität von humanpathogenen *Yersinia-enterocolitica*-Serotypen für das Schwein ergab, dass bei experimenteller oraler Infektion nur der Serotyp O:3 klinische Symptome einer Yersiniose (länger anhaltender Durchfall, erhöhte Körpertemperatur, beeinträchtigtes Allgemeinbefinden und geringere tägliche Gewichtszunahme) hervorrief. Bei diesen Tieren konnte der Erreger aufgrund von Invasion und Kolonisation auch außerhalb des Darmtraktes nachgewiesen werden. Vergleichend wurden die Reaktionen auf die Infektion mit den Serotypen O:5, O:6, O:7, O:8 und O:9 und mit *Yersinia pseudotuberculosis* untersucht (BURGER et al. 2004).

TZIPORI et al. (1987) infizierten gnotobiotische Ferkel mit einem enteroinvasiven pathogenen *Yersinia-enterocolitica*-Stamm der Serogruppe O:3, der das hitzestabile Enterotoxin bildete. Diese experimentelle Infektion führte bei 30% der Tiere zu Enteritiden oder Enterokolitiden und zu Mikroabszessen in der intestinalen Lamina propria. Symptomatisch konnten Anorexie und Diarrhoe beobachtet werden. 20% der Tiere verendeten (TZIPORI et al. 1987).

Auch Meningoencephalitiden und nekrotisierende Tonsillitiden sind nach oraler Infektion von Ferkeln mit *Yersinia enterocolitica* O:3 beschrieben worden (NAJDENSKI et al. 1996; NAJDENSKI et al. 1998). Bei Sauen berichteten NATTERMANN et al. (1986) von *Yersinia-enterocolitica*-bedingten Fruchtbarkeitsstörungen und Aborten nach experimenteller Infektion. Eine Auskunft über den eingesetzten Serotyp geben die Autoren nicht.

In einer weiteren Untersuchung an Schweinen nach oraler experimenteller Infektion mit dem Serotyp O:3 konnte festgestellt werden, dass ab dem 19. Tag post infectionem (p. inf.) alle Tiere Antikörper gebildet hatten und diese auch bis zum Tag der Tötung (70 Tage p. inf.) nachweisbar waren. Bei der Sektion der Tiere war eine

Isolierung der Erreger nur aus den Tonsillen möglich; die kulturelle Untersuchung des Darmtraktes mit den assoziierten Lymphknoten verlief negativ (NIELSEN et al. 1996a). Nach oraler Infektion mit dem Serotyp O:3 konnten THIBODEAU et al. (1999) innerhalb von drei Stunden den Erreger bei 40% der Tiere auch extraintestinal in Leber und Milz nachweisen. Es handelte sich dabei um eine transiente Bakteriämie.

2.6.1.2 Natürliche Infektion des Schweines

Auch nach natürlicher Infektion mit *Yersinia enterocolitica* können beim Schwein klinische Erkrankungen sowie bei der Sektion oder Schlachtung feststellbare Veränderungen auftreten, wie sie nach experimenteller Infektion beschrieben worden sind.

Bei klinisch unauffälligen Schlachtschweinen stellten SHIOZAWA et al. (1991) Tonsillitiden mit Mikroabszessen fest. Bei Ferkeln eines *Yersinia-enterocolitica*-O:3-positiven Bestandes beschrieben NATTERMANN et al. (1985; 1986) katarrhalische Enteritiden, Serositiden, Arthritiden, Epiphysiolysis und Pneumonie. Außerdem waren erhöhte Verluste und geringere Leistung zu verzeichnen.

WINGSTRAND et al. (1996) untersuchten in infizierten geschlossenen Beständen das Ausscheidungsmuster und die Ausbildung von Antikörpern in verschiedenen Altersstufen. Bei Altsauen und Saugferkeln war *Yersinia enterocolitica* O:3 bakteriologisch nicht nachweisbar. Jungsauen und Mastschweine nach dem Absetzen wiesen dagegen den Erreger im Kot auf. Bei Absetzferkeln waren per ELISA keine Antikörper gegen *Yersinia enterocolitica* O:3 detektierbar. Saugferkel wurden serologisch nicht untersucht, in allen anderen Altersgruppen konnte eine Serokonversion nachgewiesen werden.

2.6.2 Infektion des Rindes

Bei Infektionen des Rindes mit *Yersinia enterocolitica* kann der Erreger mit dem Kot ausgeschieden und in diesem auch nachgewiesen werden. Klinische Symptome, wie Diarrhoe, treten selten auf. Mögliche Komplikationen bei der Infektion sind Mastitis,

mesenteriale Lymphadenitis, Aborte und Endokarditiden (MOLLARET et al. 1979; NATTERMANN et al. 1986).

Beim Rind treten meist pathogene Stämme vom Serotyp O:9 Biovar 2 oder 3 auf (MOLLARET et al. 1979; ALEKSIC u. BOCKEMÜHL 1996; GOURDON et al. 1999). In Frankreich ist seit dem Jahr 1990 in Rinderbeständen eine Zunahme der Infektionen mit dem Serotyp O:9 zu verzeichnen (GOURDON et al. 1999). Auch in Deutschland wird der Erreger regelmäßig nachgewiesen (HARTUNG 2000).

In Frankreich und Belgien wurden bei 10% der untersuchten Tiere Antikörper gegen *Yersinia enterocolitica* nachgewiesen (WEYNANTS et al. 1996). In Untersuchungen in Neuseeland, Australien und der ehemaligen DDR befanden sich in bis zu 50% der beprobten Bestände Tiere, die für *Yersinia enterocolitica* seropositiv waren (NATTERMANN et al. 1986; KITTELBERGER et al. 1995).

In einem Infektionsversuch mit *Yersinia enterocolitica* Serotyp O:9 bei Färsen zeigte kein Tier klinische Symptome. Einige Individuen der Herde schieden jedoch über lange Zeit *Yersinia enterocolitica* mit dem Kot aus und waren vermutlich für die Aufrechterhaltung der Durchseuchung des Bestandes verantwortlich. Im Gegensatz zu diesen hochempfindlichen Tieren bildeten Einzeltiere eine Infektionsresistenz aus. Bei der Schlachtung dieser Tiere konnte der Erreger aus keinem Organ isoliert werden. Die intestinalen Lymphknoten wiesen lediglich Hyperplasie auf (GARIN-BASTUJI et al. 1999).

2.6.3 Infektion bei Schaf und Ziege

In Europa findet man bei kleinen Wiederkäuern hauptsächlich die tierpathogenen Serovare O:2a, 2b, 3b Biovar 5. In Deutschland wurden klinische Ausbrüche bei Schafen und Ziegen nur selten bekannt (WUTHE u. ALEKSIC 1997). In einem Vergleich der bei Mensch und Tier isolierten Biotypen in Großbritannien wiesen McNALLY et al. (2004) bei 35% der untersuchten Schafe den Biotyp 3 Serotyp O:5,27 nach. Der Serotyp O:5,27 kann auch beim Menschen Erkrankungen verursachen. Aus den Proben humanen Ursprungs isolierten die Autoren jedoch vor

allem Biotyp 3 Serotyp O:9 und Biotyp 4 Serotyp O:3, so dass auch bei kleinen Wiederkäuern der Bezug zu humanen Infektionen nicht geklärt ist.

Bei 3,1% der untersuchten Schlachtschafe konnte in einer deutschen Untersuchung aus dem Jahr 1984 *Yersinia enterocolitica* im Kot nachgewiesen werden (LUDES u. WEISS 1984). Dagegen wiesen 70% der untersuchten Ziegenpopulation Schleswig-Holsteins Antikörper gegen *Yersinia* auf (NIKOLAOU et al. 2002).

Das seltene klinische Bild der Infektion mit *Yersinia enterocolitica* beim Schaf umfasst wässrige bis blutige Diarrhoe, Kümmern und erhöhte Verluste. Es erkrankten vor allem Jungtiere. Das Sektionsergebnis betroffener Tiere ergab vermehrte Blutfülle des Darmes und fallweise eine verdickte Darmmukosa. Häufig lag gleichzeitig eine Infektion mit Kokzidien und Würmern vor (PHILBEY et al. 1991; SLEE u. SKILBECK 1992). SLEE und BUTTON (1990) konnten in der Sektion die für Yersiniose typischen Mikroabszesse im Darm nachweisen. BIN-KUN et al. (1994) berichteten von einem Ausbruch akuter Yersiniose bei Schafen in China. Es handelte sich um eine Infektion mit *Yersinia enterocolitica* Biovar 3 (Serotyp fraglich). Die Morbidität lag bei 41%; die Mortalität betrug 34%. Die Tiere zeigten zunächst hohes Fieber, Husten, Tachypnoe und Pusteln auf der Haut und im Maulwinkel. Bei der Sektion erwiesen sich die Lungen teilweise als nekrotisch, und sie enthielten Abszesse. Subepikardial lagen petechiale Blutungen vor.

In einer Untersuchung zur Abortinduktion beim Schaf durch *Yersinia enterocolitica* Serotyp O:6,30 Biovar 1A in England lösten CORBEL et al. (1992) mit einem aus Abortmaterial isolierten Stamm bei tragenden Muttertieren Plazentitiden aus. Als Folgen traten Aborte oder die Geburt lebensschwacher Lämmer mit generalisierten Infektionen auf. Stämme des Biovars 1A gelten allerdings als apathogen, auch der in diesem Fall isolierte Stamm wies bei Laboruntersuchungen keinerlei Pathogenitätsmerkmale auf.

2.6.4 Infektion des Hundes

Der Hund wird als möglicher Vektor für die Übertragung zwischen Umwelt und freilebenden Nagern beziehungsweise Menschen angesehen. Auch bei Hunden

verläuft die Infektion mit *Yersinia enterocolitica* überwiegend symptomlos. Für die Infektion des Hundes mit dem Serotyp O:3 ist die Verfütterung von rohem Schweinefleisch von großer Bedeutung und steht somit unter dem Einfluss des Menschen (CHRISTENSEN 1987; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001c).

In einem Zwinger konnte bei einem Hund mit blutiger Diarrhoe *Yersinia enterocolitica* aus dem Kot isoliert werden; unter den klinisch unauffälligen Hunden des Zwingers erwiesen sich 30,2% als Ausscheider von *Yersinia spp.*. 89,5% der isolierten Keime gehörten der Spezies *Yersinia enterocolitica* an. Überwiegend lag der Serotyp O:3 vor. Des Weiteren wurden die Serotypen O:30 und O:6 nachgewiesen (FANTASIA et al. 1985). In einer weiteren Untersuchung wurden über einen Zeitraum von 20 Monaten Kotproben von Welpen mit und ohne Diarrhoe sowie von weiblichen Tieren ohne klinische Symptome entnommen. 66,6% der Proben enthielten *Yersinia enterocolitica* O:3 (FANTASIA et al. 1993). Nach HAYASHIDANI et al. (1995) sind Hunde nach überstandener Infektion mit *Yersinia enterocolitica* durch Antikörperbildung vor erneuter Infektion mit dem Erreger geschützt. In erster Linie werden Welpen infiziert und erkranken (FUKUSHIMA et al. 1984a; FANTASIA et al. 1993). Das klinische Bild umfasst neben der blutig-schleimigen Diarrhoe mesenteriale Lymphadenitis, abdominale Zysten und die Infektion der Analdrüsen (MOLLARET et al. 1979; FUKUSHIMA et al. 1984a; FANTASIA et al. 1985; FANTASIA et al. 1993; FENWICK et al. 1994; HAYASHIDANI et al. 1995).

2.6.5 Infektion der Katze

Auch bei Katzen handelt es sich überwiegend um asymptomatische Infektionen. Selten kann Diarrhoe beobachtet werden. Anfang der 1980er Jahre lag die Prävalenz bei Katzen und Hunden in Kotproben bei 0,8%. Es dominierte der Serotyp O:3, seltener lag der Serotyp O:9 vor (WEBER u. LEMBKE 1981). Nach FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001c) kann die Gabe von rohem Schweinefleisch auch bei Katzen zu einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* O:3 führen.

2.6.6 Infektion bei Hasen und Kaninchen

Die Sero-/Biovarkombination 2a, 2b, 3 b, c Biovar 5 wird als sog. „Hasentyp“ bezeichnet. Diese Stämme sind meist serologisch und biochemisch einheitlich (ALEKSIC u. BOCKEMÜHL 1990). Stämme des Biovars 5 sind tierpathogen. In den letzten Jahren wurden aber auch Serovar O:5,27 Biovar 2 oder 3 und Serovar O:3 Biovar 3 aus Hasen isoliert. Die beiden letzten Stämme sind als humanpathogen einzustufen. Hasen und Kaninchen können Haustiere infizieren und sind damit indirekt Reservoir-Tier für den Menschen. SOULIAS (1976) berichtete bei Hasen und Kaninchen von Enterokolitiden, fibrinösen Pleuritiden, Peritonitiden sowie von Spleno- und Hepatomegalie und mesenterialen Lymphadenitiden. Das Sektionsbild kann dem der Infektion mit *Yersinia pseudotuberculosis* ähneln, da in beiden Fällen nekrotische Herde mit Neigung zur Abszessbildung in den betroffenen Organen und Lymphknoten zu finden sind. Dies sollte differentialdiagnostisch berücksichtigt werden (WUTHE u. ALEKSIC 1997). Bei experimentell infizierten Kaninchen kam es zu Durchfall und Gewichtsverlust oder verminderter Zunahme (PAI et al. 1980).

2.7 Epidemiologie

Für die Bekämpfung der Infektion mit *Yersinia enterocolitica* ist eine genaue Kenntnis sowohl der Infektionsursache als auch der Infektionsausbreitung und –verbreitung von besonderer Bedeutung. Zu diesem Zweck werden epidemiologische Untersuchungen durchgeführt.

2.7.1 Epidemiologie der humanen Infektion

Yersinia enterocolitica ist weltweit verbreitet und bei Tieren, Menschen und in ihrer Umgebung nachweisbar. Vor allem in den gemäßigten und subtropischen Zonen der Erde ist *Yersinia enterocolitica* zu finden. In tropischen Regionen ist das Vorkommen des Erregers selten (BOCKEMÜHL u. WONG 2003).

Auf europäischer Ebene wurden für das Jahr 2002 10.040 Fälle humaner Yersiniose aus 10 Mitgliedsstaaten der Europäischen Union (Belgien, Dänemark, Deutschland,

England, Finnland, Irland, Nordirland, Österreich, Schottland, Schweden, Spanien, Wales) und Norwegen gemeldet. Alle Mitgliedsstaaten außer Deutschland berichteten in den Jahren 1996 bis 2002 stets von weniger als 900 Fällen pro Jahr (EUROPÄISCHE UNION 2002a).

Eine Übersicht über die in Deutschland gemeldeten Yersiniosefälle im Zeitraum von 1992-2000 bietet die Abbildung 2. In den aufgeführten Bundesländern erfolgte bereits zu dieser Zeit die Aufgliederung der als „Enteritis infectiosa“ gemeldeten Fälle nach auslösenden Erregern. Dabei ist aufgrund von fehlender oder nicht auf *Yersinia enterocolitica* ausgerichteter Diagnostik davon auszugehen, dass ein Großteil der Infektionen mit dem Erreger nicht erfasst wird (AMMON et al. 1999; ROBERT-KOCH-INSTITUT 2002a). MEHNERT et al. (2001) nehmen eine zehnfach höhere tatsächliche Erkrankungsrate an.

Europaweit hat *Yersinia enterocolitica* Serogruppe O:3 die größte Bedeutung bei humanen Erkrankungen und damit für den gesundheitlichen Verbraucherschutz (BISSETT et al. 1990; GONZALEZ HEVIA et al. 1990; BUCCI et al. 1991; KONTIAINEN et al. 1994; PETERSEN et al. 1996). Bei den in Deutschland im Jahr 2003 registrierten Infektionen mit *Yersinia enterocolitica* wurden mehr als 93% durch den Serotyp O:3 verursacht (BOCKEMÜHL u. ROGGENTIN 2004). Meist handelt es sich bei Erkrankungen des Menschen um sporadische Fälle, deren Ursache nicht immer nachvollziehbar ist (KAPPERUD 1991; ALEKSIC u. BOCKEMÜHL 1996; BOTTONE 1999).

Mit der Änderung des Infektionsschutzgesetzes im Jahr 2001 ist die akute Yersiniose zu einer meldepflichtigen Erkrankung geworden. Es existieren seitdem Falldefinitionen, die eine Qualitätskontrolle und die Vergleichbarkeit der Daten ermöglichen (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2003b).

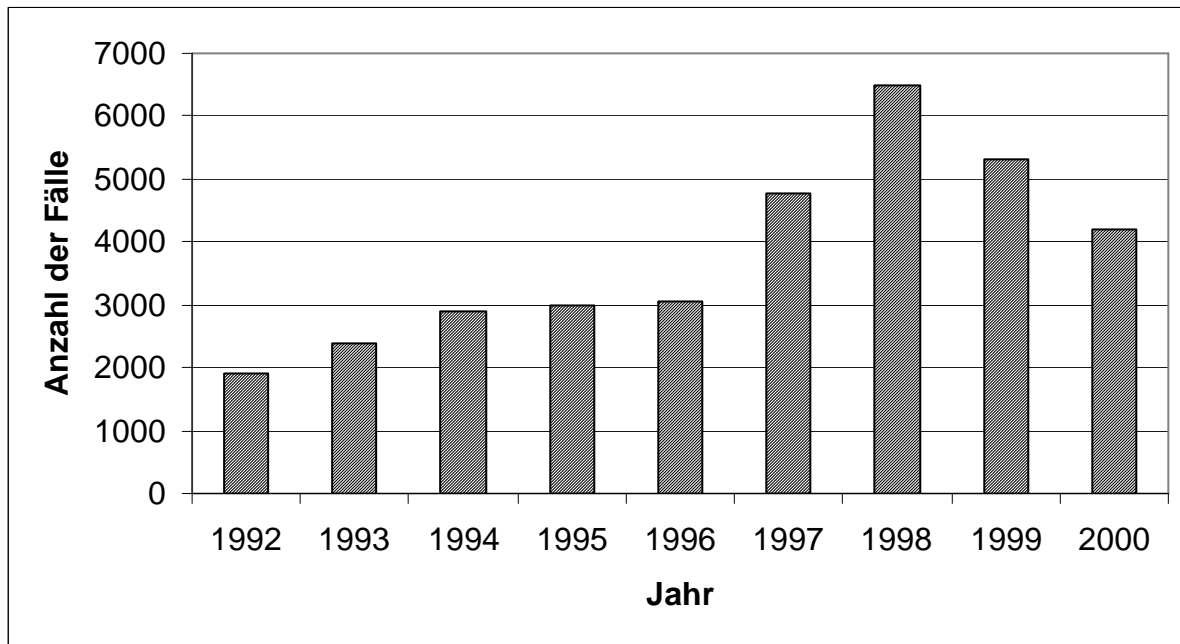


Abbildung 2: Grafische Darstellung der Yersiniosefälle in der Zeit von 1992-2000 in den deutschen Bundesländern Hamburg, Bremen, Nordrhein-Westfalen, Hessen, Saarland, Brandenburg, Berlin, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen, Sachsen-Anhalt und Thüringen (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2002b)

Die für die Jahre 2001 bis 2003 erhobenen Daten sind in Abbildung 3 dargestellt. Bis zur 47. Woche des Jahres 2004 wurden 5.521 Fälle von Yersiniose in Deutschland gemeldet (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2004).

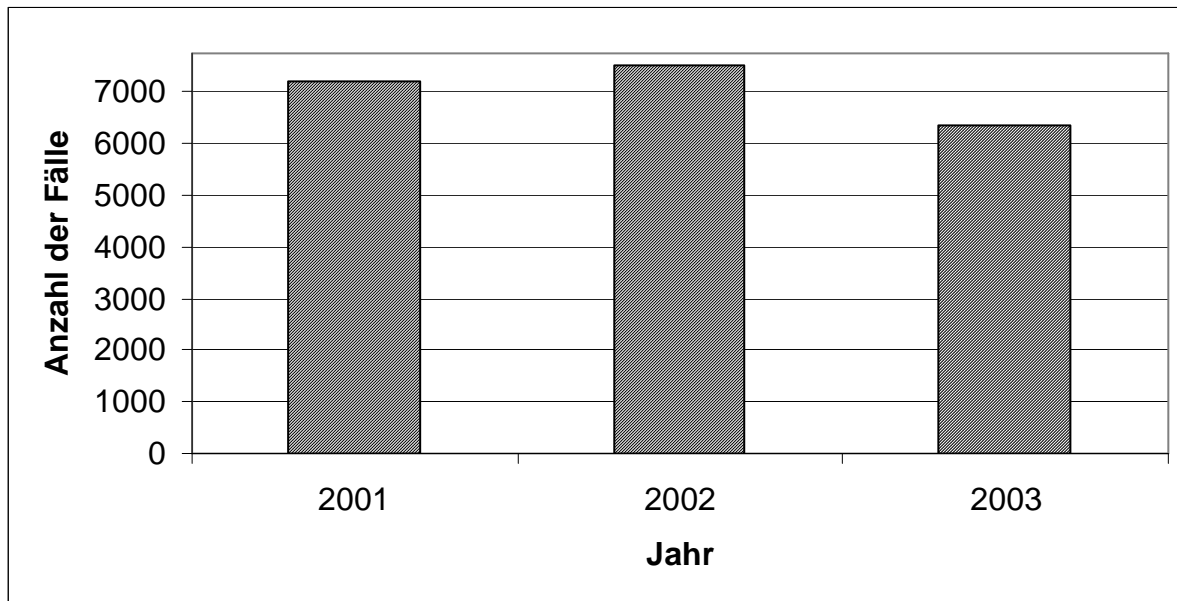


Abbildung 3: Grafische Darstellung der Yersiniosefälle in Deutschland in den Jahren 2001 bis 2003 (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2003 a, b)

Zwischen 1970 und 1990 wurde von nosokomialen Ausbrüchen berichtet, es handelte sich um Infektionen mit Serotyp O:9 und O:5 (TOIVANEN et al. 1973; RATNAM et al. 1982). Der Übertragungsweg von Mensch zu Mensch ist selten, meist handelt es sich um eine Lebensmittelinfektion oder um eine Infektion durch direkten Kontakt mit Tieren. Untersuchungen am Schlachthof zeigten, dass 1991 die Seroprävalenz für Antikörper gegen *Yersinia enterocolitica* Serotyp O:3 bei Schlachtern am Schlachthof mit 19% deutlich höher lag als in einer vergleichend untersuchten Gruppe von gesunden Blutspendern. Bei direktem Kontakt mit porzinem Darm und Innereien wiesen sogar 27% der untersuchten Personen Antikörper gegen den Serotyp O:3 auf. In der Vergleichsgruppe waren nur bei 10% der Personen entsprechende Antikörper nachweisbar (MERILAHTI-PALO et al. 1991). Eine Seroprävalenz von 10% für Antikörper gegen Serovar O:3 konnten auch SCHOILEW u. KOSAROW (1987) bei gesunden Blutspendern ermitteln. Zu ähnlichen Ergebnissen wie MERILAHTI-PALO kamen auch NESBAKKEN et al. (1991). Sie stellten bei am Schlachtprozess beteiligten Personen mit 17,9% eine

signifikant höhere Prävalenz für Antikörper gegen Serotyp O:3 fest als bei Büroangestellten des Schlachthofes. Hier lag die Seroprävalenz lediglich bei 2,2%.

In neueren Untersuchungen wurden in Personengruppen, die nicht durch ihre berufliche Tätigkeit einem höheren Infektionsrisiko unterlagen, vermehrt Seroreagenten gefunden. MAKI-IKOLA et al. (1997) untersuchten mit Hilfe eines Immunoassays und eines Immunoblots gesunde Blutspender in Deutschland auf Antikörper gegen *Yersinia enterocolitica*. Die Seroprävalenz für Antikörper gegen die Serotypen O:3 und O:9 lag zwischen 33 und 43%. Diese Zahlen lassen die Autoren eine Vielzahl an subklinischen Infektionen beim Menschen vermuten. Auch NEUBAUER et al. (2000c) konnten in einer Untersuchung im Jahr 2000 die hohe Seroprävalenz von 39% für Antikörper gegen *Yersinia enterocolitica* in Deutschland bestätigen.

STOJEK (1999) ermittelte mit über 40% positiven Reagenten bei der Landbevölkerung mit engerem Kontakt zu Schweinen ein signifikant häufigeres Vorkommen von Antikörpern gegen *Yersinia enterocolitica* im Vergleich zur Stadtbevölkerung (20% Reagenten). Vorherrschende Serotypen waren hier O:5, O:8, O:3 und O:9.

Seit den 1970er Jahren wird weltweit von Fällen transfusionsbedingter Septikämie durch *Yersinia-enterocolitica*-haltige Blutkonserven berichtet. Es wurden dabei die Serotypen O:3, O:9 und O:5, 27 nachgewiesen. Bei Infektion mit *Yersinia enterocolitica* kann beim Menschen eine klinisch inapparente Bakteriämie vorliegen, die bei der Blutspende nicht erkannt wird (BOTTONNE 1997; STROBEL et al. 2000).

2.7.2 Verbindung zwischen humaner und porziner Infektion

In verschiedenen Untersuchungen werden Schweine als bedeutendes Reservoir für humanpathogene *Yersinia-enterocolitica*-Stämme angesehen (KAPPERUD 1991; FUNK et al. 1998; OFFERMANN et al. 1999). Nach einer Studie von PILON et al. (2000) ist der Erreger auch in klinisch unauffälligen Schweinebeständen weit verbreitet. 80% der untersuchten Bestände beherbergten *Yersinia enterocolitica*, wobei der Eintragungsweg in den Schweinebestand noch nicht vollständig geklärt ist

(VON ALTROCK u. WALDMANN 2003). WINGSTRAND und NIELSEN (1996) sahen Parallelen zwischen dem Infektionsverlauf der Yersinien- und Salmonelleninfektion im Bestand und vermuteten daher, dass auch die Infektion mit *Yersinia enterocolitica* häufig über die Umwelt der Tiere stattfindet (vgl. Abschnitt 2.7.3).

Die Bedeutung des Schweines als Träger von humanpathogenen *Yersinia-enterocolitica*-Stämmen unterstreichen die Ergebnisse der Studie von FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001b). 80% der von Menschen isolierten pathogenen *Yersinia-enterocolitica*-Stämme entsprachen den Isolaten von Schweineschlachtkörpern bzw. Schweinefleisch.

Die Verbreitung des Erregers kann sowohl bei verschiedenen Schritten des Schlachtvorganges als auch bei der amtlichen Fleischschau erfolgen. Eine Kontamination mit *Yersinia enterocolitica* ist auch bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen oder Hackfleisch möglich. Beim Schlachtvorgang sind vor allem während des Umschneidens des Anus und des Exenterierens, beim Entfernen der Zunge, des Rachens und der Tonsillen und später im Zuge des Entfleischens des Kopfes Möglichkeiten für die Kontamination des gesamten Schlachtkörpers oder einzelner Teile mit *Yersinia enterocolitica* gegeben. Im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung kann durch das Entfernen von erregerhaltigen Tonsillenresten und mit folgender ungenügender Reinigung der Messer der Erreger auf den Schlachtkörper übertragen werden. Auch eine Keimverschleppung auf den nächsten untersuchten Schlachtkörper mittels kontaminierter Messer ist möglich (KAPPERUD 1991). Ein weiterer gefährdender Schritt, der bei der vorgeschriebenen Fleischuntersuchung durchgeführt werden muss, ist der Anschnitt der Mandibularlymphknoten. Diese können ebenfalls *Yersinia enterocolitica* beherbergen (NESBAKKEN et al. 2003).

Eine signifikante Verringerung der Kontaminationshäufigkeit und damit der menschlichen Erkrankungsrate kann erreicht werden, wenn das Rektum direkt nach Umschneiden des Anus mit einem Plastikbeutel umhüllt wird und derart geschützt zum vollständigen Exenterieren in die Bauchhöhle verlagert wird (NESBAKKEN et al. 1994; NESBAKKEN u. BORCH 1995; NIELSEN u. WEGENER 1997). ANDERSEN

et al. (1988) zeigten, dass das mechanische Exenterieren eine Verbesserung der Hygiene im Gegensatz zur manuellen Durchführung dieses Arbeitsschrittes darstellt. In einer Studie an Schlachttierkörpern wurde bei 60% der untersuchten Tierkörper *Yersinia enterocolitica* O:3 in den Tonsillen nachgewiesen. Dies verdeutlicht die Rolle der Tonsillen als Erregerreservoir. Über Tropfwasser oder Blut können die Organe am Geschlinge (Zunge, Herz, Lunge, Zwerchfell und Leber) kontaminiert werden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a). Auch die Untersuchungsergebnisse von im Handel entnommenen Proben unterstützten diese Aussage; die Prävalenz von pathogenen *Yersinia-enterocolitica*-Serotypen bei Proben von Schweinezungen, -nieren und -herzen lag zwischen 50 und 83% (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001d). Zu dieser hohen Nachweisrate trägt sicher zusätzlich die von KAPPERUD (1991) beschriebene Fähigkeit des Erregers bei, bei Kühltemperaturen von 4°C nicht nur zu überleben, sondern sich bei diesen Temperaturen auch noch zu vermehren. Auch bei einer Untersuchung von Fleisch- und Umweltproben aus acht Metzgereien wurde *Yersinia* in allen untersuchten Betrieben nachgewiesen. In 75% der Geschäfte war der pathogene *Yersinia-enterocolitica*-Serotyp O:3 vorhanden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2004).

Bis in die 1980er Jahre war es in Belgien erlaubt, Hackfleisch nach Herstellung gekühlt aufzubewahren und erst am Folgetag in Verkehr zu bringen. Dies führte zu einer hohen Rate an Infektionen mit *Yersinia enterocolitica*. 1986 war mit 1469 registrierten Fällen die höchste Erkrankungsrate zu verzeichnen (VERHAEGEN et al. 1998). Als wichtige Infektionsquelle erwies sich der Verzehr von nicht ausreichend erhitzten Speisen mit Hackfleisch, welches aus Massetermuskulatur hergestellt worden war. Beim Entfernen dieses Muskels kann es leicht zum unfreiwilligen Abtrennen von Maulschleimhaut oder gar von Tonsillenresten kommen, die mitverarbeitet werden und hochgradig kontaminiert sein können (TAUXE et al. 1987). Die Überprüfung der kritischen Arbeitsschritte im Schlachtvorgang, die genaue Auswahl des Fleisches für die Hackfleischherstellung und das Inverkehrbringen dieses leicht verderblichen Produktes noch am Tag der Herstellung ermöglichte nach

Ansicht von VERHAEGEN et al. (1998) die Abnahme der registrierten Erkrankungen um die Hälfte.

Das Infektionsrisiko kann für den Menschen also durch hygienische Maßnahmen, Sorgfalt bei der Fleischauswahl sowie im korrekten Umgang mit rohem Schweinefleisch gesenkt werden.

Patienten mit Yersiniose berichteten häufiger als Kontrollpersonen, in den zwei Wochen vor der Erkrankung rohes oder wenig erhitztes Schweinefleisch bzw. Wurst mit Schweinefleischanteil verzehrt zu haben (OSTROFF et al. 1994).

Rohes Schweinefleisch, das *Yersinia enterocolitica* enthält, kann auch indirekt zu einer Infektion des Menschen führen. Von den humanpathogenen Serotypen des Erregers (z.B. O:3, O:9, O:5,27) ist O:3 vor allem beim Schwein, aber auch bei Hunden und Katzen zu finden (BECKER 2002). Hunde und Katzen können sich durch die Verfütterung von *Yersinia-enterocolitica*-O:3-haltigem rohem Schweinefleisch infizieren und nachfolgend den Erreger mit dem Kot mehrere Wochen lang ausscheiden (FENWICK et al. 1994). FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001b) hielten den Infektionsweg über Haustierkot vor allem bei Kleinkindern für denkbar.

2.7.3 Epidemiologie der porzinen Infektion

SKJERVE et al. (1998) zufolge wird *Yersinia enterocolitica* beim Schwein sowohl fäkal-oral als auch durch Sperma und Abortmaterial übertragen. Neben dem Zukauf von klinisch inapparent infizierten Tieren können Transportfahrzeuge eine Rolle für die Übertragung spielen. Insbesondere das im Fahrzeug verwendete Einstreumaterial kann den Erreger beherbergen. Die Untersuchungen von SKJERVE et al. zeigten, dass durch den Einsatz einer Unterdruckventilation im Stall und durch Umstellung von automatischer auf manuelle Fütterung die Herdenprävalenz gesenkt werden konnte. Auch eine strikte Trennung von infizierten und nicht-infizierten Beständen bei Transport und Schlachtung senkte das Infektionsrisiko erheblich (SKJERVE et al. 1998).

In einer Langzeitstudie in Belgien untersuchten VERHAEGEN et al. (1998) die Ausbreitung von *Yersinia enterocolitica* in Schweinemastbeständen in den 1970er und 1980er Jahren. Die Autoren schrieben die zunehmende Verbreitung des Erregers der Umwandlung von Kleinbetrieben mit geschlossenem System in Großmastanlagen zu. Nach Zukauf von infizierten Ferkeln kam es in solchen auf die Mast spezialisierten Großbetrieben innerhalb von Wochen zur Durchseuchung des Bestandes.

NIELSEN et al. (1996b) untersuchten Sammelkotproben und Serumproben von Schweinen in Mastbetrieben. Jede Tiergruppe wurde mehrfach beprobt. Auffällig war der Unterschied zwischen der bakteriologischen Nachweisrate von *Yersinia enterocolitica* O:3 im Kot (0% bis 100%) und der Antikörperprävalenz im Serum (77% bis 100%, ein Betrieb mit 23%). Die Ergebnisse der Kotuntersuchungen wiesen in den einzelnen Tiergruppen Schwankungen auf. Die serologischen Untersuchungsergebnisse bestätigten sich in den folgenden Proben. Den Unterschied zwischen konstant hoher serologischer Prävalenz und vergleichsweise niedriger und schwankender Ausscheidungsrate erklärten die Autoren mit der Ausscheidungsdauer der Erreger nach Infektion. Nach NIELSEN et al. (1996b) scheiden Tiere, die bereits als Absetzferkel infiziert werden, den Erreger seltener im Endmastalter aus als Tiere, die erst während der Aufzucht Erregerkontakt hatten. Unabhängig vom Infektionszeitpunkt produzieren die Tiere noch zum Zeitpunkt der Schlachtung Antikörper gegen den Erreger.

WINGSTRAND und NIELSEN (1996) wiesen bei für *Yersinia-enterocolitica*-seronegativen Absetzferkeln den Erreger bei 4,4% der Tiere im Kot nach; im Aufzuchtbereich wiesen 18% der Tiere Antikörper gegen den Erreger auf; bakteriologisch war er bei 38,8% der Kotproben nachweisbar. In der Endmast gab es in infizierten Beständen Tiergruppen, die bakteriologisch und serologisch *Yersinia-enterocolitica-negativ* waren. Insgesamt hatten jedoch 46,2% der Endmastschweine Antikörper gegen *Yersinia enterocolitica*; 61,7% schieden den Erreger mit dem Kot aus. Aufgrund der Parallelität zum Verlauf von Salmonelleninfektionen im Bestand

vermuteten die Autoren, dass auch die Infektion mit *Yersinia enterocolitica* über die Umwelt der Tiere stattfindet.

PILON et al. (2000) ermittelten bei der Untersuchung von Proben aus der direkten Umgebung von Schweinen, wie z. B. Stallabtrennungen, Ventilatoren, Bürsten, Fliegen, Stiefel der Betreuer der Tiere oder der Verladebereich, eine geringe Nachweisrate von *Yersinia enterocolitica* Serotyp O:3 mit maximal 4,4% positiven Proben. Es bestanden Unterschiede zwischen den einzelnen Entnahmeorten. Die höchste Nachweisrate ergaben die Proben von Treppenstufen im Stallbereich, hier waren 12,5 % der Proben positiv. PILON et al. folgerten aus den Ergebnissen der Umgebungsproben, dass die primäre Ursache der Infektion der Schweine nicht in der Umwelt liegt, sondern vermuteten im Gegensatz zu WINGSTRAND u. NIELSEN (1996), dass ein vorhandener Stamm im Bestand persistiert und die Infektion von Tier zu Tier übertragen wird.

THIBODEAU et al. (1999) berichteten von transienter Bakteriämie bei Schweinen innerhalb von drei Stunden nach experimenteller oraler Infektion. Eine Infektion mit *Yersinia enterocolitica* in den Stunden vor der Schlachtung ist nicht unwahrscheinlich, falls Tiere mit unterschiedlichem Gesundheitsstatus aus verschiedenen Beständen gemeinsam transportiert werden. Stressbedingt kann die Ausscheidungsrate von *Yersinia enterocolitica* erhöht sein. THIBODEAU et al. (1999) hielten auch eine aus Hunger resultierende Koprophagie als Infektionsmöglichkeit für denkbar. Zum Zeitpunkt der Schlachtung kann nach Ansicht der Autoren die transiente Bakteriämie bereits vorliegen und somit zu einer Gefahrenquelle für die Gesundheit des Menschen führen.

2.7.4 Vergleich der epidemiologischen Situationen verschiedener Länder

2.7.4.1 Humane Infektionen

In Dänemark gehört *Yersinia enterocolitica* zu den fünf Bakterienspezies, die am häufigsten Verursacher von gastrointestinalen Erkrankungen beim Menschen sind (ETHELBERG et al. 2004). NIELSEN und WEGENER (1997) berichteten von 15 Fällen humaner Yersiniose pro 100.000 Einwohner aufgrund von Infektionen mit

Serotyp O:3 im Jahr 1995. In einer weiteren dänischen Untersuchung konnte ein Anteil von 8,3% *Yersinia-enterocolitica*-Infektionen bei den amtlich registrierten bakteriellen gastrointestinalen Infektionen in den Jahren 1991-1999 ermittelt werden. Etwa 55% entfielen auf *Salmonella*-Infektionen, weitere 33% auf *Campylobacter*-Infektionen. Mit 2,2% waren auch *Shigella*-Infektionen vertreten (HELMS et al. 2003). In Frankreich wurde eine Zunahme der diagnostizierten humanen *Yersinia-enterocolitica*-Infektionen im Zeitraum von 1989-1997 beobachtet. Vor allem das Auftreten der Infektion mit *Yersinia enterocolitica* Serogruppe O:9 war bemerkenswert, da dieser Serotyp vorher nicht festgestellt worden war. Eventuell hängt dies mit einer verbesserten Diagnostik zusammen, da es zwischen der Serogruppe O:9 und *Brucella abortus* serologische Kreuzreaktionen gibt (GOURDON et al. 1999).

2.7.4.2 Porzine Infektionen

2.7.4.2.1 Untersuchungen in Schweinemastbetrieben

SKJERVE et al. (1998) konnten bei ihrer Untersuchung von Serumproben in norwegischen Schweinemastbetrieben deutliche Unterschiede zwischen den Beständen bezüglich der Prävalenz für Antikörper gegen *Yersinia enterocolitica* O:3 feststellen. Während in 86% der reinen Mastbetriebe Antikörper gegen den Erreger nachgewiesen wurden, waren fast die Hälfte (46,9%) der in geschlossenem System produzierenden Betriebe serologisch *Yersinia-enterocolitica*-negativ. NIELSEN et al. (1996b) untersuchten Sammelkotproben und Blutproben von Schweinen in dänischen Mastbetrieben. Die Ausscheidungsrate von *Yersinia enterocolitica* O:3 im Kot variierte von 0% bis 100%. Antikörper gegen den Erreger hatten 77% bis 100% der Tiere gebildet. Diese Zahlen bestätigten sich in Wiederholungsuntersuchungen in denselben Tiergruppen. In Kanada zeigte sich den Ergebnissen der bakteriologischen Kotuntersuchungen von PILON et al. (2000) und POLJAK et al. (2004) zufolge eine auffällige Verringerung der Anzahl an *Yersinia-enterocolitica*-infizierten Betrieben. Im Jahr 2000 beherbergten 80% der untersuchten Schweinemastbestände den Erreger; im Jahr 2002 waren es 16,7%. POLJAK et al.

vermuteten, dass ihre Probennahme im Winter Ergebnisse lieferte, die von der Tendenz zur saisonalen Ausscheidung der Erreger (TOMA u. DEIDRICK 1975) beeinflusst waren. Die neuesten Daten stammen aus einer deutschen serologischen Untersuchung. Dabei waren 45,5% der untersuchten Schweinemastbestände in Bayern durch den Nachweis von Anti-Yop-Antikörper serologisch positiv (HENSEL et al. 2004).

2.7.4.2.2 Untersuchungen an Schlachthöfen

KORTE et al. (2003) führten in den 1990er Jahren Untersuchungen zum Vorkommen von yadA-positiven, also pathogenen, *Yersinia enterocolitica* an vier finnischen Schlachthöfen durch. Im Untersuchungszeitraum stieg die Nachweisrate in den Tonsillen von Schlachtschweinen von durchschnittlich 30% auf 65%. In Österreich war *Yersinia enterocolitica* in 25,7% der Tonsillen- und Kotproben an Schlachthöfen nachweisbar (BIERMAYER 1994). Die Untersuchung von Tonsillentupfern ergab in Italien eine Nachweisrate für *Yersinia enterocolitica* von 14,7% (BONARDI et al. 2003); in den Niederlanden waren mit 42% (DE BOER u. NOUWS 1991) und in Deutschland mit 60% (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a) ein deutlich größerer Anteil der Tonsillentupfer positiv für *Yersinia enterocolitica*. LETELLIER et al. (1999) wiesen in Kanada in 27% der Tonsillentupfer den Erreger nach. Von Schlachthöfen stammende Kotproben enthielten in Deutschland zu 10% (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a) und in den Niederlanden zu 17% (DE BOER u. NOUWS 1991) *Yersinia enterocolitica*. In Kanada waren zwischen 12% und 19% der Kotproben von Schlachtschweinen positiv für den Erreger (THIBODEAU et al. 1999).

In der Schweiz untersuchten OFFERMANN et al. (1999) Tupfer von den Tonsillen und den mesenterialen Lymphknoten von Schlachtschweinen. Dabei beherbergten Tiere aus 26% der untersuchten Betriebe *Yersinia enterocolitica*. Einen höheren Anteil infizierter Mastbetriebe wiesen Untersuchungen an Tonsillentupfern von Schlachtschweinen in Finnland (ASPLUND et al. 1990) und Dänemark (ANDERSEN et al. 1991) nach. ANDERSEN et al. berichteten von 82% infizierter Betriebe. Von den untersuchten Tonsillentupfern enthielten 25% *Yersinia enterocolitica*. ASPLUND et al. wiesen den Erreger in 70% der Betriebe nach. FUNK et al. (1998) bezogen die

Ergebnisse ihrer Untersuchungen an Schlachthöfen in den USA auf die Verkaufsgruppen, in denen die Schweine an die Schlachthöfe geliefert worden waren. Rund 93% dieser Gruppen enthielten *Yersinia-enterocolitica*-positive Tiere. Wie die dargestellten Untersuchungen verdeutlichen, ist *Yersinia enterocolitica* in Europa und in Nordamerika ein Keim, der in den Mastschweinebeständen weit verbreitet ist und daher ein erhebliches Risiko für die Gesundheit des Menschen darstellt.

3 Eigene Untersuchungen

Für die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für kleine Klautiere der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover ein indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von *Yersinia enterocolitica* Serotyp O:3 in Kotproben von Mastschweinen entwickelt. Als Vergleichsmethode diente der bakteriologische Nachweis des Erregers in den Kotproben. Zusätzlich wurden von den beprobten Tieren Serumproben gewonnen und auf Antikörper gegen *Yersinia enterocolitica* untersucht. Die Blutproben wurden im Rahmen eines von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung unter der Nummer 00 HS 046 vergebenen Forschungsauftrags mit dem Titel „Prävalenzstudie zum Vorkommen von Zoonoseerregern in deutschen Schweinebeständen (ZiPP–Zoonoses in Pork Production)“ entnommen. Die bakteriologischen und serologischen Untersuchungen waren ebenfalls Bestandteil des genannten Forschungsauftrages und wurden am Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. U. Rösler durchgeführt. Die Extraktion der DNA aus den Kotproben für die PCR wurde an der Klinik für kleine Klautiere vorgenommen; die PCR selbst erfolgte in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. U. Rösler.

3.1 Material

3.1.1 Herkunft der Proben, Probenzahl und Entnahme

In den Monaten März bis Juli 2004 wurden in insgesamt 30 Schweinemastbetrieben Kot- und Blutproben von jeweils 30 Schweinen entnommen. Die Tiere hatten ein Gewicht von mindestens 80 kg. Die Kotentnahme erfolgte rektal mit Hilfe eines beschrifteten Einmalhandschuhs. Die Blutprobe zur Gewinnung von Serum wurde mit gekennzeichneten Monovetten[®] (Fa. Sarstedt) entnommen. Eine Zuordnung von Kot- und Blutproben zum selben Mastschwein wurde dadurch ermöglicht. Die Untersuchung wurde in niedersächsischen Mastbetrieben durchgeführt. Die

Teilnahme war freiwillig. Die Betriebsgröße variierte bei den für die vorliegende Arbeit ausgewählten zehn Betrieben zwischen 300 und 1950 Mastplätzen. Sieben dieser zehn Betriebe hielten über 1000 Mastschweine. Die Belegung wurde in allen Beständen abteilweise im Rein-Raus-Verfahren durchgeführt. Sieben der Betriebe fütterten Flüssig-, zwei Betriebe fütterten Trockenfutter, einer Breifutter. Die beprobten Tiere wurden überwiegend auf Voll- oder gruppenweise auch auf Teilspaltenboden gehalten. Die Tiere stammten in sechs Betrieben aus je einem Herkunftsbetrieb. Die restlichen vier Bestände bezogen die Tiere aus zwei oder mehr Herkunftsbetrieben.

3.1.2 Konservierung und Aufbereitung der Proben

Nach der Entnahme aller Proben eines Betriebes wurde jede Kotprobe in zwei Teile geteilt. Der eine Teil wurde in sterile Milchprobenröhrchen überführt und direkt zur bakteriologischen Untersuchung nach Leipzig versandt. Der andere Teil der Probe verblieb zunächst im Einmalhandschuh und wurde gemeinsam mit den Blutproben in die Klinik für kleine Klautiere der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover transportiert. Die Proben wurden maximal acht Stunden nach Gewinnung weiter bearbeitet.

Die Blutproben wurden zur Serumgewinnung während 15 min. bei 5000 U/min zentrifugiert und der Überstand in Rundbodenpolystyrolröhrchen überführt. Die Kotproben wurden in Polypropylengefäße überführt und gemeinsam mit den Serumproben eingefroren und bei -21°C bis zur weiteren Untersuchung aufbewahrt. Die Serumproben mehrerer Betriebe wurden gesammelt und dann bei 4°C gekühlt nach Leipzig versandt. Von den bei Raumtemperatur aufgetauten Kotproben wurden mit Hilfe einer sterilisierten Platinöse Objektträgerausstriche auf SuperFrost Objektträgern (Fa. Roth) für den Immunfluoreszenztest angefertigt. Bei sehr trockenem Kot wurde zur Ermöglichung des Ausstriches ein Tropfen PBS (pH 7,6) zugesetzt.

3.1.3 Auswahl der zu untersuchenden Bestände

Für den unter Punkt 3 genannten Forschungsauftrag wurden alle genommenen Kotproben bakteriologisch und alle Blutproben serologisch untersucht. Die Auswahl der zehn mittels Immunfluoreszenztest zu untersuchenden Bestände erfolgte nach den Ergebnissen der serologischen und bakteriologischen Untersuchungen. Dazu wurden die Betriebe in Prävalenzgruppen eingeteilt. Diese repräsentieren das Gesamtergebnis. Aus den nachfolgend definierten Gruppen wurden je zwei Bestände mit jeweils 30 Proben für die vorliegende Untersuchung ausgewählt.

- a) Gruppe 1: Bestände (Nr. 1 und 2) mit hoher bakteriologischer Prävalenz (> 40 % bakteriologisch positive Proben)
- b) Gruppe 2: Bestände (Nr. 3 und 4) mit mittlerer bakteriologischer Prävalenz (20-30 % bakteriologisch positive Proben)
- c) Gruppe 3: Bestände (Nr. 5 und 6) mit niedriger bakteriologischer Prävalenz (\leq 10 % bakteriologisch positive Proben)
- d) Gruppe 4: bakteriologisch negative Bestände (Nr. 7 und 8) mit \geq 97,7% serologisch positiven Proben (ein Tier in einem von zwei untersuchten Betrieben mit serologisch fraglichem Ergebnis)
- e) Gruppe 5: bakteriologisch negative Bestände (Nr. 9 und 10) mit \geq 97,7% serologisch negativen Proben (ein Tier in einem von zwei untersuchten Betrieben mit serologisch fraglichem Ergebnis)

3.2 Methode

3.2.1 Bakteriologische Untersuchung

Für die bakteriologische Untersuchung wurden die Proben verwendet, die unmittelbar nach der Gewinnung nach Leipzig versandt worden waren. Dazu wurde je 1 g der zu untersuchenden Kotprobe in 9 ml ITC-Bouillon für 30 sec homogenisiert und dann für 48 h bei 28°C aerob bebrütet. Dieser Ansatz wurde mittels Glasstab auf

ein *Yersinia*-Selektivmedium (CIN-Medium) ausgestrichen und erneut für 48 h bei 28°C aerob bebrütet. Einzelkolonien, die aufgrund der Kuhaugenform verdächtig für *Yersinia enterocolitica* erschienen, wurden mit dem biochemischen Identifikationssystem für Enterobacteriaceae API 20E (Fa. bioMérieux, Nürtingen) (vgl. auch Abschnitt 2.3) identifiziert. Die Bestimmung des Serotyps wurde mit Hilfe der Objektträgerschnellagglutination vorgenommen. Die serotypspezifischen Agglutinationsseren wurden nach ALEKSIC und BOCKEMÜHL (1984) im Kaninchen mittels Referenzstämmen entwickelt und mit der Stammsammlung des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig auf ihre Spezifität überprüft.

3.2.2 Serologische Untersuchung

Am Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen kamen bei der serologischen Untersuchung der eingesandten Proben zwei Verfahren zur Anwendung. Zunächst wurden alle Serumproben mit einem ELISA untersucht. Im verwendeten ELISA werden die Antikörperisotypen IgG und IgA nachgewiesen. Die Serumproben von bakteriologisch positiven Tieren mit einem negativen ELISA-Ergebnis wurden einzeln mittels Westernblot nachuntersucht. In diesem Westernblot wird der Antikörperisotyp IgM bestimmt.

Beide Tests arbeiten mit dem gleichen Antigen. Es handelt sich dabei um *Yersinia*-outer-proteins (Yops), die eine hohe Infektionsspezifität haben. Für den ELISA wurden vier rekombinante Yops des Referenzstammes DSM 13030 des *Yersinia enterocolitica* Bioserovars 4/O:3 verwendet. Die Herstellung der Antigene für den Westernblot erfolgte im natürlichen System. Dazu wurde derselbe Referenzstamm bei 28°C in Luria-Bertani-Bouillon kultiviert, anschließend einmal in frische Bouillon überimpft und dann bei 37°C für eine Stunde kultiviert. Durch Zugabe von 150µl 0,5M Ethylendiamintetraacetat-Lösung (EDTA-Lösung) wurde die Sekretion der Yops in den Kulturüberstand induziert. Anschließend wurden die Antigene mit Ammonium-Persulfat gefällt und per Dialyse aufgereinigt.

3.2.3 Indirekter Immunfluoreszenztest

Der Nachweis von Antigen – hier *Yersinia enterocolitica* - mit der Methode des indirekten Immunfluoreszenztests basiert auf der Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Zunächst kommt es zur Bindung der primären Antikörper an das Antigen. Diese unkonjugierten Antikörper sind spezifisch gegen das Antigen -*Yersinia enterocolitica*- gerichtet. Um den Ablauf der Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar zu machen, wird ein sekundärer konjugierter Antikörper verwendet. Dieser ist gegen die Antikörper der Tierart gerichtet, in der der primäre Antikörper hergestellt wurde. An den sekundären Antikörper ist ein Farbstoff gebunden. In der vorliegenden Untersuchung wurde ein mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markierter Antikörper verwendet, der nach Anregung durch UV-Licht bei 495 nm eine im Fluoreszenzmikroskop sichtbare gelbgrüne Farbe aufweist.

3.2.3.1 Arbeitsprotokoll zur Durchführung des Immunfluoreszenztests

Der Immunfluoreszenztest wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Auftauen der tiefgefrorenen Kotproben bei Raumtemperatur innerhalb von 1,5 h
2. Ausstrich mit einer sterilisierten Platinöse auf SuperFrost Objektträgern (Fa. Roth), ggf. Zusatz von einem Tropfen PBS (pH 7,6); Lufttrocknen der Ausstriche
3. Fixieren der Ausstriche in gekühltem Aceton, 15 min bei -21°C
4. Lufttrocknen der Ausstriche
5. Überschichten mit dem spezifischen Antikörper; Inkubation für 60 min in einer feuchten Kammer bei 37°C
6. Waschen mit PBS (pH 7,6), dreimal 5 min
7. Trocknen bei 37°C im Trockenschrank
8. Überschichten mit dem FITC-markierten Antikörper (bis zur Verwendung lichtgeschützt aufbewahrt); Inkubation für 30 min in einer feuchten Kammer bei 37°C unter Lichtausschluss

9. Waschen mit PBS, zweimal 5 min unter Lichtausschluss
10. Trocknen bei 37°C unter Lichtausschluss
11. Eindecken mit Glycerinpuffer
12. Beurteilung des Ausstrichs unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 495 nm und 1000facher Vergrößerung

Als Positivkontrollen wurden Ausstriche von Schweinekot verwendet, der mit Kulturmaterial von *Yersinia enterocolitica* O:3 angereichert worden war. Als Negativkontrollen dienten Kotasstriche von Tieren, aus deren Kot in der bakteriologischen Untersuchung keine *Yersinia enterocolitica* isoliert werden konnten und die aus Beständen stammten, in denen die beprobten Schweine keine Antikörper gegen den Erreger aufwiesen. Außerdem waren die Ausstriche anstelle des spezifischen Antikörpers mit PBS (pH 7,6) behandelt worden.

3.2.3.2 Gebrauchsverdünnungen und Hintergrundfluoreszenz

Für die Untersuchung der Kotproben auf *Yersinia enterocolitica* O:3 mittels indirektem Immunfluoreszenztest wurde zunächst die Arbeitsverdünnung von Primär- und Sekundärantikörpern mit Hilfe von Schachbrett-Titrationen ermittelt (vgl. STORCH 1997). Dabei wurden sowohl für den *Yersinia-enterocolitica*-O:3-spezifischen Primärantikörper als auch für den sekundären konjugierten Anti-Maus-Antikörper mit PBS (pH 7,6) Verdünnungen im Bereich von 1:10 bis 1:1000 in allen Kombinationsmöglichkeiten hergestellt. Als Primärantikörper kam der monoklonale murine Anti-*Yersinia-enterocolitica*-O:3-Antikörper Klon 2D8 der Firma Progen Biotechnik, Heidelberg, zum Einsatz. Als Sekundärantikörper wurde der FITC-gekoppelte Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörper der Firma Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA, verwendet. Als Präparate für die Schachbrett-Titration dienten Ausstriche von *Yersinia-enterocolitica*-O:3-Kulturmaterial. Dieses wurde von Reinkulturen des Serotyps O:3 gewonnen, der auf Schafblutagar (Columbia Agar mit Schafblut, Fa. Oxoid, Wesel) angezüchtet worden war. Die Zugehörigkeit der vorliegenden *Yersinia-enterocolitica*-Stämme zum Serotyp O:3 wurde mit Hilfe der Objektträgeragglutination überprüft. Dazu wurde

monospezifisches Testserum *Anti-Yersinia-enterocolitica* O:3 (Fa. SIFIN, Berlin) verwendet. Zum Ausstreichen wurde das Kulturmaterial mit einem Tropfen PBS versetzt. Nach Lufttrocknen der Ausstriche wurde ab Punkt 4 des Arbeitsprotokolls (vgl. 3.2.3.1) verfahren.

Zur Differenzierung der spezifischen Fluoreszenz von *Yersinia enterocolitica* (vgl. Abb. 5) von der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz des Probenmaterials Kot (vgl. Abb. 4) wurde Schweinekot mit *Yersinia enterocolitica* O:3-Kulturmaterial versetzt, und Ausstriche wurden gemäß dem Arbeitsprotokoll angefertigt. Der primäre Antikörper wurde dann bei der Durchführung des Immunfluoreszenztests durch PBS (pH 7,6) ersetzt. Die so behandelten Kotasstriche wurden mit dem sekundären FITC-konjugierten Antikörper versetzt, um die unspezifische Bindung dieses Antikörpers an Kotpartikel und Kotbakterien zu untersuchen. Es kamen verschiedene Antikörperversetzungen mit PBS (pH 7,6) zum Einsatz, um die Verdünnungsstufe mit der geringsten Hintergrundfluoreszenz zu ermitteln.

3.2.3.3 Beurteilung des Immunfluoreszenztests

Jeder Ausstrich wurde mäanderförmig im Fluoreszenzmikroskop bei 1000facher Vergrößerung durchgemustert. Für die Auswertung des Immunfluoreszenztestes wurden folgende Grundlagen festgelegt:

- a) positiv: Stäbchen ca. $1,5 \times 0,7 \mu\text{m}$ mit brillanter Randfluoreszenz sichtbar, zentral deutlich dunkler
- b) negativ: im Ausstrich keine entsprechenden Strukturen zu sehen
- c) fraglich: nur mäßige Randfluoreszenz, evtl. Bakterienfragmente

Konnte eine Probe aufgrund der sichtbaren Strukturen positiv beurteilt werden, so wurde die Untersuchung dieser Probe beendet. Für ein negatives Ergebnis wurde eine Probe 15 min mikroskopiert.

Abbildung 4 zeigt die unspezifische Hintergrundfluoreszenz im Kotasstrich.

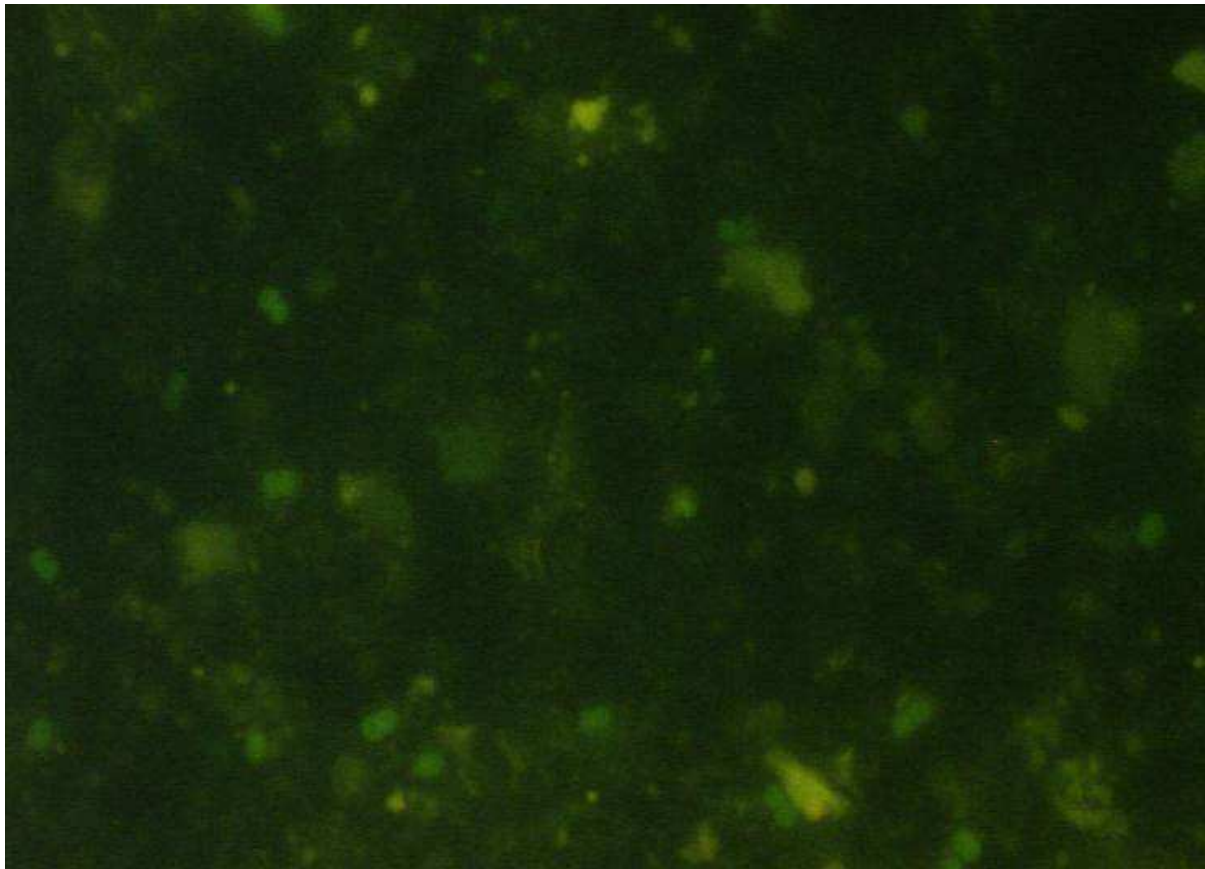


Abbildung 4: Unspezifische Fluoreszenz im Immunfluoreszenztest, Vergrößerung 1000fach (Foto: A. L. Louis)

Abbildung 5 zeigt die spezifische Fluoreszenz von *Yersinia enterocolitica* O:3.

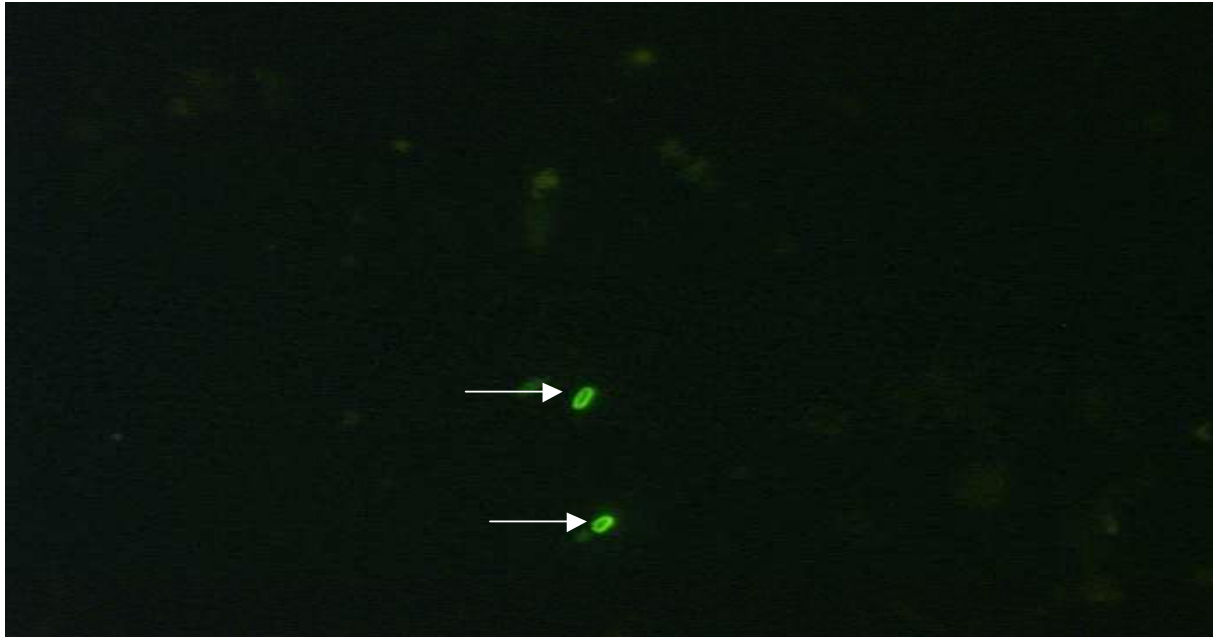


Abbildung 5: *Yersinia enterocolitica* O:3 im Immunfluoreszenztest (Pfeile), Vergrößerung 1000fach, (Foto: A. L. Louis)

3.2.3.4 Ermittlung der Nachweisgrenze

Um die Nachweisgrenze des Immunfluoreszenztests in der unter 3.2.3.1 dargestellten Vorgehensweise ermitteln zu können, wurden Schweinekotproben mit einer kontrollierten Anzahl an *Yersinia enterocolitica* O:3 versetzt. Die Kotproben stammten von Schweinen aus Betrieben, in denen die untersuchten Tiere sowohl in der bakteriologischen als auch in der serologischen Untersuchung negativ beurteilt worden waren. Um die Keimzahl in einer Suspension aus Reinkulturmaterial und PBS photometrisch bestimmen zu können, wurde eine Referenzkurve erstellt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die Suspensionen wurden durch Zugabe von PBS auf eine optische Dichte (OD) von 1 bzw. 0,1 eingestellt. Aus diesen Suspensionen wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe zur Ermittlung der aeroben Gesamtkeimzahl in der Ausgangssuspension angefertigt. Je 25 µl jeder Verdünnungsstufe wurden dann auf Schafblutagar (Columbia Agar mit Schafblut, Fa. Oxoid, Wesel) und Gassner-Agar (Fa. Oxoid, Wesel) aufgebracht. Diese

Untersuchungen wurden zweimal im Doppelansatz durchgeführt. Die Zählung der gewachsenen Kolonien wurde nach 24- und 48-stündiger Inkubation bei 37°C vorgenommen. Es wurden die Verdünnungsstufen, bei denen zwischen fünf und 50 Kolonien gewachsen waren, zur Auswertung herangezogen. Aus den Ergebnissen wurde der Mittelwert gebildet und die Keimzahl in der Ausgangssuspension berechnet.

Zur Herstellung der Proben mit kontrollierter *Yersinia-enterocolitica*-Zahl konnte dann photometrisch die erforderliche OD bestimmt und eine Verdünnungsreihe angefertigt werden. Aus jeder Verdünnungsstufe wurde mit bakteriologisch *Yersinia-enterocolitica*-negativem Kot eine Probe für den Immunfluoreszenztest hergestellt und zur Bestimmung der Nachweisgrenze verwendet. Insgesamt wurden 42 Proben mit einem Keimgehalt von $0,6-0,8 \times 10^1$ bis $0,6-0,8 \times 10^9$ Keimen/g Kot untersucht.

3.2.3.5 Absicherung der Methode, Wiederholbarkeit der Ergebnisse

Um die Wiederholbarkeit der Ergebnisse überprüfen und eine abweichende Beurteilung durch vermehrte Übung des Untersuchenden erkennen zu können, wurden die Proben des ersten untersuchten Bestandes (Gruppe 1: bakteriologische *Yersinia-enterocolitica*-Prävalenz 53%) nach der Bearbeitung von 150 Proben erneut analysiert. Dazu wurden zunächst von jeder Kotprobe zwei Ausstriche unter identischen Bedingungen angefertigt. Ein Ausstrich jeder Probe wurde direkt mittels Immunfluoreszenztests untersucht. Der zweite Ausstrich jeder Probe wurde eingefroren, für eine Woche bei -20°C gelagert und nach dem Auftauen der Objektträger bei Raumtemperatur ebenfalls dem Immunfluoreszenztest unterzogen.

3.2.4 PCR

Proben, die in der bakteriologischen Untersuchung negativ und im Immunfluoreszenztest positiv beurteilt worden waren, wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig mittels PCR nachuntersucht. Die DNA-Extraktion aus den Kotproben wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Stool Mini

Kit (Fa. Qiagen, Hilden) in der Klinik für kleine Klauentiere vorgenommen. Die extrahierte DNA wurde auf Trockeneis gelagert nach Leipzig versandt. Dort wurde die von ARNOLD et al. (2001) beschriebene yopT-PCR als Real Time PCR durchgeführt. Diese Methode ist *Yersinia-enterocolitica*-spezifisch.

3.2.5 Statistische Auswertung

Um eine diagnostische Methode bewerten und mit einer Referenzmethode vergleichen zu können, bedient man sich der Berechnung der Spezifität und Sensitivität sowie des negativen und des positiven prädiktiven Wertes. Weitere Aussagen werden mit dem McNemar-Test und der Berechnung des Kappa-Indexes getroffen.

Die Sensitivität gibt an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass mit dem zu untersuchenden Test ein infiziertes Tier auch wirklich erkannt wird. Dieser Wert entspricht dem Anteil an bakteriologisch *Yersinia-enterocolitica*-positiven Proben, die auch im Immunfluoreszenztest positiv beurteilt wurden.

Die Spezifität hingegen drückt aus, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein nicht infiziertes Tier als negativ bewertet wird. Sie gibt den Anteil an Proben an, der sowohl bakteriologisch als auch im Immunfluoreszenztest *Yersinia-enterocolitica*-negativ bewertet wurde.

Im Unterschied zu den o.g. Werten sind die prädiktiven Werte auch von der Prävalenz des untersuchten Merkmals in der Stichprobe abhängig. Der positive prädiktive Wert bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, dass eine Infektion mit dem untersuchten Erreger bei Tieren mit positivem Testergebnis auch wirklich vorliegt. Dieser Wert entspricht dem Prozentsatz an sowohl im Immunfluoreszenztest als auch in der bakteriologischen Untersuchung *Yersinia-enterocolitica*-positiven Proben. Der negative prädiktive Wert hingegen gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein Tier mit negativem Testergebnis tatsächlich nicht infiziert ist; er ist in der vorliegenden Untersuchung als der Anteil der im Immunfluoreszenztest negativen Proben zu verstehen, der auch bei der bakteriologischen Untersuchung negativ war.

In der Vierfeldertafel stellen sich die Zusammenhänge für die verschiedenen Werte folgendermaßen dar:

Tabelle 7: Vierfeldertafel für den Vergleich von bakteriologischer Untersuchung (BU) und Immunfluoreszenztest (IFT)

	BU positiv	BU negativ	Summe
IFT positiv	a	b	a+b
IFT negativ	c	d	c+d
Summe	a+c	b+d	

Spezifität = $d/b+d$

positiver prädiktiver Wert = $a/a+b$

Sensitivität = $a/a+c$

negativer prädiktiver Wert = $d/d+c$

Der McNemar-Test dient dem Vergleich der in beiden Tests positiven Proben. Es liegt ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der als positiv bewerteten Proben vor, wenn der p-Wert $< 0,05$ ist.

Mit dem Kappa-Index untersucht man die Übereinstimmung der gesamten Ergebnisse zweier Testverfahren. Liegt der errechnete Wert zwischen 0,61 und 0,8, so spricht man von einer starken Übereinstimmung.

Für die statistische Auswertung wurden die in der PCR positiven Proben den bakteriologisch positiven Proben zugerechnet.

Die Berechnung der statistischen Werte wurde mit Hilfe des Programms SAS für Windows Version 8.2 erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Gebrauchsverdünnung und Nachweisgrenze

Bei den Schachbrett-Titrationsen wurde für den Primärantikörper eine optimale Verdünnung von 1:50 ermittelt. In Kombination damit ergab eine Verdünnung von 1:300 für den Sekundärantikörper das beste Ergebnis.

Bei der Bestimmung der Keimzahl mittels Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm entsprach $OD_{600} = 1$ der Konzentration von $1,2-1,6 \times 10^9$ Keimen pro ml Suspension.

Die Nachweisgrenze für *Yersinia enterocolitica* O:3 lag bei 10^3 Keimen/g Kot.

4.2 Ergebnisse der Wiederholungsuntersuchung

Bei der zweiten Untersuchung eine Woche nach Erstuntersuchung des zuerst bearbeiteten Bestandes mit 53% bakteriologischer *Yersinia-enterocolitica*-Prävalenz konnte eine Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden Untersuchungen von 86,6% ermittelt werden. Drei der zunächst als fraglich eingestuften Proben wurden als positiv, eine fragliche Probe bei der Zweitanalyse als negativ bewertet.

4.3 Ergebnisse des Immunfluoreszenztests

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse des Immunfluoreszenztests und der bakteriologischen Untersuchung in den in Abschnitt 3.1.3 definierten Prävalenzgruppen dargestellt.

19,3% (n=58) der untersuchten Proben (n=300) erwiesen sich im Immunfluoreszenztest als positiv, 75,3% (n=226) waren negativ und 5,3% (n=16) der Proben wurden als fraglich beurteilt. Bakteriologisch waren 17,3% (n=52) der Proben (n=300) positiv und 82,7% (n=248) negativ. Fragliche Ergebnisse gab es methodenbedingt in der bakteriologischen Untersuchung nicht.

Tabelle 8: Ergebnisse des Immunfluoreszenztests (IFT) und der bakteriologischen Untersuchung (BU) nach Gruppen

	Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3		Gruppe 4		Gruppe 5			
	IFT	BU	IFT	BU	IFT	BU	IFT	BU	IFT	BU	Summe IFT	Summe BU
positiv	28	29	16	18	13	5	1	0	0	0	58	51
negativ	27	31	42	42	43	55	56	60	58	60	226	249
fraglich*	5	-	2	-	4	-	3	-	2	-	16	-
Summe	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	300	300

*nur bei IFT

In Abbildung 6 werden die Ergebnisse des Immunfluoreszenztests und der bakteriologischen Untersuchung in den verschiedenen Gruppen vergleichend grafisch dargestellt. Abbildung 7 gibt entsprechende Informationen betriebsweise wieder.

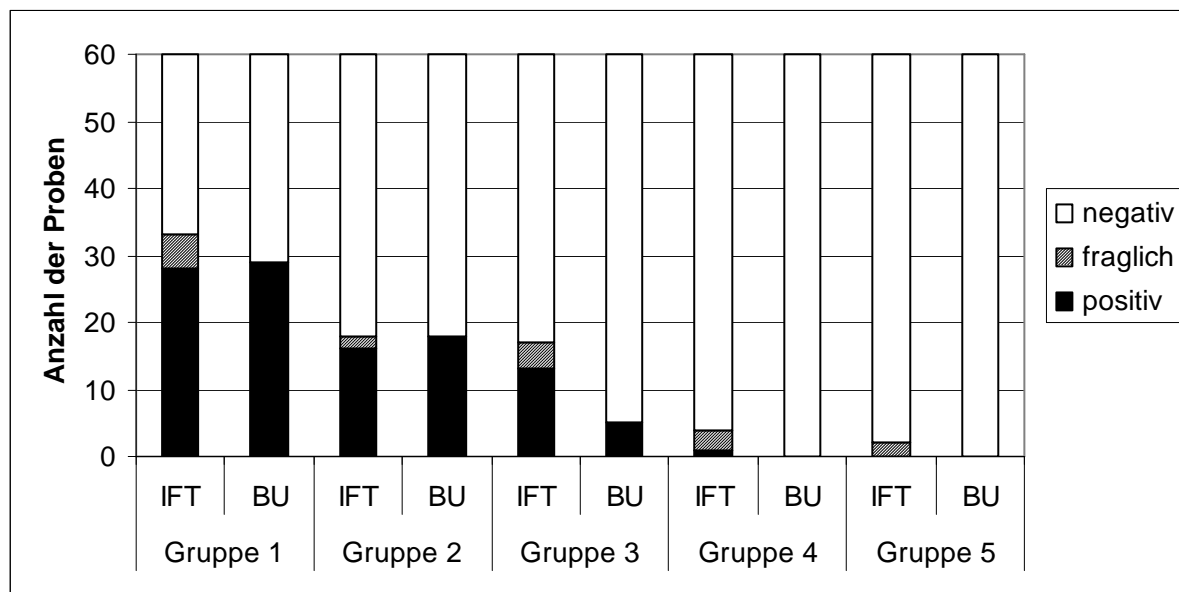


Abbildung 6: Ergebnisse des Immunfluoreszenztests (IFT) und der bakteriologischen Untersuchung (BU) in den verschiedenen Gruppen

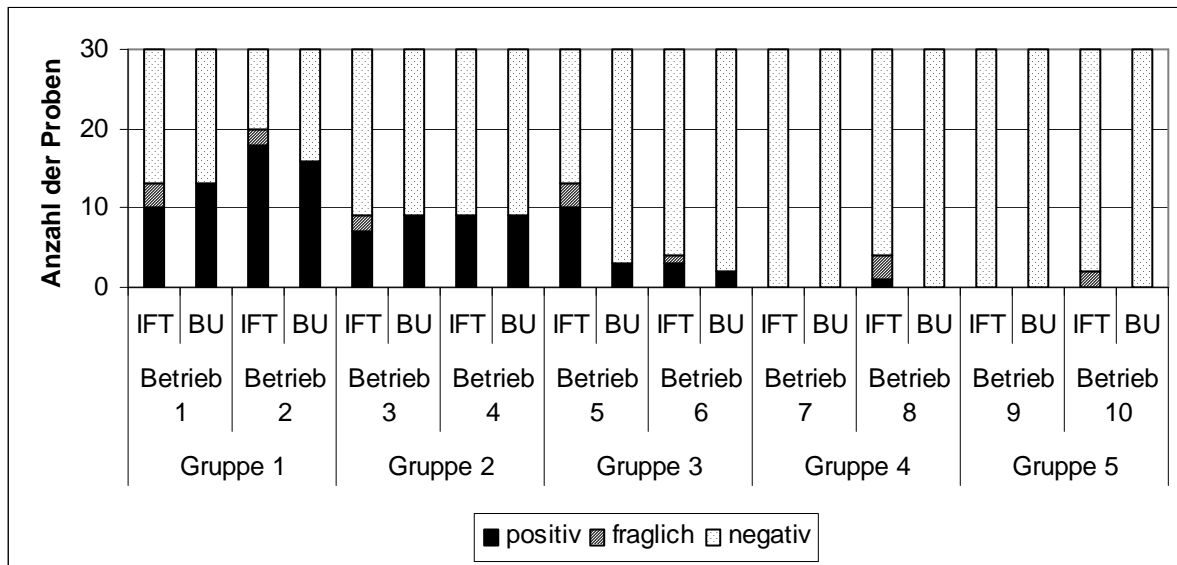


Abbildung 7: Ergebnisse des Immunfluoreszenztests (IFT) und der bakteriologischen Untersuchung (BU) in den untersuchten Beständen (1-10)

Für das Gesamtergebnis ergeben sich folgende Verhältnisse: Von den 248 bakteriologisch *Yersinia-enterocolitica*-negativen Proben wurden im Immunfluoreszenztest 221 (89,1%) als negativ erkannt. Von den übrigen bakteriologisch negativen Proben waren im Immunfluoreszenztest elf fraglich (4,4%) und 16 positiv (6,5%). Bei den bakteriologisch *Yersinia-enterocolitica*-positiven Proben (n=52) waren 80,8% (n =42) auch im Immunfluoreszenztest positiv. Je 9,6% (n=5) erwiesen sich im Immunfluoreszenztest als fraglich oder negativ.

Insgesamt waren 17,3% (n=16) von 58 Immunfluoreszenztest-positiven Proben in der bakteriologischen Untersuchung negativ.

In Tabelle 9 ist die Verteilung aller Ergebnisse des Immunfluoreszenztests inklusive der fraglichen auf die Resultate der bakteriologischen Untersuchung dargestellt.

Tabelle 9: Ergebnisse des Immunfluoreszenztests (IFT) im Vergleich zur bakteriologischen Untersuchung (BU) in absoluten Zahlen

IFT	BU positiv	BU negativ	Summe
positiv	42	16	58
negativ	5	221	226
fraglich	5	11	16
Summe	52	248	300

4.4 Betriebsergebnis

Ein Bestand wurde als *Yersinia-enterocolitica*-positiv bezeichnet, wenn in mindestens einer Probe aus diesem Bestand *Yersinia enterocolitica* O:3 nachweisbar war.

Das Ergebnis bezüglich des Vorhandenseins von *Yersinia enterocolitica* O:3 in den untersuchten Beständen stimmte in der bakteriologischen Untersuchung und im Immunfluoreszenztest für jeden Betrieb überein. Dies war unabhängig von der Prävalenz für *Yersinia enterocolitica* im Bestand. Die Betriebe aus Gruppe 1 (> 40% bakteriologisch positive Proben) und Gruppe 2 (20-30% bakteriologisch positive Proben) mit hoher bakteriologischer Prävalenz wurden als positiv eingestuft. In der Gruppe 3 mit niedriger bakteriologischer Prävalenz ($\leq 10\%$ bakteriologisch positive Proben) waren in Betrieb 5 drei von 30 untersuchten Tieren bakteriologisch positiv. Dieselben Tiere wurden auch im Immunfluoreszenztest positiv bewertet. In Betrieb 6 wurde von den zwei bakteriologisch positiven Tieren der 30 untersuchten Tiere ein Tier im Immunfluoreszenztest positiv beurteilt.

Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der bakteriologischen und serologischen Untersuchungen und des Immunfluoreszenztests in den einzelnen Beständen.

Tabelle 10: Vergleich der Bestandsergebnisse der bakteriologischen und serologischen Untersuchung sowie des Immunfluoreszenztests

Gruppe	Betrieb	bakteriologische Untersuchung	serologische Untersuchung	Immunfluoreszenztest
1	1	+	+	+
	2	+	+	+
2	3	+	+	+
	4	+	+	+
3	5	+	+	+
	6	+	+	+
4	7	-	+	+
	8	-	+	-
5	9	-	-	?
	10	-	-	-

+ = positiv, - = negativ, ? = fraglich

4.5 Ergebnisse der PCR

Mittels PCR wurden insgesamt 17 Proben untersucht. Eine Probe erwies sich dabei als positiv. Die Probe stammte aus einem Betrieb der Gruppe 2 mit einer bakteriologischen *Yersinia-enterocolitica*-Prävalenz von 30% und wurde in der weiteren Ergebnisdarstellung zu den bakteriologisch positiven Proben gezählt.

4.6 Statistische Auswertung

Zur Berechnung der Spezifität, der Sensitivität, der prädiktiven Werte, des McNemar-Tests und des Kappa-Indexes wurden die fraglichen Proben zunächst nicht berücksichtigt und anschließend einmal den positiven bzw. den negativen Proben zugerechnet. Die Ergebnisse der verschiedenen Berechnungen sind in Tabelle 11 dargestellt und werden im Nachfolgenden erläutert.

Tabelle 11: Darstellung der Parameter Sensitivität, Spezifität und prädiktiven Werte bei verschiedenen Berechnungsgrundlagen

	ohne Berücksichtigung der fraglichen Proben	Addition der fraglichen zu den positiven Proben	Addition der fraglichen zu den negativen Proben
Sensitivität	89,4%	90,4%	80,7%
Spezifität	93,3%	89,1%	93,6%
pos. präd. Wert	72,4%	63,5%	72,4%
neg. präd. Wert	97,8%	97,8%	95,9%

Bei ausschließlicher Betrachtung der eindeutig beurteilbaren Proben ergibt sich eine Sensitivität von 89,4% und eine Spezifität von 93,3%. Also wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 89,4% ein bakteriologisch *Yersinia-enterocolitica*-positives Tier auch im Immunfluoreszenztest als positiv beurteilt. Dementsprechend wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 93,3% ein bakteriologisch *Yersinia-enterocolitica*-negatives Tier im Immunfluoreszenztest negativ befundet. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 72,4% ist das im Immunfluoreszenztest positive Tier auch tatsächlich mit dem Erreger infiziert und mit 97,8%iger Wahrscheinlichkeit ist das im Immunfluoreszenztest negative Tier auch wirklich frei von *Yersinia enterocolitica*. Bei Zusammenfassung der fraglichen Proben mit den positiven Proben erhöht sich die Sensitivität auf 90,4%; allerdings sinkt die Spezifität auf 89,1%. Der positive prädiktive Wert erniedrigt sich auf 63,5%; also würden mehr Tiere als positiv eingestuft. Der Anteil an tatsächlich Infizierten betrüge aber nur noch 63,5%. Rechnet man die fraglichen Proben den negativen Proben zu, so fällt die Sensitivität auf 80,7%, die Spezifität liegt leicht erhöht bei 93,6%. Der negative prädiktive Wert erniedrigt sich auf 95,9%, so dass vermehrt Tiere, die infiziert sind, negativ getestet würden.

Abbildung 8 gibt die Zusammenhänge graphisch wieder.

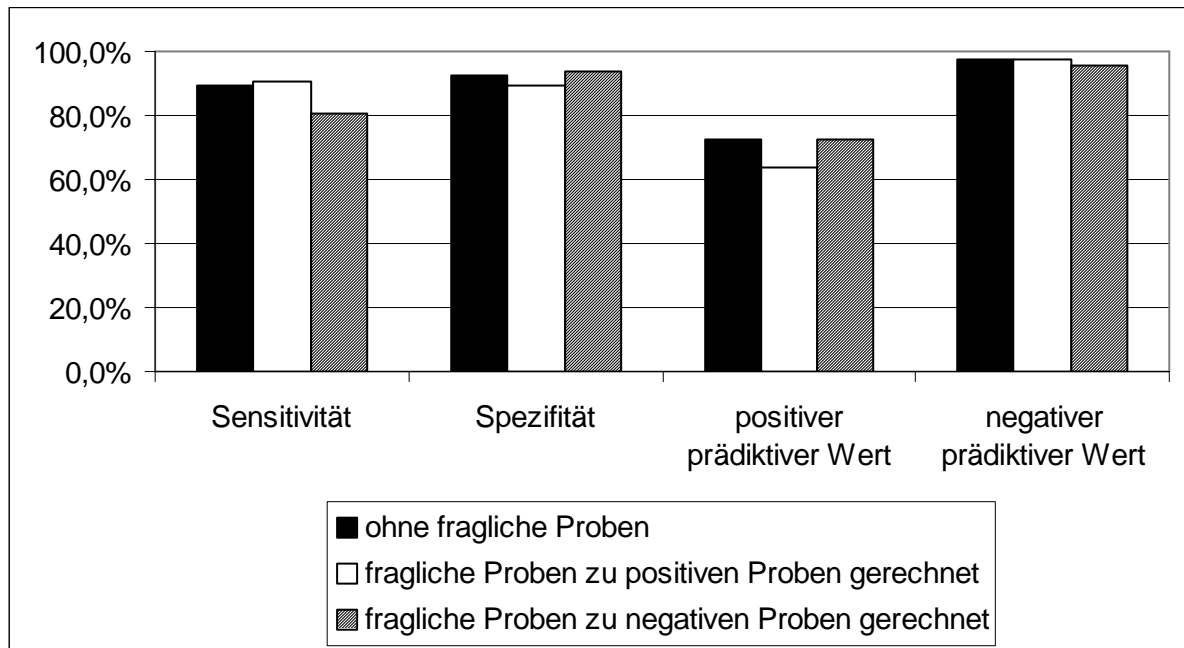


Abbildung 8: Übersicht über die Veränderung von Sensitivität, Spezifität und positivem bzw. negativem prädiktivem Wert durch Berechnung ohne fragliche Proben und Zusammenfassung von fraglichen und positiven bzw. fraglichen und negativen Proben

Der McNemar-Test ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Anzahl positiver Proben in der bakteriologischen Untersuchung und im Immunfluoreszenztest sowohl für die Berechnung ohne fragliche Proben als auch für die Zusammenfassung der fraglichen mit den positiven Proben. Rechnet man die fraglichen Proben den negativen zu, so ist der Unterschied zwischen der Anzahl positiv beurteilter Proben in beiden Methoden nicht signifikant.

Die Bestimmung des Kappa-Indexes ergab mit Werten zwischen 0,67 und 0,74 für jede Zuordnungsmöglichkeit der fraglichen Proben eine starke Übereinstimmung für das Gesamtergebnis beider Methoden.

4.7 Materialkosten für die Durchführung des Immunfluoreszenztests

Die Kosten für die Verbrauchsmaterialien für einen Immunfluoreszenztest zum Nachweis von *Yersinia enterocolitica* O:3 betragen ohne Rabattmöglichkeiten bei

größeren Bestellungen bei der gleichzeitigen Durchführung von 30 Tests 5,53 €. Ein Test kostet dann anteilig 0,18 €. In der Rechnung sind die Objektträger inklusive der Positiv- und Negativkontrolle, je 800 µl der Gebrauchsverdünnung der primären und sekundären Antikörper, die Chemikalien zur Herstellung von 2 l PBS, Pipettenspitzen in verschiedenen Größen, Glycerin zum Eindecken sowie Deckgläser enthalten. Diese Berechnung basiert auf dem Vorhandensein sämtlicher benötigter Geräte und berücksichtigt nicht die Arbeitszeit für die Durchführung und die Auswertung des Tests.

5 Diskussion

Die Yersiniose gehört zu den häufigsten Zoonosen des Menschen. Die Hauptinfektionsquelle stellt das Schwein bzw. Schweinefleisch und die daraus erzeugten Produkte dar.

Um die Infektionsgefahr für den Menschen zu kontrollieren, ist es wichtig, mit *Yersinia*-infizierte von nichtinfizierten Schweinebeständen unterscheiden zu können. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer schnellen und kostengünstigen Bestandsdiagnostik für den für Menschen pathogenen *Yersinia enterocolitica* Serotyp O:3 am lebenden Tier.

Gewinnung der Kotproben für den Immunfluoreszenztest

Die Kotproben wurden von Mastschweinen mit einem Mindestgewicht von 80 kg rektal entnommen. Tiere in dieser Gewichtsklasse sind bereits wenige Wochen vor dem Schlachtzeitpunkt. Das bakteriologische Ergebnis der Kotprobenuntersuchung gibt einen Hinweis auf die vorliegende Infektionssituation und lässt mögliche Rückschlüsse auf die Ausscheidung des Erregers bei der Schlachtung zu. Schweine, die mit einem Gewicht von 80 kg eine nachweisbare Menge *Yersinia enterocolitica* ausscheiden, werden dies aufgrund der Dauer der Erregerausscheidung mit dem Kot aller Wahrscheinlichkeit auch noch zum Zeitpunkt der Schlachtung tun. NIELSEN et al. (1996a) berichteten von einer Ausscheidungsdauer mit dem Kot nach experimenteller Infektion von 30 Tagen bei allen Schweinen der mit *Yersinia enterocolitica* O:3 infizierten Gruppe. 40 Tage p. inf. schieden noch 50% der Tiere eine nachweisbare Menge des Erregers aus. In einer neueren Untersuchung über natürliche Infektionen in verschiedenen schweinehaltenden Betrieben gelang der bakteriologische Nachweis von *Yersinia enterocolitica* O:3 ab dem Zeitpunkt des Absetzens der Ferkel. Altsauen schieden keine Erreger aus, bis zu 46% der Mastschweine nahe dem Schlachtgewicht waren Ausscheidertiere (WINGSTRAND und NIELSEN 1996). So kann eine Probenentnahme in zeitlicher Nähe zur

Schlachtung der Erkennung einer möglichen Gefahrenquelle für den Verbraucher durch kontaminiertes Schweinefleisch dienen.

Ermittlung der Nachweisgrenze des Immunfluoreszenztests

Die Kenntnis der Nachweisgrenze eines Testverfahrens ermöglicht eine Aussage bezüglich der Anwendungsgebiete dieser Methode. Dies setzt voraus, dass die Konzentration der nachzuweisenden Erreger im Probenmaterial bekannt ist. Die Nachweisgrenze für *Yersinia enterocolitica* O:3 des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Immunfluoreszenztests lag bei 10^3 Keimen/g Kot. In der Literatur ist bisher keine Grenze für den Nachweis von *Yersinia enterocolitica* im Kot mittels Immunfluoreszenztests oder bakteriologischer Untersuchung beschrieben worden. CEDERBERG (1968) stellte aber fest, dass der Immunfluoreszenztest zum Nachweis von *Yersinia enterocolitica* in humanen Stuhlproben eine größere Anzahl positiver Ergebnisse als die bakteriologische Untersuchung auf den Erreger lieferte. Auch in der vorliegenden Untersuchung von Kotproben von Mastschweinen konnte ermittelt werden, dass Proben, in denen kulturell *Yersinia enterocolitica* nicht nachweisbar waren, durchaus im Immunfluoreszenztest als *Yersinia-enterocolitica*-haltig beurteilt wurden. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob mit Hilfe des Immunfluoreszenztests eine geringere Anzahl an Erregern im Probenmaterial nachgewiesen werden kann als in der bakteriologischen Untersuchung. Auch HENNIG et al. (1998) berichteten, dass der Nachweis mittels Immunfluoreszenztests der kulturellen Erregerisolierung bezüglich der Ergebnissicherheit deutlich überlegen ist. Die Autoren untersuchten Lungengewebe und bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit kulturell und mit Hilfe eines Immunfluoreszenztests auf *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Im Immunfluoreszenztest war der Erreger in allen Proben der experimentell infizierten Tiere nachweisbar; die bakteriologische Untersuchung von Proben derselben Tiere hingegen ergab Nachweisraten von lediglich 20%.

Wiederholungsuntersuchung

Mit der zweifachen Untersuchung derselben Proben eines Bestandes wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der ersten Untersuchung kontrolliert. In der vorliegenden Arbeit lag eine Übereinstimmung von 86,6% vor. Dies entspricht etwa den von BONITZ (2001) ermittelten Ergebnissen bei der Untersuchung von Kotproben mittels Immunfluoreszenztests zum Nachweis von *Lawsonia intracellularis*. BONITZ berichtete von einer Übereinstimmung der Ergebnisse von 85%.

Vergleich der Ergebnisse des Immunfluoreszenztests mit denen der bakteriologischen Untersuchung

Insgesamt war in 52 der 300 Proben *Yersinia enterocolitica* O:3 kulturell nachweisbar; im Immunfluoreszenztest erwiesen sich 58 Proben als positiv. Beim Vergleich der Verteilung der positiven und negativen Ergebnisse beider Methoden konnte statistisch eine starke Übereinstimmung festgestellt werden.

Diesen Zusammenhang drückt der Kappa-Index mit Werten zwischen 0,67 und 0,74 je nach Berücksichtigung der fraglichen Ergebnisse aus. Die Nachweis von *Yersinia enterocolitica* im Kot mittels Immunfluoreszenztests ist also von den Resultaten her vergleichbar mit denen der bakteriologischen Untersuchung.

Die Sensitivität des Immunfluoreszenztests gegenüber der bakteriologischen Untersuchung ohne Berücksichtigung der fraglichen Proben liegt bei 89,4%. WALDMANN et al. (2000) ermittelten in ihrer Studie zum Vergleich von bakteriologischer Untersuchung und Immunfluoreszenztest als Diagnostikum für *Brachyspira* ssp. eine Sensitivität von 89,5% und stuften diese als gut ein. Die Spezifität des Immunfluoreszenztests auf *Yersinia enterocolitica* gegenüber der Bakteriologie beträgt für die eindeutig beurteilten Proben 93,3%; bei Zusammenfassung der fraglichen mit den positiven Proben liegt die Spezifität bei 89,1%. WALDMANN et al. stellten in ihren Untersuchungen eine Spezifität von 76,5% fest. Allerdings erfasst der Immunfluoreszenztest zum Nachweis von

Brachyspira im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen zum Nachweis von *Yersinia enterocolitica* auch die als apathogen angesehenen Arten dieser Gattung.

Im Immunfluoreszenztest zum Nachweis von *Yersinia enterocolitica* O:3 wurden 19,3% von 300 Proben *Yersinia-enterocolitica*-positiv beurteilt. Das sind 2% mehr als in der bakteriologischen Untersuchung. Dieser Unterschied ist bei der Berechnung des McNemar-Tests signifikant ($p < 0,05$). Ein Erklärungsansatz für die größere Anzahl positiver Proben im Immunfluoreszenztest wäre eine falsche Zuordnung der Proben zu den positiven Proben, also die gegenüber der bakteriologischen Untersuchung falsch positive Beurteilung der Ausstriche im Immunfluoreszenztest. Zur Klärung dieser Fragen wurde eine PCR-Untersuchung auf *Yersinia-enterocolitica*-DNA in den Kotproben durchgeführt. Dabei erwies sich lediglich eine der 17 im Immunfluoreszenztest positiv beurteilten und bakteriologisch negativen Proben als positiv in der PCR-Untersuchung.

Die im Vergleich zur bakteriologischen Untersuchung falsch positiven Ergebnisse im Immunfluoreszenztest können in einer mangelnden Spezifität des primären Antikörpers begründet sein. Die Vielfalt der Darmbakterien macht es unmöglich, einen Antikörper an allen im Darm vorkommenden Keimen auf seine Spezifität hin zu prüfen. Der in der vorliegenden Untersuchung verwendete monoklonale murine Antikörper 2D8 der Firma Progen, Heidelberg, ist auf Kreuzreaktionen mit ausgewählten Bakterienspezies und -subspezies getestet worden. Er zeichnete sich aus durch fehlende Reaktivität mit *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Campylobacter sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Salmonella Paratyphus*, *Salmonella Typhi*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia aldovae*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia pseudotuberculosis* sowie *Yersinia enterocolitica* Serogruppe O:4 bis O:24 (SCHMIDT u. SETHI 1987). Trotzdem kann eine Bindung des Antikörpers an Bakterien, die morphologische Ähnlichkeiten mit *Yersinia enterocolitica* aufweisen, nicht vollständig ausgeschlossen werden. Bei der vorliegenden Untersuchung waren nur 5,3% von 300 mittels Immunfluoreszenztests untersuchten Proben gegenüber der Bakteriologie falsch

positiv. Allerdings kommen für ein beim Immunfluoreszenztest erhaltenes im Vergleich zur bakteriologischen Untersuchung falsch positives Ergebnis weitere Ursachen in Frage. Neben der mangelnden Spezifität des primären Antikörpers kann eine im Vergleich zur Bakteriologie höhere Sensitivität des Immunfluoreszenztests zu einer größeren Anzahl an positiv beurteilten Proben führen. Diesen Sachverhalt vermutete auch CEDERBERG (1968) in seiner Untersuchung zum kulturellen Nachweis von *Yersinia enterocolitica* aus humanen Kotproben im Vergleich mit einem Immunfluoreszenztest. Er begründete die unterschiedliche Anzahl positiver Proben in beiden Untersuchungsverfahren mit einer höheren Sensitivität des Immunfluoreszenztests. WALDMANN et al. (2000) berichteten von derselben Problematik in der Diagnostik von *Brachyspira* spp. mittels Immunfluoreszenztests. Des Weiteren hat die Vitalität des nachzuweisenden Erregers bei der Durchführung des Immunfluoreszenztests im Unterschied zum kulturellen Nachweis keinen Einfluss auf das Ergebnis. Positive Immunfluoreszenztest-Ergebnisse, die bakteriologisch nicht nachvollziehbar sind, können durch die Detektion von toten Keimen zustande kommen.

In der vorliegenden Untersuchung wurden fünf Proben, die nach den Ergebnissen der bakteriologischen Untersuchung *Yersinia enterocolitica* enthielten, im Immunfluoreszenztest negativ beurteilt. Die im Vergleich zur bakteriologischen Untersuchung falsch negative Beurteilung einer Probe im Immunfluoreszenztest kann in einer inhomogenen Verteilung der Keime im Kot begründet sein. Diese Überlegung formulierte auch CEDERBERG (1968) in seiner Studie. Durch die sorgfältige Homogenisierung der Proben vor dem Ausstrich wurde dieses Risiko in der vorliegenden Untersuchung minimiert. Weitere Ursachen für eine falsch negative Beurteilung der Ausstriche können Fehler bei der Durchführung des Tests oder die nachlassende Aktivität der verwendeten Antikörper sein. Um derartige methodische Fehler erkennen zu können, wurden bei der Bearbeitung der Proben stets Positivkontrollen mitgeführt.

Eine unter der Nachweisgrenze des Immunfluoreszenztests liegende Anzahl an nachzuweisenden Erregern in der untersuchten Kotprobe kann ebenfalls zu einem

falsch negativen Ergebnis führen. Um diesen Sachverhalt überprüfen zu können, ist es wichtig, die Nachweisgrenze eines Testverfahrens zu bestimmen und Untersuchungen zum Erregergehalt im Kot durchzuführen. Das Problem von falsch negativen Proben aufgrund des geringen Keimgehaltes im Kot ist auch aus der *Brachyspira*-ssp.-Diagnostik bekannt (WALDMANN et al. 2000).

Bisher beschriebene Anwendungsmöglichkeiten für Immunfluoreszenztests zum Nachweis von *Yersinia enterocolitica* beschränken sich auf die Identifizierung von *Yersinia-enterocolitica*-Kulturen (KARLSSON et al. 1973; LI et al. 1992; DUFFY u. SHERIDAN 1999). In den Studien von KARLSSON et al. (1973) und DUFFY und SHERIDAN (1999) wurde Reinkulturmaterial verwendet. Diese Arbeitsgruppen nutzten bereits isolierte Stämme und Serogruppen. LI et al. (1992) beschäftigten sich mit der Diagnostik von *Yersinia enterocolitica* O:3 in Kotproben von Schweinen. Der Erreger wurde zunächst angezüchtet und nachfolgend mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern identifiziert. Eine Immunfluoreszenzdiagnostik für *Yersinia enterocolitica* direkt aus Kotproben tierischen Ursprungs ist in der Literatur nicht beschrieben.

Immunfluoreszenztests aus Kot werden dagegen in der Diagnostik der Schweinedysenterie zum Nachweis der Gattung *Brachyspira* durchgeführt. Diese Methode ist nach Ansicht von WALDMANN et al. (2000) eine gute und zeitsparende Ergänzung zur bakteriologischen Untersuchung; allerdings können die Artdifferenzierung der Brachyspiren und der zur Bekämpfung essentielle Resistenztest nur über die Anzüchtung der Erreger durchgeführt werden. Für *Yersinia enterocolitica* sind Antikörper verfügbar, die den Nachweis einer bestimmten Serogruppe ermöglichen; daher ist zur Speziesdiagnose keine kulturelle Erregerisolierung notwendig. Im Falle einer antibiotischen Bekämpfung der Infektion im Schweinemastbestand muss der Erreger für die Resistenzuntersuchung dennoch angezüchtet werden.

Ergebnisse der PCR-Untersuchung auf *Yersinia enterocolitica* und ihre Bedeutung für die Bewertung der Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung

Die PCR wurde gemäß der Beschreibung von ARNOLD et al. (2001) durchgeführt. Die Kotproben wurden vor der DNA-Extraktion nicht angereichert. Die zu untersuchenden Kotproben waren seit mehreren Monaten bei -20°C tiefgefroren und für den Immunfluoreszenztest einmal aufgetaut worden. Aufgrund ihrer hohen Kältetoleranz können Yersinien einen solchen Gefrierprozess überleben (GUNSEN 2003); allerdings kann die Vermehrungsfähigkeit der Keime durch die niedrigen Temperaturen eingeschränkt werden. Durch den Verzicht auf die Voranreicherung wurde eine höhere Nachweisgrenze der PCR von 10^6 anstelle von 10^2 Keimen/g Kot in Kauf genommen (ARNOLD et al. 2001). Eine Probe der 17 bakteriologisch negativen und im Immunfluoreszenztest positiven Proben erwies sich in der PCR als positiv; die übrigen Proben waren auch in der PCR negativ. Diese Proben enthielten demnach aufgrund der von ARNOLD et al. beschriebenen Nachweisgrenze der PCR nicht mehr als 10^6 Keime/g Kot. Ein Vorhandensein von *Yersinia enterocolitica* in geringer Konzentration in den 16 PCR-negativen Proben kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Der Nachweis von *Yersinia-enterocolitica*-DNA in einer kulturell für diesen Erreger negativen Kotprobe zeigt, dass das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung im negativen Falle nicht absolut verlässlich ist. Es ist zu vermuten, dass die Sensitivität des Immunfluoreszenztests im Vergleich zur bakteriologischen Untersuchung höher ist. Die Sensitivität der bakteriologischen Untersuchung gegenüber dem Immunfluoreszenztest, also der Anteil an Proben, die im Immunfluoreszenztest positiv ($n=58$) waren und auch bakteriologisch positiv beurteilt wurden ($n=42$), liegt ohne Berücksichtigung der fraglichen Proben bei 72,4% und ist damit um etwa 15% niedriger als die Sensitivität des Immunfluoreszenztests im Vergleich mit der bakteriologischen Untersuchung (89,4%).

Mit einer Nachweisgrenze der PCR von 10^2 Keimen/g Kot wäre vermutlich in mehr als einer Probe DNA von *Yersinia enterocolitica* nachweisbar gewesen. Um die wahrscheinlich höhere Sensitivität des Immunfluoreszenztests gegenüber dem

kulturellen Nachweis zu belegen, hätte jede der 300 untersuchten Kotproben auch mittels PCR überprüft werden müssen. In diesem Falle wäre der direkte Vergleich mit der PCR, deren Nachweisgrenze bekannt ist, möglich gewesen. Wie die dargestellten Ergebnisse vermuten lassen, hätten die Sensitivitätsunterschiede der bakteriologischen Untersuchung und des Immunfluoreszenztests dann bestätigt werden können. In der vorliegenden Arbeit war im Grundkonzept die Durchführung der PCR für alle Proben allerdings nicht vorgesehen. Dies wäre aber für zukünftige Untersuchungen zu empfehlen.

Auswahl der Referenzmethode für die Evaluierung des Immunfluoreszenztests

Als Referenzmethode wurde in der vorliegenden Arbeit die bakteriologische Untersuchung genutzt. Aufgrund der Resultate der PCR-Untersuchung ist die Verlässlichkeit des Vergleichs des Immunfluoreszenztests mit der bakteriologischen Untersuchung in Frage zu stellen. Wären durch die PCR-Untersuchungen die Ergebnisse des Immunfluoreszenztests bestätigt worden, so würde sich dies bei der Verwendung der bakteriologischen Untersuchung als Referenzmethode in einer Verschlechterung der Spezifität der vergleichend untersuchten neuen Methode zeigen, da vermehrt gegenüber der bakteriologischen Untersuchung falsch positive Proben zu verzeichnen wären. Die neue Methode wäre dann aber in Wahrheit der bakteriologischen Untersuchung überlegen und würde in Proben, deren *Yersinia enterocolitica*-Gehalt unter der Nachweisgrenze der bakteriologischen Untersuchung liegt oder die wenige vitale Keime enthalten, den Erreger noch nachweisen können. Damit hätte die neue Methode keine geringere Spezifität, sondern lediglich eine niedrigere Nachweisgrenze bzw. würde von dem Vorteil des Nachweises von toten Keimen profitieren.

In verschiedenen Vergleichen des Nachweises von *Yersinia enterocolitica* mittels PCR und bakteriologischer Untersuchung wies die PCR eine höhere Sensitivität und Spezifität auf (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999; ARNOLD et al. 2001). Allerdings ist der bakteriologische Nachweis von *Yersinia enterocolitica* vor allem bei Kotuntersuchungen in der Routinediagnostik die Methode der Wahl, weil die meisten

PCR-Methoden nicht zu alleiniger Diagnostik auf Spezies- und Subspeziesebene befähigen (ARNOLD et al. 2001, NEUBAUER 2001). Kulturell kann mit Hilfe von Identifizierungssystemen, wie API 20E (Fa. bioMérieux, Nürtingen), dem sogenannten „Goldstandard“ unter den Identifizierungsmöglichkeiten für pathogene *Yersinia enterocolitica* (NEUBAUER et al. 1998), nach Isolierung von *Yersinia*-verdächtigen Kolonien in 18-20h die vorliegende Subspezies festgestellt werden. Für die anschließende schnelle und einfache Serotypisierung stehen Agglutinationsseren zur Verfügung. Die Untersuchung auf *Yersinia enterocolitica* mit Hilfe der PCR findet vor allem an Schlachttieren Verwendung (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999, JOHANNESSEN et al. 2000, NESBAKKEN et al. 2003) und dient dem Nachweis der Keime auf den Schlachtkörpern. Für dieses Untersuchungsziel ist die PCR aufgrund des schnellen Vorliegens des Resultates besser geeignet als die bakteriologische Untersuchung. Als Proben können Tonsillentupfer, Organ- und Muskelbiopsien dienen. Insbesondere vor dem Hintergrund der Zoonosenrichtlinie, nach der bereits die Verantwortung für die Produktion sicherer Lebensmittel in der Primärproduktion liegt, ist jedoch eine Möglichkeit der Diagnostik von *Yersinia enterocolitica* auf Bestandesebene sinnvoll.

Bestandsergebnisse der bakteriologischen Untersuchung und des Immunfluoreszenztests

Das Bestandsergebnis der bakteriologischen Untersuchung wurde in allen Beständen durch den Immunfluoreszenztest bestätigt. Auch in Beständen mit niedriger bakteriologischer Prävalenz für *Yersinia enterocolitica* O:3 von weniger als zehn Prozent stimmte das Ergebnis des Immunfluoreszenztests mit dem der bakteriologischen Untersuchung überein. Trotz der geringen Anzahl an Tieren, die den Erreger mit dem Kot ausschieden, wurde das Vorhandensein des Erregers in dem Betrieb mit beiden Methoden nachgewiesen. Für die Beurteilung eines Betriebes ist es nicht von Bedeutung, wie viele Tiere aktuell *Yersinia enterocolitica* ausscheiden; entscheidend ist der Nachweis des Keims im Bestand. Aufgrund der Möglichkeit der intermittierenden Ausscheidung können Tiere, die zum Zeitpunkt der

Probennahme den Erreger nicht im Kot aufweisen, dennoch Träger von *Yersinia enterocolitica* sein.

Einsatzmöglichkeiten für den Immunfluoreszenztest zum Nachweis von *Yersinia enterocolitica* O:3 in Kotproben

Für die Bestandsdiagnostik ist vor allem der negative prädiktive Wert eines Testverfahrens (Anteil der im Immunfluoreszenztest *Yersinia-enterocolitica*-negativen Proben, in denen auch in der bakteriologischen Untersuchung dieser Erreger nicht nachweisbar war) von Bedeutung, da er Auskunft über die Sicherheit eines negativen Testergebnisses gibt. Dementsprechend zuverlässig werden dann Betriebe erkannt, die *Yersinia-enterocolitica*-frei sind. Für den durchgeführten Immunfluoreszenztest liegt dieser Wert bei der Berechnung ohne fragliche Proben und bei der Zusammenfassung von positiven und fraglichen Proben bei 97,8%. Daher erscheint der Immunfluoreszenztest für eine sichere Aussage über die Erregerfreiheit eines Bestandes als ausreichend geeignet.

Für die Einzeltierdiagnostik ist der Immunfluoreszenztest wie die bakteriologische Untersuchung bedingt einsetzbar, da aufgrund der intermittierenden Erregerausscheidung in einem späteren Infektionsstadium ein einzelnes negatives Testergebnis keine sichere Aussage ermöglicht. Ist das untersuchte Tier aber erst Tage oder einige Wochen infiziert, so erfolgt die Ausscheidung noch kontinuierlich (NIELSEN et al. 1996), und der Immunfluoreszenztest könnte auch hier in der Untersuchung des Einzeltiers zur Anwendung kommen.

Untersuchungsmethode

Bei der mikroskopischen Untersuchung von Kotausstrichen auf *Yersinia enterocolitica* O:3 mit Hilfe des Immunfluoreszenztests müssen Größe und Form der Bakterien mitbeurteilt werden. Dabei können Bakterienfragmente einen störenden Einfluss darstellen.

Yersinia enterocolitica ist aufgrund der geringen Größe von 0,5-0,8 µm in der Breite und 1-3 µm in der Länge in den Ausstrichen selbst bei 1000facher Vergrößerung

nicht leicht zu erkennen. Weiterhin ist die Schichtdicke der Ausstriche zu berücksichtigen. Das Probenmaterial Kot besitzt eine nicht vollständig zu eliminierende Hintergrundfluoreszenz, die in Abhängigkeit von der Schichtdicke das Sehfeld derartig erhellt, dass es erschwert wird, relevante Strukturen von *Yersinia enterocolitica* zu beurteilen. Außerdem ist eine Überlagerung von Strukturen bei zu dickem Ausstrich für die Auswertbarkeit der Ausstriche von Bedeutung.

Die Auswertung des Immunfluoreszenztests wird zusätzlich durch die Lichtverhältnisse während des Mikroskopierens erschwert. Die Arbeit am Fluoreszenzmikroskop ist für die Augen ermüdend, so dass Untersuchungszeiten von über einer Stunde nicht zu empfehlen sind. Die Aufmerksamkeit der untersuchenden Person lässt bei Überschreitung des genannten Zeitraumes deutlich nach, wodurch die Zuverlässigkeit der Ergebnisse sinkt. Auch BONITZ (2001) vertrat die Meinung, dass eine maximale Untersuchungszeit von 60 – 90 min einzuhalten sei.

Für die Aussagekraft der Ergebnisse ist es demnach neben der Auswahl der verwendeten Antikörper wichtig, dass die untersuchende Person die Ausstrichtechnik beherrscht und am Mikroskop die Untersuchungszeiten nicht zu lang gewählt werden.

Untersuchungsmaterial Kot

Die Vorteile des Untersuchungsmaterials Kot im Vergleich zu Lymphknoten oder Tonsillen liegen in erster Linie in der minimalinvasiven Gewinnung am lebenden Tier. Bei der Diagnostik sind jedoch Nachteile, wie z. B. die geringe Erregerzahl im Kot oder die intermittierende Ausscheidung, zu beachten.

In Vorversuchen zur Ermittlung der Nachweisgrenze des Immunfluoreszenztests wurden Kotproben untersucht, die mit einer kontrollierten Anzahl an *Yersinia enterocolitica* O:3 versetzt waren. Die Nachweisgrenze des Immunfluoreszenztests lag bei den mit *Yersinia enterocolitica* angereicherten Proben bei 10^3 Keimen/g Kot. Von einer Keimzahl zwischen 10^2 und 10^6 Keimen/g Kot berichteten auch FUKUSHIMA et al. (1984) bei experimenteller Infektion. Eine mit den Daten der

vorliegenden Untersuchung methodisch vergleichbare Bestimmung der Keimzahl im Kot nach natürlicher Infektion ist in der Literatur nicht beschrieben. Auch für die bakteriologische Untersuchung ist die Nachweisgrenze nicht bekannt.

Neben der möglichen geringen Anzahl der Erreger in den Kotproben erschwert die intermittierende Ausscheidung von *Yersinia enterocolitica* die Diagnostik am lebenden Schwein. Die intermittierende Ausscheidung wird sowohl nach natürlicher als auch nach experimenteller Infektion beschrieben. FUKUSHIMA et al. (1983) untersuchten acht Schweine wöchentlich von der ersten bis zur 20. Lebenswoche. Dabei war innerhalb von zwei bis sieben Wochen nach der Umstallung in einen mit *Yersinia enterocolitica* O:3 kontaminierten Stall der Erreger im Kot der Tiere erstmals nachweisbar. Anschließend wechselten bei sechs der acht Schweine positive und negative bakteriologische Kotuntersuchungsergebnisse. NIELSEN et al. (1995) führten zweimal wöchentlich bakteriologische Untersuchungen an Kotproben von mit *Yersinia enterocolitica* O:3 infizierten 20-25 kg schweren Schweinen durch. Ab dem 25. Tag p. inf. wurde der Erreger von den Tieren nur noch intermittierend mit dem Kot ausgeschieden. Bei Rindern berichteten GARIN-BASTUJI et al. (1999) von diskontinuierlicher Ausscheidung mit dem Kot.

Grundsätzlich lässt der Erregernachweis aus Kotproben nicht den Rückschluss auf eine Besiedlung des Tierkörpers zu. Passagen des Verdauungstraktes ohne Infektion wurden zum Beispiel für Salmonellen beschrieben. KAMPELMACHER et al. (1969) wiesen *Salmonella Typhimurium* bis zu 15 Wochen p. inf. im Kot von oral infizierten Schweinen nach. Bei der folgenden Untersuchung der intestinalen Lymphknoten und verschiedener innerer Organe waren die Erreger kulturell nicht nachweisbar. Eventuell ist eine mangelnde Virulenz des eingesetzten Stammes der Grund für die fehlende Invasion der Keime. Da die natürliche Infektion mit *Yersinia enterocolitica* O:3 bei Schweinen nur selten zu klinischen Symptomen führt, ist eine Besiedlung des Darmes durch *Yersinia enterocolitica* ohne extraintestinale Invasion vorstellbar.

Im Zuge der Bestandsdiagnostik, insbesondere der Erkennung einer möglichen Gefährdung des Verbrauchers durch das Vorkommen des Zoonoseerregers *Yersinia*

enterocolitica im Schweinebestand, ist die Unterscheidung zwischen Infektion oder Erregerpassage ohne Bedeutung. Für das Kontaminationsrisiko während des Schlachtvorganges ist das Vorhandensein des Erregers im Kot entscheidend (KAPPERUD 1991), da auch bei fehlender extraintestinaler Ausbreitung die fäkale Kontamination des Schlachtkörpers möglich ist. Im Mittelpunkt des Interesses steht daher der Erregernachweis im Bestand.

Vorteile des Immunfluoreszenztests gegenüber der bakteriologischen und serologischen Untersuchung

Der beschriebene Immunfluoreszenztest zeichnet sich zunächst durch eine einfache Probengewinnung aus. Kotproben von Schweinen können im Bestand am lebenden Tier von einer Person gewonnen werden. Außerdem bietet die vermutlich höhere Sensitivität des Immunfluoreszenztests gegenüber der bakteriologischen Untersuchung eine größere Sicherheit für den Nachweis von *Yersinia enterocolitica*. Auch die Kenntnis der Nachweisgrenze des Immunfluoreszenztests ist von Vorteil. In der vorliegenden Untersuchung lag diese Grenze bei 10^3 Keimen/g Kot. Aus Untersuchungen an Mäusen ist bekannt, dass die Höhe der fäkalen Ausscheidungsrate nach oraler Infektion mit *Yersinia enterocolitica* O:3 abhängig von der Infektionsdosis ist (UENO et al. 1981). Bei Verabreichung von weniger als 10^4 Keimen schieden die Tiere keine bakteriologisch nachweisbaren Mengen an Erregern aus, wobei die Nachweisgrenze für die kulturelle Identifikation nicht bekannt ist. Eine ähnliche Situation ist auch für das Schwein denkbar. In diesem Falle wäre ein Test mit einer sehr niedrigen Nachweisgrenze vorzuziehen.

Ein weiterer Vorteil des Immunfluoreszenztests gegenüber der bakteriologischen Untersuchung ist die geringe Zeitdauer bis zum Erhalt des endgültigen Ergebnisses. Die Durchführung des Immunfluoreszenztests nimmt durch die Inkubationszeiten insgesamt etwa 2,5-3h in Anspruch. Für die Beurteilung des Immunfluoreszenztests ist eine Zeit von mindestens 15 Minuten pro Probe für ein negatives Ergebnis einzuplanen. Im Vergleich dazu benötigt man für die bakteriologische Untersuchung, wie sie bei den Kotproben in der vorliegenden Studie zusätzlich durchgeführt wurde,

ohne biochemische Identifikation und Serotypisierung als reine Anzuchtzeit 96 h. In dieser Zeitspanne ist eine Voranreicherung mit darauf folgendem Ausstrich auf Selektivnährboden enthalten. Auch eine PCR-Untersuchung dauert mit den Aufbereitungsschritten „Voranreicherung“ und „DNA-Extraktion“ mindestens zwei Tage.

Des Weiteren sind die geringen Kosten des Immunfluoreszenztests beachtenswert. Bei der bakteriologischen Untersuchung ist für eine CIN-Agarplatte ein Preis von über einem Euro zu veranschlagen. Für die Voranreicherung und biochemische Identifizierung werden weitere Medien und Reagenzien benötigt. Der Kostenaufwand für den Immunfluoreszenztest beträgt für die Verbrauchsmaterialien pro untersuchte Probe lediglich 0,18 € bei gleichzeitiger Durchführung von 30 Tests. Für den alleinigen Nachweis von *Yersinia enterocolitica* O:3 im Kot von Mastschweinen ist demnach der Immunfluoreszenztest von den Kosten her dem kulturellen Nachweis überlegen. Eine PCR-Untersuchung ist bei ausschließlicher Berechnung der Verbrauchsmaterialien ebenfalls nicht zu einem solchen Preis durchführbar. Bereits das Material zur DNA-Extraktion kostet für eine Probe mehr als zwei Euro.

Gegenüber der serologischen Untersuchung bietet der Immunfluoreszenztest den Vorteil, dass er eine genauere Auskunft über den Zeitpunkt einer Infektion im Bestand gibt, da der Erreger nur in den ersten 25 Tagen nach der Infektion sicher ausgeschieden wird (NIELSEN et al. 1995). In der vorliegenden Studie waren bei bakteriologischem Nachweis von *Yersinia enterocolitica* im Kot generell im Serum der beprobten Schweine entsprechende Antikörper der Klasse IgG (Nachweis mittels ELISA) oder IgM (Nachweis mittels Immunoblot) detektierbar. Durch die Serokonversion kann mit Sicherheit auf eine vorausgehende Infektion der untersuchten Tiere geschlossen werden. Anhand des Antikörpernachweises ist keine Aussage bezüglich des Infektionszeitpunkts möglich. Eine Ausnahme stellen Tiere dar, die keine Antikörper des Isotyps IgG gegen *Yersinia enterocolitica* gebildet haben, aber dafür Antikörper der Klasse IgM gegen den Erreger besitzen und sich demnach in einem frühen Infektionsstadium befinden. Bei alleinigem Nachweis von IgG kann es sein, dass die Infektion bereits längere Zeit zurückliegt. Antikörper

gegen *Yersinia enterocolitica* können unabhängig von dem Erregernachweis im Kot mehrere Monate nach der Infektion noch nachweisbar sein. Allerdings persistiert *Yersinia enterocolitica* auch bei fehlender fäkaler Ausscheidung über Monate in den Tonsillen von Schweinen (KAPPERUD 1991). NIELSEN et al. (1996a) wiesen bei oral mit *Yersinia enterocolitica* O:3 infizierten Schweinen 70 Tage nach der Infektion trotz beendeter kulturell nachweisbarer Erregerausscheidung mit dem Kot Antikörper im Serum der Tiere nach. FUKUSHIMA et al. (1983) konnten bis zu vier Monate nach Infektion mit *Yersinia enterocolitica* O:3 noch Antikörper bei Schweinen nachweisen.

Schlussfolgerung

Im Hinblick auf die europäische Zoonosenrichtlinie und der in ihr geforderten Zoonosendiagnostik im Bestand und damit auf den gesundheitlichen Verbraucherschutz ist eine sichere Aussage über die Freiheit eines Bestandes von einem Erreger von besonderer Bedeutung. Es ist wichtig, dass ein Test eine hohe Verlässlichkeit bezüglich des negativen Befundes (negativer prädiktiver Wert) aufweist, um eine falsch negative Beurteilung möglichst ausschließen und so die Verbrauchergefährdung minimieren zu können. Aufgrund des negativen prädiktiven Wertes von 97,8% des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Immunfluoreszenztests erscheint der Einsatz dieser Untersuchungsmethode als ein schnelles und sicheres Verfahren in der Bestandsdiagnostik. Zur Erhöhung der Verbrauchersicherheit sollten fragliche Ergebnisse im Immunfluoreszenztest wie positive behandelt werden. Ein falsch positiver Befund birgt im Gegensatz zu einem falsch negativen Befund keine Gefahr für den Menschen, da nicht das infizierte Tier aufgrund eines falschen Testresultates als nichtinfiziert gälte, sondern lediglich ein Tier zuviel den infizierten Tieren zugeordnet würde. Vor dem Hintergrund der intermittierenden Erregerausscheidung und der allgemein nur geringen Keimzahl im Kot sollte die Probenzahl ausreichend hoch sein, um die Sicherheit der Aussage zu erhöhen.

6 Zusammenfassung

Anne Lisa Louis

Untersuchungen zum Nachweis von *Yersinia enterocolitica* im Kot von Mastschweinen mittels Immunfluoreszenztest

Yersinia enterocolitica ist der Erreger der weltweit vorkommenden humanen enteralen Yersiniose. Ein wichtiges Reservoir für den in Europa bedeutendsten Serotyp O:3 ist das Schwein, bei dem die Infektion in der Regel symptomlos abläuft. In der Richtlinie 2003/99/EG zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern ist der Erreger unter den je nach epidemiologischer Situation zu überwachenden Zoonoseerregern genannt. Aus diesem Grund ist für die Zukunft eine Reglementierung von Beständen, deren Tiere mit *Yersinia enterocolitica* infiziert sind, denkbar. Die bakteriologische Diagnostik von *Yersinia enterocolitica* ist aufwendig, daher war das Ziel der vorliegenden Untersuchung die Entwicklung eines sicheren, schnellen, einfach durchführbaren und kostengünstigen Tests zum Nachweis von *Yersinia enterocolitica* O:3 im Kot von Mastschweinen für die Bestandsdiagnostik.

Insgesamt wurden aus 10 Betrieben je 30 Kotproben von Mastschweinen mit einem Gewicht von mehr als 80 kg sowohl bakteriologisch und serologisch als auch mit einem indirekten Immunfluoreszenztest auf *Yersinia enterocolitica* untersucht. Proben, die im Immunfluoreszenztest positiv beurteilt wurden und in denen bakteriologisch *Yersinia enterocolitica* nicht nachweisbar war, wurden ergänzend mit einer PCR untersucht.

Entsprechend der bakteriologischen *Yersinia-enterocolitica*-Prävalenz in den Beständen wurden Gruppen gebildet ($\geq 40\%$, 20-30%, $\leq 10\%$ oder keine bakteriologisch positiven Proben). Innerhalb der bakteriologisch negativen Gruppe wurde zwischen Beständen mit hoher ($>97\%$) und niedriger ($<3\%$) serologischer Prävalenz unterschieden.

Von den 248 bakteriologisch *Yersinia-enterocolitica*-negativen Proben wurden im Immunfluoreszenztest 221 (89,1%) als negativ erkannt. Die übrigen negativen Proben waren in der Immunfluoreszenz entweder fraglich (4,4%) (n=11) oder gegenüber der bakteriologischen Untersuchung falsch positiv (6,5%) (n=16).

Ohne Berücksichtigung der fraglichen Proben ergibt sich im Vergleich mit der bakteriologischen Untersuchung eine Sensitivität von 89,4%. Die Spezifität beträgt 93,3%. Der positive prädiktive Wert liegt bei 72,4%. Der negative prädiktive Wert beträgt 97,8%.

Der bakteriologische Status des Bestandes bezüglich des Vorhandenseins von *Yersinia enterocolitica* konnte auch bei niedriger Prävalenz durch den Immunfluoreszenztest bestätigt werden.

Vor dem Hintergrund des Verbraucherschutzes vor Zoonosen erscheint der Immunfluoreszenztest durch die hohe Sicherheit negativer Befund für die Bestandsuntersuchung geeignet.

7 Summary

Anne Lisa Louis

Studies on detection of *Yersinia enterocolitica* in faeces of fattening pigs through immunofluorescence assay

Yersinia enterocolitica causes human enteral yersiniosis which is found all over the world. In Europe, the most important serotype is O:3. Pigs harbour this serotype normally without any clinical symptoms. In the EU directive 2003/99/EC on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, *Yersinia enterocolitica* is mentioned as a pathogen, which should be controlled according to the current epidemiologic situation in the Member State. In the future, a regimentation of *Yersinia-enterocolitica*-infected farms is thinkable. The bacteriological diagnosis of *Yersinia enterocolitica* is complex, so the objective of the present study was to develop a reliable, less time-consuming, easily feasible and cost-saving assay to detect *Yersinia enterocolitica* O:3 in fattening pigs' faeces as a diagnostic on farm level.

A total of 300 faecal samples taken at 10 farms (30 samples per farm) of pigs with a minimum weight of 80 kg was examined bacteriologically, serologically and with an indirect immunofluorescence antibody assay. Samples that were positive with the immunofluorescence assay and contained no culturally detectable *Yersinia enterocolitica* were additionally examined by PCR.

Groups were formed according to the bacteriological prevalence for *Yersinia enterocolitica* on the farm ($\geq 40\%$, 20-30%, $\leq 10\%$ or bacteriologically negative samples). Within the bacteriologically negative group, farms with high serological prevalence (97%) were differentiated from those with low serological prevalence (3%).

Of the total number of 248 bacteriologically *Yersinia-enterocolitica*-negative samples, 221 (89,1%) were also negative in the immunofluorescence assay. 11 samples

(4,4%) gave a questionable result and 16 samples (6,5%) were false positive compared to the bacteriological examination.

Not considering the questionable samples, the sensitivity of the immunofluorescence assay is at 89,4%, compared to the bacteriological examination. The specificity is at 93,3%. The positive predictive value results in 70,7%. The negative predictive value is at 97,8%.

The bacteriological result of a live stock as to the presence of *Yersinia enterocolitica* O:3 could be confirmed by the immunofluorescence assay even in stocks with low bacteriological prevalence.

Against the background of the consumer protection, the immunofluorescent assay for *Yersinia enterocolitica* O:3 is appropriate to detection on farm level because of the high certainty in getting correct negative findings.

8 Literaturverzeichnis

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

Comparative study of culture methods to detect *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 on swine tongues.

Zentralbl. Bakteriол. 272, 3, 306-12

ALEKSIC, S., u. J. BOCKEMÜHL (1984):

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

J. Clin. Microbiol. 20, 1, 99-102

ALEKSIC, S., u. J. BOCKEMÜHL (1990):

Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen.

Immun. Infekt. 18, 6, 178-85

ALEKSIC, S., u. J. BOCKEMÜHL (1996):

Untersuchungen von *Yersinia*-Stämmen aus Deutschland.

Bundesgesundheitsbl. 3, 94-97

ALEKSIC, S., u. J. BOCKEMÜHL (1999):

Yersinia and other *Enterobacteriaceae*.

In: MURRAY, P. R., E. J. BARON, M. A. PFALLER, F. C. TENOVER u. R. H. YOLKEN (Hrsg.): Manual of clinical microbiology.

Am. Soc. for Microbiol., Washington D.C., S. 483-496

ALEKSIC, S., A. G. STEIGERWALT, J. BOCKEMÜHL, G. P. HUNTLEY-CARTER u. D. J. BRENNER (1987):

Yersinia rhodei sp. nov. isolated from human and dog faeces and surface water.

Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 327-332

AMMON, A., W. H. MEHNERT, I. SCHÖNEBERG u. W. HELLENBRAND (1999):
Yersinia enterocolitica.

In: Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonosen-Infektionen nach der Zoonosen-RL (92/117/EWG) für das Jahr 1999.

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin,
S. 131-136

ANDERSEN, J. K. (1988):

Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica*.

Int. J. Food Microbiol. 7, 3, 193-202

ANDERSEN, J. K., R. SORENSEN u. M. GLENSBJERG (1991):

Aspects of the epidemiology of *Yersinia enterocolitica*: a review.

Int. J. Food Microbiol. 13, 3, 231-7

ARNOLD, T., A. HENSEL, R. HAGEN, S. ALEKSIC, H. NEUBAUER u. H. C. SCHOLZ (2001):

A highly specific one-step PCR - assay for the rapid discrimination of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* from pathogenic *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*.

Syst. Appl. Microbiol. 24, 2, 285-9

ARNOLD, T., H. NEUBAUER, K. NIKOLAOU, U. RÖSLER u. A. HENSEL (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, 1, 23-7

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

The prevalence of *Yersinia enterocolitica* 0:3 in Finnish pigs and pork.

Acta Vet. Scand. 31, 1, 39-43

ATANASSOVA, V., J. HUGENBERG u. C. RING (2003):

Detection of *Yersinia enterocolitica* in slaughter pigs.

In: SKURNIK, M., J. A. BENGOCHEA u. K. GRANFORS (Hrsg.): The Genus *Yersinia*.

Verlag Kluwer, New York, S. 325-7

AULISIO, C. C., I. J. MEHLMAN u. A. C. SANDERS (1980):

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

Appl. Environ. Microbiol. 39, 1, 135-40

BAKER, P. M., u. J. J. FARMER (1982):

New bacteriophage typing system for *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia frederiksenii* and *Yersinia intermedia*: correlation with serotyping, biotyping, and antibiotic susceptibility.

J. Clin. Microbiol. 15, 3, 491-502

BECKER, W. (2002):

Zoonosen-Fibel

Verlag H. Hoffmann, Berlin

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

Genus *Yersinia*.

In: KRIEG, N. R., u. J. G. HOLT (Hrsg.): BERGEY's manual of systematic bacteriology.

Verlag Williams & Wilkins, Baltimore, S. 498-506

BERCOVIER, H., A. G. STEIGERWALT, A. GUIYOULE, G. P. HUNTLEY-CARTER u. D. J. BRENNER (1984):

Yersinia aldovae (formerly *Yersinia enterocolitica*-Like Group X2): a New Species of *Enterobacteriaceae* Isolated from Aquatic Ecosystems.

Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 166-175

BERCOVIER, H., J. URSING, D. J. BRENNER, A. G. STEIGERWALT, G. R. FANNING, G. P. CARTER u. H. H. MOLLARET (1980):

Y. kristensenii: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of sucrose-negative strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like).

Curr. Microbiol. 4, 219-224

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

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

J. Clin. Microbiol. 25, 6, 1039-42

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

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

Appl. Environ. Microbiol. 63, 5, 1657-60

BIERMAYER, J. (1994):

Vorkommen und Nachweis von *Yersinia enterocolitica* beim Schlachtschwein in Österreich.

Wien. Tierärztl. Monatsschr. 81, 219

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

Yersiniosis in sheep due to *Yersinia enterocolitica*.

Br. Vet. J. 150, 5, 473-9

BISSETT, M. L., C. POWERS, S. L. ABBOTT u. J. M. JANDA (1990):

Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species: sources, frequency and serogroup distribution.

J. Clin. Microbiol. 28, 5, 910-2

BLAIS, B. W., u. L. M. PHILLIPE (1995):

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

Food Control 6, 211-214

BOCKEMÜHL, J., u. P. ROGGENTIN (2004):

Enterale Yersiniosen.

Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz 47, 685-691

BOCKEMÜHL, J., u. J. D. WONG (2003):

Yersinia.

In: MURRAY, P. R., E. J. BARON, J. H. JORGENSEN, M. A. PFALLER u. R. H. YOLKEN (Hrsg.): Manual of Clinical Microbiology.

Verlag ASM Press, Washington, 2, S. 672-681

BONARDI, S., F. BRINDANI, G. PIZZIN, L. LUCIDI, M. D'INCAU, E. LIEBANA u. S. MORABITO (2003):

Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy.

Int. J. Food Microbiol. 85, 1-2, 101-10

BONITZ, A. (2001):

Untersuchungen zur Diagnostik und Prävalenz von Infektionen durch *Lawsonia intracellularis* bei Schweinen unterschiedlicher Altersgruppen.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

BOTTONE, E. J. (1997):

Yersinia enterocolitica: the charisma continues.

Clin. Microbiol. Rev. 10, 2, 257-76

BOTTONE, E. J. (1999):

Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates.

Microbes Infect. 1, 4, 323-33

BRENNER, D. J. (1989):

DNA hybridization for characterization, classification and identification of bacteria.

In: SWAMINATHAN, B., u. G. PRAKASH (Hrsg.): Nucleic acid and Monoclonal Antibody Probes.

Verlag Marcel Dekker, New York, Basel, S. 75-104

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

Y. intermedia: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive, melibiose-positive, raffinose-positive strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like).

Curr. Microbiol. 4, 207-212

BRENNER, D. J., A. G. STEIGERWALT, D. P. FALCAO, R. E. WEAVER u. G. R. FANNING (1976):

Characterization of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by desoxyribonucleic acid hybridization and by biochemical reactions.

Int. J. Syst. Bacteriol 26, 2, 180-194

BUCCI, G., P. MAINI, L. PACIFICO, L. VOLTERRA u. C. CHIESA (1991):

Direct isolation of *Yersinia enterocolitica* from stool specimens of patients with intestinal disorders.

In: UNE, T., T. MARUYANNA u. M. TSUBOKURA (Hrsg): Current Investigations of the Microbiology of *Yersiniae*.

Verlag Karger, Basel, S. 50-5

BURGER, P., U. RÖSLER, T. ARNOLD, U. TRUYEN u. A. HENSEL (2004):

Experimentelle Pathogenitätsstudien mit humanpathogenen *Yersinia enterocolitica*-Bioserovaren beim Schwein.

In: DVG-Tagung der Fachgruppe 'Bakteriologie und Mykologie', Berlin 2004, S. V24

CARNIEL, E. (1995):

Chromosomal virulence factors of *Yersinia*: an update.

In: RAVAGNAN, G., u. C. CHIESA (Hrsg.): Yersiniosis: Present and Future.

Verlag Karger, Basel, S. 218-24

CARNIEL, E. (2003):

Evolution of pathogenic *Yersinia*, some lights in the dark.

In: SKURNIK, M., J. A. BENGOCHEA u. K. GRANFORS (Hrsg.): The Genus *Yersinia*.

Verlag Kluwer, New York, S. 3-12

CEDERBERG, A. (1968):

Demonstration of *Yersinia enterocolitica* by the fluorescent antibody technique.

Acta path. microbiol scand. 73, 646-652

CHIESA, C., u. E. J. BOTTONE (1983):

Serum resistance of *Yersinia enterocolitica* expressed in absence of other virulence markers.

Infect. Immun. 39, 1, 469-72

CHIU, H. J., D. M. FLYNN, A. V. HOFFRAND u. D. POLITIS (1986):

Infection with *Yersinia enterocolitica* in patients with iron overload.

Br. med. J. 292, 97

CHRISTENSEN, S. G. (1987):

The *Yersinia enterocolitica* situation in Denmark.

In: PRPIC, J. K., u. R. B. DAVEY (Hrsg.): The Genus *Yersinia*: Epidemiology, Molecular Biology and Pathogenesis.

Verlag Karger, Basel, S. 93-7

CIEBIN, B., J. WAN u. F. JAMIESON (2003):

Evaluation of a one-step biochemical screening test to determine pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*.

In: SKURNIK, M., J. A. BENGOCHEA u. K. GRANFORS (Hrsg.): The Genus *Yersinia*.

Verlag Kluwer, New York, S. 469-72

CORBEL, M. J., B. ELLIS, C. RICHARDSON u. R. BRADLEY (1992):

Experimental *Yersinia enterocolitica* placentitis in sheep.

Br. Vet. J. 148, 4, 339-49

DE BOER, E., u. J. F. NOUWS (1991):

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

Int. J. Food Microbiol. 12, 4, 375-8

DE BOER, E., u. W. M. SELDMAN (1987):

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

Int. J. Food Microbiol. 5, 95-101

DE GRANDIS., S. A., P. J. KRELL, D. E. FLETT u. R. M. W. STEVENSON (1988):

DNA relatedness of serovars of *Yersinia ruckeri* the enteric Redmouth Bacterium.

Int. J. Syst. Bacteriol. 38, 49-55

DE KONING, J., J. HEESEMANN, J. A. A. HOOGKAMP-KORSTANJ.E, J. J. M. FESTEN, P. M. HOUTMAN u. P. L. M. VAN OYEN (1989):

Yersinia in intestinal biopsy specimens from patients with seronegative spondylarthropathy: correlation with specific serum IgA antibodies.

J. Infect. Dis. 159, 109-112

DELOR, I., u. G. R. CORNELIS (1992):

Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits.

Infect. Immun. 60, 10, 4269-77

DELOR, I., A. KAECKENBEECK, G. WAUTERS u. G. R. CORNELIS (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, 9, 2983-8

DUFFY, G., u. J. J. SHERIDAN (1999):

The effect of pH and culture system on the attachment of plasmid-bearing and plasmid-cured *Yersinia enterocolitica* to a polycarbonate membrane in a surface adhesion immunofluorescent technique.

J. Appl. Microbiol. 86, 5, 867-73

DURISIN, M. D., A. IBRAHIM u. M. W. GRIFFITHS (1998):

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* using a digoxigenin labelled probe targeting the yst gene.

J. Appl. Microbiol. 84, 2, 285-92

ETHELBERG, S., K. E. OLSEN, P. GERNER-SMIDT u. K. MOLBAK (2004):

Household outbreaks among culture-confirmed. cases of bacterial gastrointestinal disease.

Am. J. Epidemiol. 159, 4, 406-12

EUROPÄISCHE UNION (2002a):

Report on Trends and sources of zoonotic agents in the European Union and Norway.

[Internet: URL:

http://europa.eu.int/comm/food/biosafety/salmonella/zoonoses_reps_2002_en.htm],

EUROPÄISCHE UNION (2002b):

Report on Trends and sources of zoonotic agents in the European Union and Norway.

[Internet: URL: <http://europa.eu.int/comm/food/food/biosafety/salmonella/>

[13_gastrointestinal_infections_2002.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/food/biosafety/salmonella/13_gastrointestinal_infections_2002.pdf)

EWING, W. H., A. J. ROSS, D. J. BRENNER u. G. R. FANNING (1978):

Yersinia ruckeri sp. nov., the redmouth (RM) Bacterium.

Int. J. Syst. Bacteriol. 28, 37-44

FANTASIA, M., M. GRAZIA MINGRONE, D. CROTTI u. C. BOSCATO (1985):

Isolation of *Yersinia enterocolitica* biotype 4 serotype O:3 from canine sources in Italy.

J. Clin. Microbiol. 22, 2, 314-5

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

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

Vet. Rec. 132, 21, 532-4

FENG, P., S. P. KEASLER u. W. E. HILL (1992):

Direct identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by polymerase chain reaction amplification.

Transfusion 32, 9, 850-4

FENWICK, S. G., u. A. MURRAY (1991):

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction.

Lancet 337, 8739, 496-7

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

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

Epidemiol. Infect. 113, 3, 471-7

FREDRIKSEN, W. (1964):

A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria ("*Bacterium enterocoliticum*" and "*Pasteurella X*").

In: 14. Scand. Congr. Path. Microbiol., Oslo 1964, S. 103-104

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

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

Syst. Appl. Microbiol. 24, 3, 457-63

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

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

Epidemiol. Infect. 127, 1, 37-47

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

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

J. Food Prot. 62, 2, 123-7

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

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

Int. J. Food Microbiol. 95, 1, 89-94

- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., T. KORTE u. H. KORKEALA (2000):
Contamination of carcasses, offals, and the environment with yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in a pig slaughterhouse.
J. Food Prot. 63, 1, 31-5
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., T. KORTE u. H. KORKEALA (2001c):
Transmission of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 to pets via contaminated pork.
Lett. Appl. Microbiol. 32, 6, 375-8
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., U. LYHS, T. KORTE u. H. KORKEALA (2001d):
Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food samples at retail level in Finland.
Arch. Lebensmittelhyg. 52, 66-68
- FUKUSHIMA, H. (1987):
New selective agar medium for isolation of virulent *Yersinia enterocolitica*.
J. Clin. Microbiol. 25, 6, 1068-73
- FUKUSHIMA, H., R. NAKAMURA, S. IITSUKA, M. TSUBOKURA, K. OTSUKI u. Y. KAWAOKA (1984a):
Prospective systematic study of *Yersinia* spp. in dogs.
J. Clin. Microbiol. 19, 5, 616-22
- FUKUSHIMA, H., R. NAKAMURA, Y. ITO, K. SAITO, M. TSUBOKURA u. K. OTSUKI (1983):
Ecological studies of *Yersinia enterocolitica*. I. Dissemination of *Y. enterocolitica* in pigs.
Vet. Microbiol. 8, 5, 469-83

FUKUSHIMA, H., R. NAKAMURA, Y. ITO, K. SAITO, M. TSUBOKURA u. K. OTSUKI (1984b):

Ecological studies of *Yersinia enterocolitica*. II. Experimental infection with *Y. enterocolitica* in pigs.

Vet. Microbiol. 9, 4, 375-81

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

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

J. Food Prot. 61, 6, 677-82

GARIN-BASTUJI, B., N. HUMMEL, G. GERBIER, C. CAU, R. POUILLOT, M. DA COSTA u. J. J. FONTAINE (1999):

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

Vet. Microbiol. 66, 3, 223-33

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

Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*.

Infect. Immun. 27, 2, 682-5

GONZALEZ HEVIA, M. A., J. A. ALVAREZ RIESGO u. M. C. MENDOZA (1990):

Epidemiological, clinical and microbiological features of *Yersinia enterocolitica* infections in a community during a four-year period.

Eur. J. Epidemiol. 6, 2, 184-90

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

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

Emerg. Infect. Dis. 5, 5, 719-21

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

Persistence of *Yersinia* antigens in peripheral blood cells from patients with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection with or without reactive arthritis.

Arthritis Rheum. 41, 5, 855-62

GUNSEN, U. (2003):

Growth of *Yersinia enterocolitica* in Inegol meatballs.

In: SKURNIK, M., J. A. BENGOCHEA u. K. GRANFORS (Hrsg.): The Genus *Yersinia*.

Verlag Kluwer, New York, S. 359-62

HAMMERSCHMIDT, W., u. E. HELLMANN (1981):

Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia enterocolitica* aus epidemiologischer Sicht-Übersichtsreferat.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 94, 24, 481-4

HARNETT, N., Y. P. LIN u. C. KRISHNAN (1996):

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

Epidemiol. Infect. 117, 1, 59-67

HARTUNG, M. (2000):

Mitteilungen der Länder über *Y. enterocolitica*-Nachweise in Deutschland.

In: Bundesinstitut für gesundheitl. Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (Hrsg.):
bgvv-Hefte 08/2000.

Berlin, S. 133-136

HÄSSIG, A., J. KARRER u. F. PUSTERLA (1949):

Über Pseudotuberkulose beim Menschen.

Schweiz. med. Wochenschr. 41, 971-973

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

Experimental infection with *Yersinia enterocolitica* serovar 0:8 in beagle dogs.

Vet. Microbiol. 47, 1-2, 71-7

HEESEMANN, J. (1990):

Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische
Methoden.

Immun. Infekt. 18, 6, 186-91

HEESEMANN, J., C. EGGERS u. J. SCHRÖDER (1987):

Serological diagnosis of yersiniosis by immunoblot technique using virulence-
associated antigen of enteropathogenic *Yersiniae*.

In: PRPIC, J. K., u. R. B. DAVEY (Hrsg.): The Genus *Yersinia*: Epidemiology,
Molecular Biology and Pathogenesis.

Verlag Karger, Basel, S. 285-9

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

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

Infect. Immun. 54, 2, 561-7

HEESEMANN, J., K. HANTKE, T. VOCKE, E. SAKEN, A. RAKIN, I. STOJILJKOVIC u. R. BERNER (1993):

Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity.

Mol. Microbiol. 8, 2, 397-408

HEESEMANN, J., u. H. KARCH (1995):

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

Internist 36, 2, 102-5

HELMS, M., P. VASTRUP, P. GERNER-SMIDT u. K. MOLBAK (2003):

Short and long term mortality associated with foodborn bacterial gastrointestinal infections: registry based study.

Br. med. J. 326, 7385, 357

HENNIG, I., K.-H. WALDMANN, M. GANTER u. G.-F. GERLACH (1998):

Klinische und labordiagnostische Befunde bei der chronischen Pleuropneumonie des Schweines.

Tierärztl. Praxis Ausg. G, 26, 78-84

HENSEL, A., K. NIKOLAOU, C. BARTLING, T. PETRY, T. ARNOLD, U. RÖSLER, C. P. CZERNY, U. TRUYEN u. H. NEUBAUER (2004):

Zur Prävalenz von Anti-*Yersinia*-Outer-Protein-Antikörpern bei Schlachtschweinen in Bayern.

Berl. Münch. Tierärztl Wochenschr. 117, 1-2, 30-8

HOLT, J. G. (1994):

Bergey's manual of determinative bacteriology

9. Aufl. Verlag William & Wilkins, Baltimore

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

Incidence of Human Infection with *Yersinia enterocolitica* Serotypes O:3, O:8 and O:9 and the Use of Indirect Immunofluorescence in Diagnosis.

J. Inf. Dis. 153, 1, 138-141

HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A., J. DE KONING, J. HEESEMANN, J. J. M. FESTEN, P. M. HOUTMAN u. P. L. M. VAN OYEN (1992):

Influence of antibiotics on IgA and IgG response and persistence of *Yersinia enterocolitica* in patients with *Yersinia* associated spondylarthropathy.

Infection 20, 53-57

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

A rapid and sensitive method for the detection of *Yersinia enterocolitica* strains from Clinical samples.

Lett. Appl. Microbiol. 33, 6, 445-9

IBRAHIM, A. (1995):

Genetic diversity among *Yersinia enterocolitica* strains as revealed by sequence analysis of the 16S rRNA gene.

In: RAVAGNAN, H., u. C. CHIESA (Hrsg.): Yersiniosis: Present and Future.

Verlag Karger, Basel, S. 277-80

JOHANNESSEN, G. S., G. KAPPERUD u. H. KRUSE (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, 1-2, 75-80

JONES, T. F. (2003):

From pig to pacifier: chitterling-associated yersiniosis outbreak among black infants.

Emerg. Infect. Dis. 9, 8, 1007-9

JOURDAN, A. D., S. C. JOHNSON u. I. V. WESLEY (2000):

Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the ail gene of pathogenic *Yersinia enterocolitica*.

Appl. Environ. Microbiol. 66, 9, 3750-5

KAMPELMACHER, E. H., W. EDEL, P. A. GUINEE u. L. M. VAN NOORLE JANSEN (1969):

Experimental *Salmonella* infections in pigs.

Zentralbl. Veterinärmed. B, 16, 717-724

KANDOLO, K., u. G. WAUTERS (1985):

Pyrazinamidase activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms.

J. Clin. Microbiol. 21, 6, 980-2

KAPPERUD, G. (1991):

Yersinia enterocolitica in food hygiene.

Int. J. Food Microbiol. 12, 1, 53-65

KAPPERUD, G., T. NESBAKKEN u. K. DOMMARSNES (1991):

Application of restriction endonuclease analysis and genetic probes in the epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infection.

In: UNE, T., T. MARUYANNA u. M. TSUBOKURA (Hrsg.): *Current Investigations of the Microbiology of Yersinia*.

Verlag Karger, Basel, S. 68-74

KAPPERUD, G., T. VARDUND, E. SKJERVE, E. HORNES u. T. E. MICHAELSEN (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

KAPPERUD, G., S. M. OSTROFF, T. NESBAKKEN, L. C. HUTWAGNER, N. H. BEAN, J. LASSEN u. R. V. TAUXE (1995):

Risk factors for sporadic *Yersinia enterocolitica* infections in Norway: a case-control study.

In: RAVAGNAN, G., u. C. CHIESA (Hrsg.): *Yersiniosis: Present and Future*.

Verlag Karger, Basel, S. 25-8

KARLSSON, K. A., B. HURVELL u. E. THAL (1973):

On the Detection of *Yersinia enterocolitica* by the Immunofluorescent Method.

In: WINBLAD, S. (Hrsg.): *Yersinia, Pasteurella and Francisella*.

Verlag Karger, Basel, S. 71-75

KEET, E. E. (1974):

Yersinia enterocolitica septicemia. Source of infection and incubation period identified.

N. Y. State J. Med. 74, 12, 2226-30

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

Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9 II the use of *Yersinia* outer proteins for the specific detection of *Yersinia enterocolitica* infections in ruminants.

Vet. Microbiol. 47, 3-4, 271-80

KNAPP, W., u. E. THAL (1963):

Untersuchungen über die kulturellbiochemischen, serologischen, tierexperimentellen und immunologischen Eigenschaften einer vorläufig '*Pasteurella X*' benannten Bakterienart.

Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. Abt. I Orig. A 190, 472-484

KONTIAINEN, S., A. SIVONEN u. O. V. RENKONEN (1994):

Increased yields of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by cold enrichment.

Scand. J. Infect. Dis. 26, 6, 685-91

KORTE, T., M. FREDRIKSSON-AHOMAA u. H. KORKEALA (2003):

Prevalence and characterisation of yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in pig tonsils in 1995 and 1999.

In: SKURNIK, M., J.. A. BENGOCHEA u. K. GRANFORS (Hrsg.): The Genus *Yersinia*.

Verlag Kluwer, New York, S. 367-9

KRAUSS, H., A. WEBER, M. APPEL, B. ENDERS, A. V. GRAEVENITZ, H. D. ISENBERG, H. G. SCHIEFER, W. SLENZCKA u. H. ZAHNER (2004):

Zoonosen.

Deutscher Ärzte-Verlag, Köln

KWAGA, J., u. J. O. IVERSEN (1992):

Laboratory investigation of virulence among strains of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from pigs and pork products.

Can. J. Microbiol. 38, 2, 92-7

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

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

J. Clin. Microbiol. 30, 10, 2668-73

LACHICA, R. V., u. D. L. ZINK (1984):

Determination of plasmid-associated hydrophobicity of *Yersinia enterocolitica* by a latex particle agglutination test.

J. Clin. Microbiol. 19, 5, 660-3

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

Correlation of autoagglutination and virulence of *Yersiniae*.

J. Clin. Microbiol. 11, 4, 430-2

LETELLIER, A., S. MESSIER u. S. QUESSY (1999):

Prevalence of *Salmonella spp.* and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoirs.

J. Food Prot. 62, 1, 22-5

LI, Q., M. E. DISANTO u. W. E. MAGEE (1992):

A rapid method for detection of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 in pig feces using monoclonal antibodies.

Vet. Microbiol. 32, 1, 29-41

LIMET, J. N., P. KERKHOFS, R. WIJFFELS u. P. DEKEYSER (1988):

Le diagnostic sérologique de la brucellose bovine par ELISA.

Ann. Médecine vét. 132, 565-575

LOGUE, C. M., J. J. SHERIDAN, G. WAUTERS, D. A. MCDOWELL u. I. S. BLAIR (1996):

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

Int. J. Food Microbiol. 33, 2-3, 257-74

LUDES, A., u. R. WEISS (1984):

Zum Vorkommen von *Yersinia Enterocolitica* bei Schafen.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 97, 6, 198-202

MAKI-IKOLA, O., J. HEESEMANN, A. TOIVANEN u. K. GRANFORS (1997):

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

Rheumatol. Int. 16, 6, 227-9

MALASSEZ, L., u. W. VIGNAL (1883):

Physiologie pathologique-Tuberculose zoogléique.

C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 97, 1006-1009

McIVER, M. A., u. R. M. PIKE (1934):

Chronic glanders-like infection of face caused by an organism resembling *Flavobacterium pseudomallei*.

In: Clinical miscellany.

Mary Imogene Basset Hospital, Cooperstown, New York, S. 16-21

MCNALLY, A., T. CHEASTY, C. FEARNLEY, R. W. DALZIEL, G. A. PAIBA, G. MANNING u. D. G. NEWELL (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, 1, 103-8

MEHNERT, W. H., I. SCHÖNEBERG u. A. AMMON (2001):

Infektionen mit Salmonellen beim Menschen.

In: Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonosen-Infektionen nach der Zoonosen-RL (92/117/EWG) für das Jahr 2000.

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin, S. 11-13

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

Risk of *Yersinia* infection among butchers.

Scand. J. Infect. Dis. 23, 1, 55-61

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

Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells.

Infect. Immun. 56, 5, 1242-8

MOLLARET, H. H., H. BERCOVIER u. J. M. ALONSO (1979):

Summary of the data received at the WHO Reference Center for *Yersinia enterocolitica*.

In: CARTER, P. B. (Hrsg.): *Yersinia enterocolitica*: biology, epidemiology and pathology.

Verlag Karger, Basel, S. 174-84

MOLLARET, H. H., u. E. THAL (1974):

Yersinia.

In: BUCHANAN, R. E., u. N. E. GIBBONS (Hrsg.): Bergey's manual of determinative bacteriology.

8. Aufl. Verlag Williams & Wilkins, Baltimore, S. 330-332

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

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

Zentralbl. Veterinärmed. B 45, 1, 59-64

NAJDENSKI, H., S. NIKOLOVA, A. VESSELINOVA, P. NEIKOV u. P. DRAGIEV (1996):

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

In: 14. Kongr. Int. Tierärztl. Ges. Fachgeb. Schweine, Bologna 1996, Kongr.ber., S. 332

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

Die *Yersinia enterocolitica*-Infektion bei landwirtschaftlichen Nutztieren.

Monatsh. Veterinärmed. 41, 23-26

NATTERMANN, H., F. HORSCH, M. SEEGER, W. DEE, C. SCHLINGMANN u. H. SCHLINGMANN (1985):

Epizootiologie der *Yersinia enterocolitica*-Infektion in einem Schweinebestand.

Monatsh. Veterinärmed. 40, 366-370

NESBAKKEN, T., u. E. BORCH (1995):

Prophylactic measures in order to reduce contamination of pig carcasses with *Yersinia enterocolitica* during slaughter.

In: RAVAGNAN, G., u. C. CHIESA (Hrsg.): Yersiniosis: Present and Future.

Verlag Karger, Basel, S. 62-6

- NESBAKKEN, T., K. ECKNER, H. K. HOIDAL u. O. J. ROTTERUD (2003):
Occurrence of *Y. enterocolitica* in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering and dressing procedures.
In: SKURNIK, M., J. A. BENGOCHEA u. K. GRANFORS (Hrsg.): The Genus *Yersinia*.
Verlag Kluwer, New York, S. 303-8
- NESBAKKEN, T., G. KAPPERUD, J. LASSEN u. E. SKJERVE (1991):
Yersinia enterocolitica O:3 antibodies in slaughterhouse employees, veterinarians and military recruits. Occupational exposure to pigs as a risk factor for yersiniosis.
In: UNE, T., T. MARUYANNA, M. TSUBOKURA (Hrsg.): Current Investigations of the Microbiology of *Yersiniae*
Verlag Karger, Basel, 32-9
- NESBAKKEN, T., E. NERBRINK, O. J. ROTTERUD u. E. BORCH (1994):
Reduction of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria spp.* on pig carcasses by enclosure of the rectum during slaughter.
Int. J. Food Microbiol. 23, 2, 197-208
- NEUBAUER, H. (2001):
Molekulare Epidemiologie und Diagnostik von Yersinien-Infektionen.
Leipzig, Univ., Veterinärmed. Fak., Habil.-Schr.
- NEUBAUER, H., S. ALEKSIC, A. HENSEL, E. J. FINKE u. H. MEYER (2000a):
Yersinia enterocolitica 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups.
Int. J. Med. Microbiol. 290, 1, 61-4

NEUBAUER, H., A. HENSEL, S. ALEKSIC u. H. MEYER (2000b):

Identification of *Yersinia enterocolitica* within the genus *Yersinia*.

Syst. Appl. Microbiol. 23, 1, 58-62

NEUBAUER, H., L. RAHALISON, T. J. BROOKS, S. ALEKSIC, S. CHANTEAU u. W. D. SPLETTSTOSSER (2000c):

Serodiagnosis of human plague by an anti-F1 capsular antigen specific IgG/IgM ELISA and immunoblot.

Epidemiol. Infect. 125, 3, 593-7

NEUBAUER, H., U. REISCHL, J. KOSTLER, S. ALEKSIC, E. J. FINKE u. H. MEYER (1999):

Variations in the 16S rRNA gene sequence of *Yersinia enterocolitica* isolates influence the specificity of molecular identification systems.

Zentralbl. Bakteriolog. 289, 3, 329-37

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

Comparison of systems for identification and differentiation of species within the genus *Yersinia*.

J. Clin. Microbiol. 36, 11, 3366-8

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

Yersinia-enterocolitica-Infektionen: 2. Bedeutung bei Menschen.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 114, 3-4, 81-7

NICOLET, J. (1985):

Kompendium der veterinärmedizinischen Bakteriologie

Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg

NICOLLE, P., H. H. MOLLARET u. J. BRAULT (1973):

Recherches sur la lysogénie, la lysosensibilité, la lysotypie et la sérologie de *Yersinia enterocolitica*.

In: WINBLAD, S. (Hrsg.): *Yersinia, Pasteurella and Francisella*.

Verlag Karger, Basel, S. 54-58

NIELSEN, B., A. WINGSTRAND u. C. HEISEL (1995)

Detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 Specific Antibodies in Experimentally Infected Pigs by an Indirect LPS ELISA.

In: RAVAGNAN, G., u. C. CHIESA (Hrsg.): *Yersiniosis: Present and Future*

Verlag Karger, Basel, S. 117-119

NIELSEN, B., C. HEISEL u. A. WINGSTRAND (1996a):

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

Vet. Microbiol. 48, 293-303

NIELSEN, B., u. H. C. WEGENER (1997):

Public health and pork and pork products: regional perspectives of Denmark.

Rev. Sci. Tech. 16, 2, 513-24

NIELSEN, B., A. WINGSTRAND u. C. HEISEL (1996b):

Yersinia enterocolitica O:3 infection in danish swine herds.

In: 14. Kongr. Int. Tierärztl. Ges., Fachgeb. Schweine, Bologna 1996b, S. 333

NIKOLAOU, K., A. HENSEL, U. RÖSLER, M. GANTER, T. ARNOLD u. H. NEUBAUER (2002):

Seroprävalenz von anti-*Yersinia* Antikörpern in deutschen Ziegenbeständen.

In: DVG Tagung Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie, Hannover 2002

NILEHN, B. (1969):

Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease.

Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. 206, 1-48

NILEHN, B., u. C. ERICSON (1969):

Studies on *Yersinia enterocolitica*. Bacteriophages liberated from chloroform treated cultures.

Acta Pathol. Microbiol. Scand. 75, 1, 177-87

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

Detection of *Yersinia enterocolitica* in food by PCR amplification.

Lett. Appl. Microbiol. 26, 2, 140-4

OFFERMANN, U., T. BODMER, L. AUDIGE u. T. JEMMI (1999):

Verbreitung von Salmonellen, Yersinien und Mykobakterien bei Schlachtschweinen in der Schweiz.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 141, 11, 509-15

OSTROFF, S. M., G. KAPPERUD, L. C. HUTWAGNER, T. NESBAKKEN, N. H. BEAN, J. LASSEN u. R. V. TAUXE (1994):

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

Epidemiol. Infect. 112, 1, 133-41

PAI, C. H., u. V. MORS (1978):

Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*.

Infect. Immun. 19, 3, 908-11

PAI, C. H., V. MORS u. T. A. SEEMAYER (1980):

Experimental *Yersinia enterocolitica* enteritis in rabbits.

Infect. Immun. 28, 1, 238-44

PETERSEN, A. M., S. V. NIELSEN, D. MEYER, P. GANER u. K. LADEFOGED (1996):

Bacterial gastroenteritis among hospitalized patients in a Danish County, 1991-93.

Scand. J. Gastroenterol. 31, 9, 906-11

PHILBEY, A. W., J. R. GLASTONBURY, I. J. LINKS u. L. M. MATTHEWS (1991):

Yersinia species isolated from sheep with enterocolitis.

Aust. Vet. J. 68, 3, 108-10

PILON, J., R. HIGGINS u. S. QUESSY (2000):

Epidemiological study of *Yersinia enterocolitica* in swine herds in Québec.

Can. Vet. J. 41, 5, 383-7

POLJAK, Z., T. ROSENDAL, R. FRIENDSHIP, C. DEWEY u. B. CIEBIN (2004):

The presence of *Yersinia enterocolitica* in grower-finisher pigs.

In: 18. Kongr. Int. Tierärztl. Ges., Fachgeb. Schweine, Hamburg 2004, 2, S. 659

PORTNOY, D. A., u. S. FALKOW (1981):

Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*.

J. Bacteriol. 148, 3, 877-83

PRPIC, J. K., R. M. ROBINS-BROWNE u. R. B. DAVEY (1983):

Differentiation between virulent and avirulent *Yersinia enterocolitica* isolates by using Congo red agar.

J. Clin. Microbiol. 18, 3, 486-90

PRPIC, J. K., R. M. ROBINS-BROWNE u. R. B. DAVEY (1985):

In vitro assessment of virulence in *Yersinia enterocolitica* and related species.

J. Clin. Microbiol. 22, 1, 105-10

RASMUSSEN, H. N., O. F. RASMUSSEN, J. K. ANDERSEN u. J. E. OLSEN (1994):

Specific detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by two-step PCR using hot-start and DMSO.

Mol. Cell. Probes 8, 2, 99-108

RATNAM, S., E. MERCER, B. PICCO, S. PARSONS u. R. BUTLER (1982):

A nosocomial outbreak of diarrheal disease due to *Yersinia enterocolitica* serotype 0:5, biotype 1.

J. Infect. Dis. 145, 2, 242-7

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2002a):

Epidemiolog. Bulletin Nr. 50.

Robert-Koch-Institut, Berlin

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2002b):

Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Lebensmittelbedingte Erkrankungen in Deutschland.

Robert-Koch-Institut, Berlin

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2003a):

Epidemiolog. Bulletin Nr. 50.

Robert-Koch-Institut, Berlin

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2003b):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002.

Robert-Koch-Institut, Berlin

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2004):

Epidemiolog. Bulletin Nr. 50.

Robert-Koch-Institut, Berlin

ROBINS-BROWNE, R. M., A. M. BORDUN u. K. J. SLEE (1993):

Serological response of sheep to plasmid-encoded proteins of *Yersinia* species following natural infection with *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*.

J. Med. Microbiol. 39, 4, 268-72

RUCKDESCHEL, K. (2002):

Immunomodulation of macrophages by pathogenic *Yersinia* species.

Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 50, 2, 131-7

SAUER, T. (1996):

Zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Rohmilch.

München, Univ., Veterinärmed. Fak., Diss.

SCHIAMANN, D. A. (1979):

Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*.

Can. J. Microbiol. 25, 11, 1298-1304

SCHIAMANN, D. A. (1989):

Yersinia enterocolitica and *Yersinia pseudotuberculosis*.

In: DOYELE, M. P. (Hrsg.): Foodborne Bacterial Pathogens.

Verlag Marcel Dekker, New York,

SCHIAMANN, D. A., u. J. A. DEVENISH (1982):

Relationship of HeLa cell infectivity to biochemical, serological and virulence characteristics of *Yersinia enterocolitica*.

Infect. Immun. 35, 2, 497-506

SCHIEHMANN, D. A., u. P. J. SWANZ (1985):

Epithelial cell association and hydrophobicity of *Yersinia enterocolitica* and related species.

J. Med. Microbiol. 19, 3, 309-15

SCHLEIFSTEIN, J., u. M. B. COLEMAN (1939):

An unidentified microorganism resembling *B. liegneri* and *Past. pseudotuberculosis* and pathogenic for man.

N. Y. State J. Med. 39, 1749-1753

SCHMIDT, M., u. K. K. SETHI (1987):

Production and characterization of monoclonal antibodies specific for pathogenic serogroups O:3, O:8 and O:9 of *Yersinia enterocolitica*.

Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol Hyg [A] 265, 1-2, 113-23

SCHOILEW, C., u. A. KOSAROW (1987):

Yersinia enterocolitica infections in man and in some species of farm animal in Bulgaria.

Monatsh. Veterinärmed. 42, 5, 164-165

SELBITZ, H. J. (2002):

Bakterielle Krankheiten der Tiere.

In: MAYR, A. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

7. Aufl. Verlag Enke, Stuttgart, S. 417-488

SHERIDAN, J. J., C. M. LOGUE, D. A. MCDOWELL, I. S. BLAIR, T. HEGARTY u. P. TOIVANEN (1998):

The use of a surface adhesion immunofluorescent (SAIF) method for the rapid detection of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 in meat.

J. Appl. Microbiol. 85, 4, 737-45

SHIOZAWA, K., T. NISHINA, Y. MIWA, T. MORI, S. AKAHANE u. K. ITO (1991):

Colonization of the tonsils of swine by *Yersinia enterocolitica*.

In: UNE, T., T. MARUYANNA u. M. TSUBOKURA (Hrsg.): Current Investigations of the Microbiology of *Yersiniae*.

Verlag Karger, Basel, S. 63-67

SKJERVE, E., B. LIUM, B. NIELSEN u. T. NESBAKKEN (1998):

Control of *Yersinia enterocolitica* in pigs at herd level.

Int. J. Food Microbiol. 45, 3, 195-203

SLEE, K. J., u. C. BUTTON (1990):

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

Aust. Vet. J. 67, 11, 396-8

SLEE, K. J., u. N. W. SKILBECK (1992):

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

J. Clin. Microbiol. 30, 3, 712-5

SOULIAS, J. (1976):

Infection à *Yersinia enterocolitica* chez l'animal. Bilan des connaissances actuelles.

Paris, S. 1-115, Diss.

STENHOUSE, M. A., u. L. V. MILNER (1982):

Yersinia enterocolitica. A hazard in blood transfusion.

Transfusion 22, 5, 396-8

STOJEK, N. M. (1999):

Seroepidemiologic study on the occurrence of antibodies against *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in urban and rural population of the Lublin region (eastern Poland).

Ann. Agric. Environ. Med. 6, 1, 57-61

STOLK-ENGELAAR, V. M., u. J. A. HOOGKAMP-KORSTANJE (1996):

Clinical presentation and diagnosis of gastrointestinal infections by *Yersinia enterocolitica* in 261 Dutch patients.

Scand. J. Infect. Dis. 28, 6, 571-5

STORCH, W. B. (1997):

Immunfluoreszenzfibel, Grundlagen und neue Anwendungen in der klinischen Immunologie.

2. Aufl. Verlag Blackwell, Berlin u. Wien, S. 30-33

STROBEL, E., J. HEESEMANN, G. MAYER, J. PETERS, S. MÜLLER-WEIHRICH u. P. EMMERLING (2000):

Bacteriological and serological findings in a further case of transfusion-mediated *Yersinia enterocolitica* sepsis.

J. Clin. Microbiol. 38, 7, 2788-90

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

Yersinia enterocolitica infections and pork: the missing link.

Lancet 1, 8542, 1129-32

TENNANT, S. M., N. A. SKINNER, A. JOE u. R. M. ROBINS-BROWNE (2003):

Yersinia enterocolitica biotype 1A: not as harmless as you think.

In: SKURNIK, M., J. A. BENGOCHEA u. K. GRANFORS (Hrsg.): The Genus *Yersinia*.

Verlag Kluwer, New York, S. 125-8

THIBODEAU, V., E. H. FROST, S. CHENIER u. S. QUESSY (1999):

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

Can. J. Vet. Res. 63, 2, 96-100

THIBODEAU, V., E. H. FROST u. S. QUESSY (2001):

Development of an ELISA procedure to detect swine carriers of pathogenic *Yersinia enterocolitica*.

Vet. Microbiol. 82, 3, 249-59

TOIVANEN, P., u. A. TOIVANEN (1994):

Does *Yersinia* induce autoimmunity?

Int. Arch. Allergy Immunol. 104, 2, 107-11

TOIVANEN, P., A. TOIVANEN, L. OLKKONEN u. S. AANTAA (1973):

Hospital outbreak of *Yersinia enterocolitica* infection.

Lancet 1, 7807, 801-3

TOMA, S., u. V. R. DEIDRICK (1975):

Isolation of *Yersinia enterocolitica* from swine.

J. Clin. Microbiol. 2, 6, 478-481

TZIPORI, S., R. ROBINS-BROWNE u. J. K. PRPIC (1987):

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

In: PRPIC, J. K., u. R. B. DAVEY (Hrsg.): The Genus *Yersinia*: Epidemiology, Molecular Biology and Pathogenesis.

Verlag Karger, Basel, S. 233-8

UENO, H., K. KANEKO u. N. HASHIMOTO (1981):

Fecal excretion of *Yersinia enterocolitica* in mice and rats inoculated intragastrically.

Jpn. J. Vet. Res., 29, 67-72

URSING, J., D. J. BRENNER, H. BERCOVIER, G. R. FANNING, A. G. STEIGERWALT, J. BRAULT u. H. H. MOLLARET (1980):

Y. frederiksenii: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like).

Curr. Microbiol. 4, 213-217

VAN LOGHEM, J. J. (1944):

The classification of the Plague-Bacillus.

Antonie Van Leeuwenhoek 10, 15-16

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

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

J. Clin. Microbiol. 11, 2, 127-31

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

Surveillance of human *Yersinia enterocolitica* infections in Belgium: 1967-1996.
Clin. Infect. Dis. 27, 1, 59-64

VON ALTROCK, A., u. K. H. WALDMANN (2003):

Ausblick zur Bekämpfung aktueller Zoonosen des Schweins - ein Beitrag zum Verbraucherschutz.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 110, 9, 354-7

WALDMANN, K. H., M. WENDT u. G. AMTSBERG (2000):

Untersuchungen zur *Brachyspira*-Diagnostik und Behandlungsstrategie bei der Schweinedysenterie.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 107, 12, 486-9

WAUTERS, G. (1973):

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

In: WINBLAD, S. (Hrsg.): *Yersinia, Pasteurella and Francisella*.

Verlag Karger, Basel, S.68-70

WAUTERS, G. (1981):

Antigens of *Yersinia enterocolitica*.

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

Verlag CRC Press, Boca Raton, S. 41-53

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

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

Appl. Environ. Microbiol. 54, 4, 851-4

WAUTERS, G., M. JANSSENS, A. G. STEIGERWALT u. D. J. BRENNER (1988b):
Yersinia mollaretii sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov., formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A and 3B.
Int. J. Syst. Bacteriol. 38, 424-429

WAUTERS, G., K. KANDOLO u. M. JANSSENS (1987):
Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*.
In: PRPIC, J. K., u. R. B. DAVEY (Hrsg.): The Genus *Yersinia*: Epidemiology, Molecular Biology and Pathogenesis.
Verlag Karger, Basel, S. 14-21

WEBER, A., u. C. LEMBKE (1981):
Untersuchungen zum Vorkommen von humanpathogenen *Yersinia enterocolitica* bei Katzen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 94, 325-327

WEYNANTS, V., A. TIBOR, P. A. DENOEL, C. SAEGERMAN, J. GODFROID, P. THIANGE u. J. J. LETESSON (1996):
Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests.
Vet. Microbiol. 48, 1-2, 101-12

WINGSTRAND, A., u. B. NIELSEN (1996):
Cross-sectional investigation of pig herds for *Yersinia enterocolitica*.
In: 14. Kongr. Int. Tierärztl. Ges., Fachgeb. Schweine, Bologna 1996, S. 320

WREN, B. W., u. S. TABAQCHALI (1990):
Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction.
Lancet 336, 8716, 693

WUTHE, H. H., u. S. ALEKSIC (1997):

Yersinia enterocolitica Serovar 2a, 2b, 3:b,c Biovar 5 bei Infektionen von Feldhase und Schaf.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 110, 5, 176-7

ZINK, D. L., J. C. FEELEY, J. G. WELLS, C. VANDERZANT, J. C. VICKERY, W. D. ROOF u. G. A. O'DONOVAN (1980):

Plasmid-mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica*.

Nature 283, 5743, 224-6

9 Anhang

9.1 Chemikalien und Reagenzien

9.1.1 Pufferlösung für den Immunfluoreszenztest

PBS-Lösung

0,312g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

2,56g Na_2HPO_4

17g NaCl

ad 2l Aqua dest., Einstellen des pH mittels 1M NaOH bzw. 1M HCl auf 7,6

Glycerolpuffer

Verhältnis Glycerol zu PBS (pH7,6) von 10:1

9.1.2 Reinsubstanzen, Lösungen und Medien

Aceton:	Fa. BASF, Ludwigshafen
Anti- <i>Yersinia-enterocolitica</i> O:3-Antikörper, monoklonal, Klon 2D8:	Fa. Progen Biotechnik, Heidelberg
Columbia Agar mit Schafblut:	Fa. Oxoid, Wesel
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), wasserfrei:	Fa. Merck, Darmstadt
Gassner Agar:	Fa. Oxoid, Wesel
Glycerol, $\geq 99,5\%$:	Fa. Roth, Karlsruhe
Monospezifisches Testserum Anti- <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3:	Fa. SIFIN, Berlin
Natriumchlorid (NaCl):	Fa. Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat, ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$):	Fa. Merck, Darmstadt

Natronlauge, 1M:	Fa. Merck, Darmstadt
Salzsäure, 1M:	Fa. Merck, Darmstadt
Ziege-Anti-Maus-IgG (H+L), FITC-gekoppelt:	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA

9.2 Geräte

Analysenwaage:	Fa. Sartorius, Göttingen
Brutschrank Fa. Memmert:	Fa. Omnilab, Hannover
Deckgläser 21x26mm:	Fa. Roth, Karlsruhe
Digitalkamera Sony, Modell XC-0003P:	Bezug über Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf
Feuchte Kammer	
Fluoreszenzmikroskop Laborlux S:	Fa. Leitz, Wetzlar
Gefrierschrank GSD 2610:	Fa. Robert Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Glasküvette:	Bezug über Fa. Landgraf, Langenhagen
Magnetrührer:	Fa. IKA, Staufen
Objektträger Superfrost Color:	Fa. Roth, Karlsruhe
pH-Meter, inolab pH level 2:	FA. WTW, Weilheim
Pipetten Eppendorf Research 0,5-10µl, 100-1000µl:	Fa. Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen:	Fa. Ratiolab, Dreieich
QIAamp DNA Stool Mini Kit :	Fa. Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße Polypropylen 1,5 ml:	Fa. Roth, Karlsruhe
Reinstwassersystem Easypure RF:	Fa. Werner, Leverkusen
Vortex Genie 2 G 560E:	Scientific Industries, Inc., Bezug über Fa. Omnilab, Gehrden

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabellennummer	Seite
Tabelle 1: Biochemische Differenzierung der <i>Yersinia</i> -Spezies, modifiziert nach ALEKSIC u. BOCKEMÜHL (1990) und NEUBAUER et al. (2000a).....	17
Tabelle 2: Biochemische Differenzierung der Biovare von <i>Yersinia enterocolitica</i> , nach WAUTERS et al. (1987)	20
Tabelle 3: O- und H-Antigene, Biovarzugehörigkeit, Herkunft und Verbreitung humanpathogener <i>Yersinia enterocolitica</i> -Stämme nach ALEKSIC u. BOCKEMÜHL (1990)	21
Tabelle 4: Biochemische Reaktionen bei vermutlich pathogenen <i>Yersinia enterocolitica</i> gemäß ISO 10273.....	23
Tabelle 5: Übersicht über PCR-Methoden zur Identifizierung und Pathogenitätsprüfung und über die Virulenzgene von <i>Yersinia enterocolitica</i> , erweitert nach BOCKEMÜHL u. WONG (2003) und NEUBAUER (2001).....	28
Tabelle 6: Übersicht über die Erkrankungen des Menschen durch <i>Yersinia enterocolitica</i> , modifiziert nach BOTTONE (1999)	36
Tabelle 7: Vierfeldertafel für den Vergleich von bakteriologischer Untersuchung (BU) und Immunfluoreszenztest (IFT).....	66
Tabelle 8: Ergebnisse des Immunfluoreszenztests (IFT) und der bakteriologischen Untersuchung (BU) nach Gruppen.....	68
Tabelle 9: Ergebnisse des Immunfluoreszenztests (IFT) im Vergleich zur bakteriologischen Untersuchung (BU) in absoluten Zahlen	70
Tabelle 10: Vergleich der Bestandsergebnisse der bakteriologischen und serologischen Untersuchung sowie des Immunfluoreszenztests	71
Tabelle 11: Darstellung der Parameter Sensitivität, Spezifität und prädiktiven Werte bei verschiedenen Berechnungsgrundlagen	72

9.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildungsnummer	Seite
Abbildung 1: Übersicht über die heute zur Gattung <i>Yersinia</i> gehörigen Spezies und ihre Erstbeschreibung, erweitert nach CARNIEL (2003)	16
Abbildung 2: Grafische Darstellung der Yersiniosefälle in der Zeit von 1992-2000 in den deutschen Bundesländern Hamburg, Bremen, Nordrhein-Westfalen, Hessen, Saarland, Brandenburg, Berlin, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen, Sachsen-Anhalt und Thüringen (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2002b).....	44
Abbildung 3: Grafische Darstellung der Yersiniosefälle in Deutschland in den Jahren 2001 bis 2003 (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2003 a, b)	45
Abbildung 4: Unspezifische Fluoreszenz im Immunfluoreszenztest, Vergrößerung 1000fach (Foto: A. L. Louis).....	62
Abbildung 5: <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 im Immunfluoreszenztest (Pfeile), Vergrößerung 1000fach, (Foto: A. L. Louis).....	63
Abbildung 6: Ergebnisse des Immunfluoreszenztests (IFT) und der bakteriologischen Untersuchung (BU) in den verschiedenen Gruppen.....	68
Abbildung 7: Ergebnisse des Immunfluoreszenztests (IFT) und der bakteriologischen Untersuchung (BU) in den untersuchten Beständen (1-10)	69
Abbildung 8: Übersicht über die Veränderung von Sensitivität, Spezifität und positivem bzw. negativem prädiktivem Wert durch Berechnung ohne fragliche Proben und Zusammenfassung von fraglichen und positiven bzw. fraglichen und negativen Proben	73

Hannover, den 22.02.05

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation mit dem Titel

„Untersuchungen zum Nachweis von *Yersinia enterocolitica* im Kot von
Mastschweinen mittels Immunfluoreszenztest“

selbständig verfasst habe. Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen Dritter in Anspruch genommen:

- Nutzung der Ergebnisse der bakteriologischen und serologischen Untersuchung auf *Yersinia enterocolitica*, die im Rahmen des von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung vergebenen Forschungsauftrages 00 HS 046 „Prävalenzstudie zum Vorkommen von Zoonoseerregern in deutschen Schweinebeständen (ZiPP – Zoonoses in Pork Production)“ durchgeführt wurden
- Durchführung der PCR aus bereits extrahierter DNA zum Nachweis *Yersinia enterocolitica* in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. U. Rösler im Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Ich habe die Dissertation an folgendem wissenschaftlichen Institut angefertigt:

Klinik für kleine Klautiere und Forensische Medizin und Ambulatorische
Klinik
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Waldmann danke ich für die Bereitstellung des Themas und seine Unterstützung.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Uwe Rösler, der mir in Schlüsselsituationen wichtige Ratschläge gegeben hat und der die PCR-Untersuchung in Leipzig durchgeführt hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Alexandra von Altrock, ohne deren hervorragende Betreuung, moralische Unterstützung, Verständnis und ihr Korrektur lesen vieles mühseliger gewesen wäre.

Frau Dr. Isabel Hennig-Pauka danke ich, denn sie hat trotz den tausend Dingen, die sie zu tun hat, die Arbeit Korrektur gelesen und mir gute Anregungen gegeben.

Herrn Dr. Matthias Homuth, Herrn Dr. Sebastian Fischer und vor allem Maike Lange aus der Gesellschaft für Innovative Veterinärdiagnostik sowie Frau Dr. Jutta Verspohl und Anne Hofmann aus dem Institut für Mikrobiologie danke ich für die gewährte Unterstützung.

Nicht zu vergessen sind die Mitarbeiterinnen aus dem Labor der Klinik für kleine Klautiere, die Tierpfleger und die Tierpflegerin, die Fahrer und ganz besonders Jörn Dettmer, denen ich allen mit vielen Fragen und Anliegen zuleibe rücken durfte. Dankeschön!

Vielen Dank außerdem an meine Mitdotorandinnen Maike und Dominika, die stets aufmunternde Worte und Anregungen hatten und an Charlotte, Kerstin und Reinhard für Kaffee- und Denkpausen und eine gehörige Portion Humor.

Großer Dank an meine Eltern, die es mir ermöglicht haben, bis hierher zu kommen und noch weiterzugehen und die auch Korrektur gelesen haben.

Andreas danke ich für sein Verständnis, sein Aufmuntern und vieles mehr.