

Molekularbiologische Feintypisierung von *Yersinia* spp.- Stämmen aus Mastgeflügel

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur

Kaveh Toutounian-Mashhad

aus dem Iran

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
– Dr.-Ing. –
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Dipl.-Ing. D. Knorr
1. Bericht:	Prof. Dipl.-Ing. Dr. U. Stahl
2. Bericht:	P.D. Dr. med. vet. Dipl.-Chem. L. Ellerbroek

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10. Juli 2007

Berlin 2007

D 83

Molekularbiologische Feintypisierung von *Yersinia* spp.- Stämmen aus Mastgeflügel

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur

Kaveh Toutounian-Mashhad

aus dem Iran

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
– Dr.-Ing. –
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Dipl.-Ing. D. Knorr
1. Bericht:	Prof. Dipl.-Ing. Dr. U. Stahl
2. Bericht:	P.D. Dr. med. vet. Dipl.-Chem. L. Ellerbroek

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10. Juli 2007

Berlin 2007

D 83

*Meinen Eltern
und
meiner liebevollen Frau und Tochter
gewidmet*

Diese Dissertation wurde am Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin-Marienfelde in der Abteilung Biologische Sicherheit, Fachgruppe 42 unter Anleitung von PD Dr. med. vet. Dipl.-Chem. L. Ellerbroek verfertigt.

Zur Erlangung der Doktorwürde des Fachbereiches Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin erfolgte die Einreichung am Institut für Biotechnologie bei Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. U. Stahl.

I. Inhaltverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	<i>Taxonomie und Eigenschaften</i>	2
2.1.1	Biotyp	4
2.1.1	Serovar	4
2.2	<i>Pathogenitätsfaktoren</i>	6
2.2.1	Chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren	6
2.2.2	Plasmid kodierte Pathogenitätsfaktoren	9
2.3	<i>Epidemiologie</i>	12
2.3.1	Übertragungsmöglichkeiten von <i>Y. enterocolitica</i>	13
2.3.2	Epidemiologie von <i>Y. enterocolitica</i> beim Geflügel	15
2.3.3	Epidemiologie von <i>Y. enterocolitica</i> beim Schwein	15
2.4	<i>Diagnostik von Y. enterocolitica</i>	16
2.4.1	Eigenschaften des Erregers	16
2.4.2	Kulturelle Nachweismethoden	17
2.4.2.1	Anreicherung	18
2.4.2.2	Isolation	19
2.4.2.3	Biotypisierung	19
2.4.2.4	Bioschemische Pathogenitätstests	20
2.4.2.5	Serotypisierung	21
2.5	<i>Molekulare Nachweismethoden</i>	22
2.5.1	DNS- Isolierung	25
2.5.1.1	Lyse der Zellen	25
2.5.1.2	Gewinnung der DNS	26
2.5.2	Restriktionsenzymanalyse des Plasmids (REAP)	27
2.5.3	Restriktionsendonukleasen- Analyse chromosomaler DNS (REAC)	28
2.5.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
2.5.5	Ribotypisierung	30
2.5.6	Sequenzierung	31
2.5.7	Restriction fragment length polymorphism (RFLP)	32
2.5.8	Random amplified polymorphic DNS (RAPD)	32
2.5.9	Multilocus sequence typing (MLST)	33

2.5.10	Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)	34
2.5.11	Amplified Fragment Length Polymorphism- PCR (AFLP- PCR)	37
2.5.12	Vergleich der Methoden	39
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	41
3.1	<i>Material</i>	41
3.1.1	Materialien für mikrobiologische Arbeiten	41
3.1.1.1	Schafblut- Nährmedium, Standard	41
3.1.1.2	BHI- Bouillon (Brain Heart Infusion Bouillon)	42
3.1.2	Materialien für die Polymerase Chain Reaction (PCR)	42
3.1.2.1	Stamm- und Gebrauchslösungen für PCR	42
3.1.2.2	Reagenzien und Chemikalien für PCR	43
3.1.3	Material für die Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)	44
3.1.3.1	Gebrauchslösungen für die PFGE	44
3.1.3.2	Chemikalien und Reagenzien für die Pulsfeld gelelektrophorese	45
3.1.3.3	Restriktionsenzyme	46
3.1.4	Material für die Amplified fragment length polymorphism (AFLP)	47
3.1.4.1	AFLP Stamm- und Gebrauchslösungen	47
3.1.4.2	Chemikalien und Reagenzien für die AFLP	48
3.1.4.3	Restriktionsenzyme	49
3.1.5	Arbeitsgeräte	50
3.1.5.1	Arbeitsgeräte für die mikrobiologische Untersuchungen	50
3.1.5.2	Arbeitsgeräte für die PCR	50
3.1.5.3	Arbeitsgeräte für die PFGE	50
3.1.5.4	Arbeitsgeräte für die AFLP	51
3.2	<i>Methoden</i>	52
3.2.1	PCR- Untersuchungen	52
3.2.1.1	DNS- Isolation	52
3.2.1.2	Vorbereitung und Durchführung der Multiplex- PCR (MPCR)	52
3.2.1.2.1	Multiplex- PCR	53
3.2.1.2.2	Herstellung des Agarosegel	54
3.2.1.2.3	Gelelektrophorese	54
3.2.1.3	Dokumentation und Auswertung der PCR- Ergebnisse	55
3.2.2	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	55
3.2.2.1	Vorbereitung und Durchführung der Pulsfeld-Gelelektrophorese	56
3.2.2.1.1	Aktivierung der Isolate	56
3.2.2.1.2	Isolierung und Reinigung der chromosomalen DNS	56

3.2.2.1.3 Herstellung der Agarose-Blöckchen	56
3.2.2.1.4 Freilegen der DNS mit Hilfe des Lysis-Lösung	57
3.2.2.1.5 Restriktionsverdau	58
3.2.2.1.6 Herstellung und Beladen des Gels	58
3.2.2.1.7 Pulsfeld- Gelelektrophorese	59
3.2.2.2 Auswertung der PFGE- Ergebnisse	60
3.2.3 Genotypische Differenzierung ausgewählter Isolate mittels der AFLP	60
3.2.3.1 DNS-Isolation	60
3.2.3.2 Vorbereitung und Durchführung des AFLP- Verfahrens	61
3.2.3.2.1 Restriktion	61
3.2.3.2.2 Ligation	62
3.2.3.2.3 Präselektive PCR	63
3.2.3.2.4 Selektive PCR	64
3.2.3.2.5 Gelelektrophorese	65
3.2.3.3 Auswertung der AFLP-Ergebnisse	66
3.2.4 Auswertung der Typisierungsdaten mit Hilfe von Bionumerics™- Software	66
3.2.4.1 Konvertierung	67
3.2.4.2 Normalisierung	67
3.2.4.3 Bandenmuster- Analyse	68
3.2.4.4 Dice- und Pearson- Korrealion- Koeffizient	68
3.2.4.5 UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages)	69
3.2.4.6 Darstellung und Vergleich der PFGE- und AFLP- Ergebnisse	69
4 ERGEBNISSE	70
4.1 Multiplex-PCR (MPCR) zur Nachweis von Genus, Spezies und Pathogenität der Yersinia spp.- Feldstämme	70
4.1.1 Ergebnisse der Gradienten- PCR	70
4.1.2 Ergebnisse der Multiplex- PCR (MPCR)	72
4.2 Feintypisierung der Yersinia spp.- Feldstämme mittels Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)	73
4.2.1 Ergebnisse der Optimierung des Restriktionsschrittes	73
4.2.2 Ergebnisse der Gelkonzentration-, Lauf- und Pluszeit- Optimierung	74
4.2.3 PFGE- Typisierung	76
4.2.3.1 Genotypisierung der Referenzstämme	76
4.2.3.2 Genotypisierung der isolierten Yersinia spp.- Stämme	77
4.2.3.2.1 PFGE-Typisierung der Isolate im Durchgang B (2. Tag post Infectionem)	78
4.2.3.2.2 PFGE-Typisierung der Isolate im Durchgang C (4. Tag post Infectionem)	78

4.2.3.2.3	PFGE-Typisierung der Isolate im Durchgang D (6. Tag post Infectionem)	79
4.2.3.2.4	PFGE-Typisierung der Isolate im Durchgang E (8. Tag post Infectionem)	79
4.2.3.2.5	PFGE-Typisierung der Isolate im Durchgang F (10. Tag post Infectionem)	80
4.3	<i>Feintypisierung der Yersinia spp.- Feldstämme mittels Amplified fragment length polymorphism (AFLP)</i>	81
4.3.1	Ergebnisse der Optimierung des Restriktionsschrittes	81
4.3.2	Ergebnisse der Polyacrylamid-Gelelektrophorese- Optimierung	82
4.3.3	AFLP- Typisierung	84
4.3.3.1	Genotypisierung der Referenzstämme	84
4.3.3.2	Genotypisierung der isolierten <i>Yersinia</i> spp.- Stämme	85
4.3.3.2.1	AFLP-Typisierung der Isolate im Durchgang B (2. Tag post infectionem)	86
4.3.3.2.2	AFLP-Typisierung der Isolate im Durchgang C (4. Tag post infectionem)	86
4.3.3.2.3	AFLP-Typisierung der Isolate im Durchgang D (6. Tag post infectionem)	87
4.3.3.2.4	AFLP-Typisierung der Isolate im Durchgang E (8. Tag post infectionem)	87
4.3.3.2.5	AFLP-Typisierung der Isolate im Durchgang F (10. Tag post infectionem)	88
5	DISKUSSION	89
5.1	<i>Multiplex- PCR (MPCR)</i>	89
5.1.1	Optimierung der PCR- Methode	89
5.1.2	Ergebnisse der Multiplex- PCR- Untersuchungen	90
5.2	<i>Genotypisierung ausgewählter Yersinia spp.- Isolate mittels PFGE</i>	92
5.2.1	Optimierung des Restriktion- Schrittes	92
5.2.2	Optimierung des Elektrophorese- Schrittes	93
5.2.3	Reproduzierbarkeit der PFGE- Methode	94
5.2.4	PFGE- Typisierung der Referenzstämme	95
5.2.5	Ergebnisse der PFGE- Typisierungen	96
5.3	<i>AFLP- Typisierung der ausgewählten Yersinia spp.- Isolate</i>	97
5.3.1	Optimierung der Isolation chromosomaler DNS	97
5.3.2	Optimierung des Restriktionsschrittes	98
5.3.3	Optimierung des Elektrophorese- Schrittes	99
5.3.4	Reproduzierbarkeit der AFLP- Methode	100
5.3.5	AFLP- Typisierung der Referenzstämme	101
5.3.6	Ergebnisse der AFLP- Typisierungen	102
5.4	<i>Vergleich der beiden Typisierungsmethoden</i>	103

6	SCHLUSSFOLGERUNGEN	107
6.1	<i>Multiplex- PCR</i>	107
6.2	<i>Typisierung der Yersinia spp.- Stämme mittels PFGE</i>	107
6.3	<i>Typisierung der Yersinia spp.- Stämme mittels AFLP</i>	108
6.4	<i>Vergleich der beiden Typisierungsmethoden AFLP und PFGE</i>	108
7.	ZUSAMMENFASSUNG	109
8.	SUMMARY	111
9.	LITERATURVERZEICHNIS	113
10.	ANHANG	164
	DANKSAGUNG	180
	LEBENS LAUF	181
	VERÖFFENTLICHUNGEN	182
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	183

II. Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
<i>ail</i>	attachement invasion locus
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Celsius
CCD- Kamera	Charge- Coupled Device- Camera
CIN	Cefsulodin- Irgasan- Novobiocin
Cl	Chlor
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethyl- Sulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
h	Stunde
<i>Inv</i>	Invasin
ISO	Internationale Organisation zur Standardisierung
ITC	Irgasan- Ticarcillin- Kaliumchlorat
kb	Kilo- Basen
KbE	Kolonien bildende Einheiten

kDa	Kilo- Dalton
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
Mg	Magnesium
min	Minute
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLST	Multi locus sequence typing
mm	Millimeter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFGE	Pulse field gel electrophoresis
pH	Pondus Hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PIV	Trisbase- NaCl- Puffer
PMSF	Phenyl- methyl- sulfonyl- fluorid
pYV	Plasmid for Yersinia Virulence
RAPD	Random amplified polymorphic DNS
REAC	Restriktionsendonuclease- Analyse chromosomaler DNS
REAP	Restriktionsenzymanalyse des Plasmids
RFLP	Restriction Fragment length polymorphism

RKI	Robert Koch- Institut
RNS	Ribonukleinsäure
S.	<i>Salmonella</i>
sec	Sekunde
sog.	so genannt
spp.	Subspezies
TAE	Tris- Acetat- EDTA
TBE	Tris- Borsäure- EDTA
TE	Tris- EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSA	Trypton Soja Agar
U	Units
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
UPGMA	Unweighted pair group using arithmetic averages
UV	Ultraviolett
v/v	volume / volume (Vol.-%)
w/v	weight per volume (Gewichts-%)
Y.	<i>Yersinia</i>
YadA	Yersinia Adhäsion A
Yop	Yersinia outer protein
Ysc	Yersinia secretion
Yst	Yersinia stable Toxin
z. B.	zum Beispiel

Nukleoside

Adenosin	A	Guanosin	G
Thymin	T	Cytosin	C

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1A.....	71
Abbildung 1B.....	71
Abbildung 1C.....	71
Abbildung 2.....	72
Abbildung 3A.....	73
Abbildung 3B.....	74
Abbildung 3C.....	74
Abbildung 4A.....	75
Abbildung 4B.....	75
Abbildung 5.....	77
Abbildungen 6 - 11.....	Im Anhang
Abbildung 12A.....	82
Abbildung 12B.....	82
Abbildung 12C.....	82
Abbildung 12D.....	82
Abbildung 13A.....	83
Abbildung 13B.....	83
Abbildung 14.....	84
Abbildungen 15 - 20.....	Im Anhang

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.....	24
Tabelle 2.....	43
Tabelle 3.....	44
Tabelle 4.....	45
Tabelle 5.....	45
Tabelle 6.....	45
Tabelle 7.....	46
Tabelle 8.....	47
Tabelle 9.....	48
Tabelle10.....	48
Tabelle11.....	48
Tabelle12.....	49
Tabelle13.....	53
Tabelle14.....	63
Tabelle15.....	63
Tabelle16.....	64
Tabelle17.....	66

1 Einleitung

Die Yersiniose stellt als Zoonose eine Gefahr für die Gesundheit von Mensch und Tier dar und gehört seit 2001 in Deutschland zu den meldepflichtigen Erkrankungen. Mit 4.974 gemeldeten Fällen im Jahr 2006 und durchschnittlich 83 Erkrankungsfällen pro Woche geht von dem Erreger *Yersinia enterocolitica* eine ernstzunehmende gesundheitliche Gefahr aus. Trotz der Meldepflicht für Yersiniose, ist es von einer ca. zehnfach höheren Dunkelziffer auszugehen. In Deutschland steht sie somit nach *Salmonella* und *Campylobacter* auf Platz 3 der häufigsten Durchfallerreger. Obwohl selten pathogene Vertreter aus Lebensmitteln isoliert wurden, wird angenommen, dass *Y. enterocolitica* ein bedeutender Krankheitserreger ist, der über Lebensmittel übertragen werden kann. Daher wird *Y. enterocolitica* zu den so genannten „food-borne pathogens“ gezählt. Als Infektionsquellen kommen vor allem kontaminiertes Schweinefleisch, Milch oder Geflügel in Frage.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, alle aus einem experimentellen Infektionsversuch von Mastgeflügel isolierten *Yersinia* spp.- Stämme mit Hilfe der molekularbiologischen Methoden näher zu charakterisieren. Hierbei wurden die *Yersinia* spp.- Isolate mittels PFGE- und AFLP- Methode genotypisiert. Der Vergleich der Diskriminierungsstärke der aus beiden Genotypisierungsverfahren erhaltenen Bandenmuster sollte Anhaltspunkte für die Bewertung und Anwendbarkeit der beiden Verfahren bezüglich der Reproduzierbarkeit, Zeitintensität und Handhabung geben. Gleichzeitig sollten die genotypische Unterschiede zwischen verschiedenen *Yersinia*- Spezies und innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* untersucht werden. Um die Reproduzierbarkeit der Methoden zu überprüfen, wurden zusätzliche *Yersinia*- Stämme einbezogen, die vorher mittels Multiplex- PCR im Hinblick auf Genus, Spezies und Pathogenität untersucht wurden. Dazu sollten die beiden Methoden für die Typisierung von *Yersinia enterocolitica*- Stämmen optimiert werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Taxonomie und Eigenschaften

Bereits 1939 isolierten SCHLEIFSTEIN und COLEMAN bis dahin unbekannte Bakterienstämme aus klinischem Material einiger Menschen, die an akuter Enteritis erkrankt waren. Diesen, heute als *Yersinia* (Y.) *enterocolitica* bezeichneten Keim, beschrieben HÄSSIG et al. (1949) erneut beim Menschen. Sie ordneten ihm aufgrund der Ähnlichkeit der pathologisch- anatomischen Organveränderungen mit der tierischen Pseudotuberkulose und der morphologischen Ähnlichkeit des Erregers mit *Pasteurella pseudotuberculosis* vorübergehend dessen Namen zu. FREDERIKSEN (1964) entdeckte Ähnlichkeiten zwischen dieser Spezies und einigen anderen inzwischen in human- und veterinärmedizinischem Material gefundenen Stämmen. Er war es, der 1964 für diese Bakterien die heute gültige Bezeichnung *Yersinia* vorschlug. Die Namensgebung erfolgte zu Ehren des Bakteriologen A. J. E. Yersin, der im Jahre 1894 erstmals den Erreger der Pest isolierte (BERCOVIER und MOLLART, 1984).

Yersinien sind oxidasenegativ, katalasepositiv und reduzieren Nitrat zu Nitrit (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Sie kommen ubiquitär vor und bilden keine Kapseln oder Sporen (KNAPP, 1988a). Geißeln werden in der Regel nur bei Temperaturen unter +30°C gebildet. Bei +37°C sind Yersinien deshalb unbeweglich. Der Spezies- Name *Y. enterocolitica* wurde von FREDERIKSEN (1964) eingeführt. Aufgrund ihres negativen Gram- Verhaltens sowie der morphologischen (stäbchenförmig) und metabolischen Eigenschaften wird die Gattung *Yersinia* in der Familie der *Enterobacteriaceae* geführt (BERCOVIER et al., 1984; HEESEMANN, 1990). Neben mehreren apathogenen Yersinien zählen zu dieser Gattung heute folgende drei Arten, die als Krankheitserreger für Mensch und Tier von Bedeutung sind: *Y. pseudotuberculosis* als Erreger der Pseudotuberkulose bei Mensch und Tier, *Y. pestis* als Erreger der Nagerpest und der Pest des Menschen, und *Y. enterocolitica* als Erreger einer pseudotuberkulose ähnlichen Erkrankung bei Tieren und einer enteralen Infektion des Menschen (SCHIEMANN, 1989). Letztere haben als

Krankheitserreger erst in den letzten 30 Jahren an Bedeutung gewonnen. Des Weiteren unterscheidet man heute aufgrund genetischer Unterschiede (DNS – DNS- Hybridisierung und unterschiedlicher GC- Gehalt) die früher als *Y. enterocolitica*- like Bakterien (KAPPERUD, 1991; NESBAKKEN und KAPPERUD, 1985) bezeichnete Spezies: *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri* und *Y. ruckeri* (ALEKSIC et al., 1987; BERCOVIER et al., 1984; BRENNER et al., 1980; WAUTERS et al., 1988). Diese acht genannten Spezies sind für den Menschen nicht pathogen. Dagegen sollte der fischpathogene Erreger *Y. ruckeri* in Zukunft nicht mehr der Gattung *Yersinia* zugerechnet werden, da nur eine geringe DNS-Homologie zu den anderen Vertretern in der Gattung besteht (HEESEMANN, 1994). Die taxonomische Einordnung ist auch heute noch nicht abgeschlossen (NEUBAUER et al., 2000a). Bei den drei pathogenen *Yersinia*- Spezies handelt es sich um invasive Bakterien, die eine besondere Affinität zu Lymphgewebe besitzen (CORNELIS et al., 1998). Sie unterscheiden sich dabei in der Art der Invasion. Während *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* die Mukosa des Gastrointestinaltraktes überwinden und dann im lymphatischen Gewebe des Darmes und der Submukosa persistieren können (HEESEMANN und KARCH, 1995), wird *Y. pestis* normalerweise durch ein Insekt in den Wirtsorganismus injiziert und muss somit die Darmbarriere des Wirtsorganismus nicht durchdringen (CORNELIS et al., 1998).

Stämme, welche zur Spezies *Y. enterocolitica* gehören, sind Urease- positiv und können von anderen *Yersinia*- Spezies durch die positive Fermentation von Sucrose, sowie die negativen Ergebnisse der Rhamnose- und Melbiose-Fermentation abgegrenzt werden (BERCOVIER et al., 1980). Die höchste biochemische Aktivität besitzt *Y. enterocolitica* bei +25°C. Zum Beispiel erhält man einen positiven Voges- Proskauer- Test nur bei +25°C, aber nicht bei höheren Inkubationstemperaturen (BERCOVIER und MOLLARET, 1984). Die meisten *Y. enterocolitica*- Isolate besitzen ihre höchste Beweglichkeit ebenfalls bei +25°C und sind dagegen bei +37°C unbeweglich. NILEHN (1969) konnte hingegen zeigen, dass Stämme des Biotyps 4 bei jeder Temperatur eine stark eingeschränkte Beweglichkeit besitzen. *Y. enterocolitica*- Isolate sind hinsichtlich ihrer biochemischen und antigenen Eigenschaften eine relativ

heterogene Gruppe.

2.1.1 Biotyp

Da die Stämme, die unter der Speziesbezeichnung *Y. enterocolitica* geführt werden, in ihren biochemischen Eigenschaften differieren, wurden sie in verschiedene Biotypen unterteilt. WAUTERS et al. (1987) nahmen die Einteilung in Biotypen aufgrund der unterschiedlichen Verwertung folgender Substrate vor: Tween- Esterase- Aktivität, Indol- Produktion, Säurebildung aus Salicin, Trehalose und Xylose, Nitratreduktion, β - Galaktosidase- Aktivität, Voges- Proskauer- Test, Prolin- Peptidase- Aktivität, Aesculin- Hydrolyse sowie die Pyrazinamidase- Aktivität. Somit war eine Einteilung in 6 Biotypen möglich: 1A, 1B, sowie Biotyp 2 bis 5. Biotyp 1A fasst den überwiegenden Teil der eher apathogenen Isolate zusammen. Die Biotypen 2, 3, 4 und 5 enthalten die pathogenen europäischen, die Biotyp 1B die pathogenen in Amerika isolierten Stämme. Der ursprünglich einheitliche Biotyp 1 wurde nachträglich von WAUTERS und seinen Mitarbeitern (1987) mittels eines modifizierten Biotypisierungsschemas noch weiter unterteilt, da er sowohl apathogene als auch pathogene Varianten enthält (WAUTERS et al., 1987). Zum Biotyp 1A gehören verschiedene apathogene Stämme, die vor allem in der Umwelt und bei Mensch und Tier als Saprophyten, gegebenenfalls auch als Opportunisten vorkommen. Dem Biotyp 1B wurden humanpathogene Stämme zugeordnet, die vor allem in USA auftreten. Für die Differenzierung der Biotypen 1A und 1B ist der Nachweis von Pyrazinamidase, Salicin und Aeskulin ausschlaggebend. Bei pathogenen Isolaten fallen diese Reaktionen negativ aus. Die in Europa vorkommenden, für den Menschen pathogenen Stämme sind in der Regel den Biotypen 2, 3 oder 4 zuzuordnen. Die tierpathogenen Stämme, die bei Hasen, Ziegen und Chinchillas septische Erkrankungen hervorrufen, gehören stets zu den Biotypen 3 oder 5 (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990).

2.1.1 Serovar

Die Einteilung von *Y. enterocolitica* in verschiedene Serovaren geschieht nach den Oberflächen- (O-), Geißel- (H-) Antigene. Die Bestimmung von Kapsel- (K-) Antigenen hat heute keine diagnostische Bedeutung. Für *Y. enterocolitica*

einschließlich der früher als “*Y. enterocolitica*- like” bezeichneten Arten (*Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*) wurden bis heute 60 O- Gruppen gefunden (WAUTERS, 1981), wovon 28 auf *Y. enterocolitica* entfallen (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Während bestimmte O- Antigene bei verschiedenen Spezies vorkommen, sind die H- Antigene Spezies- spezifisch und können daher auch zur direkten Identifizierung der *Yersinia*- Arten herangezogen werden. Bislang wurden 18 H- Faktoren bei *Y. enterocolitica* definiert. Hier sind bestimmte Kombinationen von H- Antigenfaktoren signifikant für pathogene Serovaren und können bei der Unterscheidung pathogener und apathogener Stämme hilfreich sein. Nach Befunden von ALEKSIC und BOCKEMÜHL (1990) sind die pathogenen Serovaren O:3, O:9 und O:5,27 von *Y. enterocolitica* stets mit den H- Antigenen a,b; a,b,c; a,b,c,v; a,c; c oder b,c kombiniert. Der H- Antigenkomplex H: b,e,f,i kommt hingegen bei den fast ausschließlich in den USA auftretenden pathogenen Serovaren O:8, O:4,32; O:18, O:20 und O:21 von *Y. enterocolitica* vor (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Der Nachweis bestimmter H- Antigene ist laut ALEKSIC und BOCKEMÜHL (1990) für humanpathogene Stämme spezifisch und kann diagnostisch verwendet werden. In Europa gelten die Serovaren O:3, O:9 und O:5,27 in der Humanmedizin als bedeutsam, in Nordamerika die Serovaren O:3, O:8, O:13, O:20 und O:21. Das Sero var O:3 konnte über längere Zeit nur in Europa nachgewiesen werden. Inzwischen wird es jedoch auch in Nordamerika gefunden, während O:8, der häufigste der nordamerikanischen Vertreter, in Europa bisher sehr selten isoliert werden konnte (N.N., 2000). Der jeweiligen Serovarietät bzw. dem Biotypen werden auch Pathogenitätsmerkmale zugeordnet. So scheint der Sero var O:8 im Allgemeinen virulenter als die Serovaren O:3 oder O:9 (N.N., 2000). Bei einzelnen Tierarten wurden verschiedene Serovaren nachgewiesen: O:1 bei Chinchillas, O:2 bei Hasen und Ziegen und O:3 bei Affen, Hunde und Katzen. Beim Schwein können fast alle bekannten Serovaren nachgewiesen werden, darunter auch Sero var 3 und 9, ohne dass die Tiere klinische Krankheitserscheinungen zeigen (SELBITZ, 1992).

2.2 Pathogenitätsfaktoren

Die Pathogenität von *Y. enterocolitica* hängt von verschiedenen Faktoren ab. Hierbei wird zwischen chromosomal kodierten und plasmid kodierten Virulenzfaktoren unterschieden. Um eine volle Virulenz auszubilden, sind sowohl chromosomale als auch extrachromosomale (plasmidkodierte) Pathogenitätsfaktoren notwendig (BOTTONE, 1997).

2.2.1 Chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren

Für die chromosomal kodierte Virulenzfaktoren sind bei *Y. enterocolitica* zwei Gene verantwortlich: das *inv* (invasin)- Gen und das *ail* (attachment invasion locus)- Gen (MILLER und FALKOW 1988). Das *inv*- Gen kodiert für ein 92 kDa Außenmembranprotein (Invasin), welches durch Anheftung an einen Rezeptor des β 1- Integrins der M- Zellen die Zellpenetration initiiert (ISEBERG und LEONG 1990). Es wurde zuerst durch ISEBERG und FALKOW (1985) in *Y. pseudotuberculosis* nachgewiesen. Die Autoren transferierten das *inv*- Gen in nichtinvasive *Escherichia (E.) coli* K- 12 Stämme, welche dadurch die Fähigkeit zur Zellinvasion erlangten. Das *inv*- Gen ist zwar bei allen *Yersinia*- Spezies vorhanden, aber das Protein wird nur bei pathogenen Vertretern exprimiert (PIERSON und FALKOW 1990). Stämme, welchen das *inv*- Gen entfernt wurde, sind nicht in der Lage, die Peyerschen Platten zu kolonisieren, was in einem Mausmodell gezeigt werden konnte (PEPE und MILLER 1993).

Das *ail*- Gen, kodiert für das 17kDa großes Oberflächenprotein Ail, welches für die Zelladhärenz und auch Invasivität eine entscheidende Rolle spielt (PIERSON und FALKOW, 1993). Die Expression des *ail*- Gens von *Y. enterocolitica* erfolgt nur in der stationären Wachstumsphase und bei +37°C (PEDERSON et al., 1997). Bisher konnte das *ail*- Gen nur bei *Y. enterocolitica*- Isolaten nachgewiesen werden, die aus einer klinischen Erkrankung isoliert worden sind (MILLER et al., 1989). Die Tatsache, dass die Pathogenität mit zunehmender Invasion, vermittelt durch das Vorhandensein des Ail- Protein, steigt und dass das *ail*- Gen nur in pathogenen Yersinien vorkommt, lassen eine wichtige Rolle des *ail*- Gens bei der Virulenz vermuten. Genaue

Wirkungsmechanismen sind hier jedoch noch nicht bekannt (CARNIEL, 1995). Chromosomal kodiert ist ebenfalls das Lipopolysaccharid (LPS), welches einen Bestandteil der Oberfläche gramnegativer Bakterien darstellt. Das LPS besteht aus einem Oligosaccharidkern, Lipid- A und O- Antigenen (Polysaccharid-seitenketten). Jedem dieser drei Teile werden bestimmte Eigenschaften zur Überwindung des wirtseigenen Abwehrsystems zugesprochen, dies bedarf jedoch noch genauerer Klärung (SKURNIK und ZHANG, 1996b; WAUTERS et al., 1991; SKURNIK et al., 1996a). Kern und Lipid- A stellen hoch konservierte Strukturen innerhalb eines Genus dar, die O- Antigene können beträchtlich variieren (JANSSON et al., 1981; ZHANG et al., 1997). Auf dieser Variabilität der O- Antigene basiert die Serotypisierung (WAUTERS et al., 1991). Der Oligosaccharidkern besteht aus zwei Anteilen: einem inneren Kern in Form eines Heptasaccharids und einem äußeren Kern in Form eines Hexasaccharids (RADZIEJEWSKA-LEBRECHT et al., 1994). Dass der äußere Kern für die Virulenz von großer Bedeutung ist, wurde in einem Mausversuch gezeigt. Der Erreger tötete intragastrisch infizierte Mäuse, der Mutant ohne den äußeren Kern hingegen nicht (SKURNIK et al., 1999). Auch die Notwendigkeit der O-Seitenkette für die Virulenz des Serotyps O:3 wurde in einem Mausmodell bewiesen (AL- HENDY et al., 1992). In einem Bericht des ROBERT KOCH-INSTITUTES aus dem Jahr 2000 wird beschrieben, dass die Struktur der Lipopolysaccharide in Abhängigkeit von der Temperatur unterschiedlich ausfällt. Bei +37°C werden raue, kurzkettige Formen gebildet, die in der Zellmembran integriert bleiben. Bei +25°C werden hingegen glatte, langkettige Formen gebildet, die sich von der Membran ablösen und als freies Endotoxin wirksam werden können.

Ein weiteres Gen, welches für die Pathogenität von Bedeutung und chromosomal lokalisiert ist, ist das *yst*- Gen. Es kodiert für ein hitzestabiles Enterotoxin. Das Gen konnte von DELOR et al. (1990) bei keinem von 51 apathogenen, aber bei allen 89 pathogenen Isolaten nachgewiesen werden. Nach dem Transfer dieses Gens in *E. coli* K- 12 Stämme waren diese in der Lage, das Toxin zu produzieren. Die Autoren fanden das Gen ebenso bei einzelnen *Y. kristensenii*- Stämmen. KWAGA et al. (1992) zeigten, dass das Gen auch vom Biovar 1A, von *Y. intermedia* und von anderen

Enterobacteriaceae beherbergt werden kann. *Yst* wird am stärksten zu Beginn der stationären Phase exprimiert. Verschiedene Umweltfaktoren haben einen starken Einfluss auf die Expression. So wird z. B. im Trypticase- Soya- Medium das Toxin nur bei Temperaturen unter +30°C gebildet, was gegen eine Beteiligung am Krankheitsgeschehen spricht. Werden aber die Osmolarität und der pH- Wert auf ein Niveau angehoben, wie sie normalerweise im Ileum zu finden sind, erfolgt die Transkription des *yst*- Gens auch bei +37°C (MIKULSKIS et al., 1994). Welche Auswirkungen die Produktion des hitzestabilen Enterotoxins (*Yst*) auf die Pathogenität von *Y. enterocolitica* besitzt, ist noch nicht genau geklärt. Bekannt ist jedoch, dass auch die Fähigkeit zur Enterotoxinproduktion bei *Y. enterocolitica* und *Y. enterocolitica*- like Bakterien chromosomal verankert ist (DELOR et al., 1990). Da dieses hitzestabile Enterotoxin von *Y. enterocolitica* bei einer Kultivierungstemperatur von +20°C bis +30°C gebildet wird, kann man davon ausgehen, dass dieses Toxin nicht im Menschen oder Tier als Wirt produziert wird (PAI et al., 1978; KAPPERUD, 1982; KAPPERUD und BERGAN, 1984; SCHIEMANN, 1989).

Ein weiterer wichtiger chromosomal gebundener Pathogenitätsfaktor bei allen klinischen Isolaten von *Y. enterocolitica* ist der Urease- Gen- Komplex (DE KONING- WARD et al., 1994), der für das Enzym Urease kodiert. Die Urease hydrolysiert Harnsäure zu Kohlensäure und Ammoniak, was zu einer Erhöhung des lokalen pH- Wertes führt. Somit ist die Urease an der Virulenz von *Y. enterocolitica* entscheidend beteiligt, da sie eine Toleranz gegenüber saurem Milieu ermöglicht und auch das Überleben von *Y. enterocolitica* anlässlich der Magenpassage fördert (DE KONING- WARD und ROBINS- BROWNE, 1995; GRIPENBERG- LERCHE et al., 2000).

Intoxikationen des Menschen könnten jedoch durch präformierte Enterotoxine in Lebensmitteln ausgelöst werden (KAPPERUD, 1982; KAPPERUD und LANGE LAND, 1981). Diese Vermutung basiert auf der Tatsache, dass es für das Toxin möglich ist sowohl die Magensaftbarriere, als auch Verarbeitungsprozesse, insbesondere erhöhte Temperaturen bei der Herstellung von Lebensmitteln, zu überstehen, ohne seine Aktivität zu verlieren (BOYCE et al., 1979). Viele Bakterien verfügen über spezifische Mechanismen zur Aufnahme von Eisen aus ihrer Umgebung. Die Fähigkeit von verschiedenen Serovaren

von *Y. enterocolitica*, die für ihre Vermehrung notwendigen Eisenionen in unterschiedlicher Weise aufzunehmen, ist ausführlich untersucht worden (N. N., 2000). Um das im Blutserum nur in sehr geringer Menge vorhandene freie Eisen (10 – 15 μM) nutzen zu können, bedarf es eines spezifischen Eisenaufnahmesystems, das offensichtlich nur mausletale Stämme besitzen. HEESEMANN (1990) stellte fest, dass letztere, im Gegensatz zu den nicht mausletalen Stämmen, Eisenkomplexone (Siderophore) sezernieren. Er konnte darüber hinaus einen membranständigen Rezeptor identifizieren, der die eisenbeladenen Siderophore aufnimmt (HEESEMANN, 1990).

Nicht alle Yersinien- Stämme besitzen sowohl Siderophore als auch Siderophorenrezeptoren. Während beispielsweise Angehörige der Serovare O:8 und O:21 mit beidem ausgestattet sind, besitzen Angehörige der Serovare O:3, O:9, O:5,27, O:1,2,3 und O:20 nur diese Rezeptoren. Durch Zugabe von Desferrioxamin, einem von Streptomyceten gebildeten Siderophorin, ließ sich in infizierten Mäusen das Wachstum von Keimen des Serovars O:8 nur geringfügig, das der Serovare O:3 hingegen um das 10^5 - fache steigern. Hierzu passend wurde die klinische Beobachtung gemacht, dass Patienten unter Therapie mit Desferrioxamin, das zur Ausschwemmung von pathologisch erhöhtem Eisen im Blut eingesetzt wird, vermehrt an schwer verlaufenden Infektionen mit *Y. enterocolitica* Serovar O:3, erkrankten (N.N., 2000). Mutanten mit einem Defekt im Siderophoren- Aufnahmesystem sind weniger virulent als der Mutterstamm. Damit gehört die Siderophor- Determinante zu den wenigen, bisher bewiesenen chromosomalen Pathogenitätsfaktoren von Yersinien (HEESEMANN, 1990).

2.2.2 Plasmid kodierte Pathogenitätsfaktoren

Die wesentlichen Pathogenitätsdeterminanten von humanpathogenen Yersinien sind extrachromosomal auf Virulenzplasmiden lokalisiert (HEESEMANN, 1994). Alle *Y. enterocolitica*- Stämme mit voller Virulenz besitzen nur ein einziges Plasmid von 70 kb Größe (VESIKARI et al., 1981; HEESEMANN et. al., 1983; SKURNIK et al., 1983; CORNELIS et al., 1998). Dieses Virulenzplasmid wird mit pYV (plasmid for *Yersinia* virulence) abgekürzt. Es ist zwingend für die Pathogenität eines *Y. enterocolitica*- Isolates erforderlich (PORTNOY und

MARTINEZ, 1985). Im Gegensatz dazu beherbergt *Y. pestis* drei Plasmide von 10 kb, 70 kb sowie 100 kb Größe. Der Verwandtschaftsgrad des 70 kb-Plasmids der verschiedenen *Yersinia*-Arten beträgt 50 – 90% DNS-Sequenzhomologie (HEESEMANN, 1994). Das Vorhandensein eines Virulenzplasmids ermöglicht den pathogenen *Y. enterocolitica*-Isolaten das Überleben und die Replikation in Lymphgewebe. Das 70 kb- Virulenzplasmid kodiert für zahlreiche Proteine, die im Zytosol, der äußeren Membran, oder als sezernierte Exoproteine vorkommen können. Es kodiert unter anderem für das Außenmembranprotein YadA (*Yersinia* adhesin A), für eine Vielzahl von sekretorischen Proteinen, die als Yops (*Yersinia* outer membrane protein) bezeichnet werden und für deren Sekretionsapparate, Ysc (Yop secretion) genannt. Das kollagenbindende Außenmembranprotein YadA ist von entscheidender Bedeutung für die Enteropathogenität.

Bei *Y. pestis* wird das *yadA*- Gen aufgrund einer Punktmutation nicht exprimiert, was erklären könnte, dass die Infektion mit diesem Erreger nicht zu einer Durchfallsymptomatik führt (HEESEMANN, 1994). Die Expression des *yadA*-Gens erfolgt bei +37°C (DE ROUVROIT et al., 1992). Dass YadA von Bedeutung für die Adhäsion an der Bürstensaummembran ist, wurde am Kaninchendarm gezeigt (PAERREGAARD et al., 1991). Weitere Eigenschaften von YadA, die für die Virulenz eine entscheidende Rolle spielen, sind: Serumresistenz (HEESEMANN et al., 1983), Oberflächenhydrophobizität (LACHICA et al., 1984), Autoagglutination (SKURNIK et al., 1984), Adhäsion zu epithelialen Zellen (HEESEMANN et al., 1987), Expression von Fibrillen und Hämagglutination (KAPPERUD et al., 1987), Resistenz gegenüber polymorphkernigen Leukozyten, Bindung an Neutrophile (RUCKDESCHEL et al., 1996) und Bindung an Kollagene (EL TAHIR und SKURNIK, 2001). Unter dem Elektronenmikroskop erscheint das Protein wie eine fibrilläre extrazelluläre Matrix um das Bakterium herum (KAPPERUD et al., 1987). Die Expression der YadA ist im Gegensatz zu den YoPs vom Kalziumgehalt des Mediums unabhängig (MICHIELIS et al., 1991; SKURNIK und TOIVANEN, 1992). YadA besitzt funktionell eine schützende Funktion. Eine der wichtigsten und gleichzeitig sehr kontrovers diskutierten Funktionen ist der Schutz der Bakterienzelle vor Zerstörung durch Phagozytose (CHINA et al., 1994; VISSER

et al., 1996). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind zurzeit noch unklar, jedoch wird vermutet, dass YadA an der Bindung des Bakteriums an die eukaryotische Zelle beteiligt ist. Hierdurch werden die Yops in die Zelle eingeschleust und verhindern dann ihrerseits die Phagozytose (RUCKDESCHER et al., 1996).

Die *yop* (Yersinia outer Protein)- Gene des Virulenzplasmids von *Y. enterocolitica* kodieren 14 verschiedene Yops (CHENG und SCHNEEWIND, 1999). Von PORTNOY et al., (1981) wurden die Yops erstmals in der Außenmembran- Fraktion des Bakterienextraktes beschrieben und aus diesem Grund auch als *Yersinia*- Außenmembranproteine bezeichnet. Heute nennt man die Yops Sekretionsproteine, da man sie im Überstand von Kalzium-defizientem Kulturmedium wieder findet (MICHIELIS et al., 1990). Die Expression der Yops erfolgt bei +37°C und wird durch niedrige Kalziumkonzentrationen (< 0,5 mM) verstärkt (BOLIN et al., 1982; HEESEMANN et al., 1986; MICHIELIS et al., 1990; CORNELIS et al., 1998). Verschiedene Untersuchungen zur Lokalisation der Yops während der Infektion wurden anhand von HeLa- Zellen (Henrietta Lacks- Zellen) und kultivierten Makrophagen durchgeführt (ROSQVIST et al., 1994; SORY und CORNELIS, 1994; LEE et al., 1998). Die YopE, YopH, YopM, YopN, YopO, YopP und YopT werden in das Zytosol der eukaryotischen Zelle injiziert (ROSQVIST et al., 1994; BOLAND et al., 1996; IRIARTE und CORNELIS, 1998). YopB, YopD und YopR findet man dagegen im extrazellulären Milieu (LEE und SCHNEEWIND, 1999). Zunächst liegen die Yops im Zytoplasma vor, zum Teil stabilisiert durch Yop- spezifische Chaperone (HEESEMANN und HENSEL, 2000). Die Einschleusung in die eukaryotische Zelle erfolgt durch ein Proteinsekretionssystem vom Typ III, dessen *ysc* (Yop secretion)- Gene ebenfalls auf dem Virulenzplasmid lokalisiert sind. Am Aufbau des Typ III- Proteinsekretionssystems von *Y. enterocolitica* sind 20 Proteine beteiligt (ÖLSCHLÄGER und HACKER, 2000). Das Typ III- Proteinsekretionssystem wird bei +37°C so weit präformiert, dass es bei einem Kontakt von *Y. enterocolitica* mit der eukaryotischen Zelle die Yops als Effektorproteine in das Zytoplasma der Zielzelle injiziert. Yops inhibieren in unterschiedlicher Weise die Signalinduktionskaskade, welche die Abwehrzellen normalerweise nach

bakteriellem Kontakt aktivieren und die Yersinien somit vor Phagozytose durch Makrophagen schützen. YopH hemmt die Tyrosindephosphorylierung der Komponenten des fokalen Adhäsionskomplexes und somit die Phagozytose und den „oxidative burst“ der polymorphkernigen Granulozyten und Makrophagen (HEESEMANN und HENSEL, 2000). YopE und YopT verstärken den Effekt von YopH, indem sie das Zytoskelett schädigen (CORNELIS und WOLF-WATZ, 1997).

2.3 Epidemiologie

Die Yersiniose stellt als Zoonose eine Gefahr für die Gesundheit von Mensch und Tier dar (NEUBAUER et al., 2001a, 2001b). Trotzdem gibt es in Deutschland nur wenige Angaben zur Prävalenz von *Y. enterocolitica* bei Menschen und bei Tieren. MEHNERT et al. (2001a) berichteten auf der Basis von Meldungen nach der EU- Zoonosen- Richtlinie (92/117/EWG) in Deutschland von über 4778 humane Erkrankungen mit *Y. enterocolitica* im Jahre 2000. Die Übertragung erfolgt vorwiegend über Lebensmittel. Als Träger sind dabei insbesondere Rind, Schwein und das Wildschwein zu nennen. Das beim Menschen in erster Linie Infektionen verursachende Bioserovar 4/O:3 (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1996) wurde im Jahre 1999 insgesamt vergleichsweise selten gemeldet. Für das Schwein wurde das Seovar O:3 nur in 9 Fällen (0,12%) angegeben (HARTUNG, 2000). Bioserovar 4/O:3 ist in Nordeuropa am weitesten verbreitet bei Menschen mit gastroenteralen Beschwerden (BORCH et al., 1996) und wird auch in Deutschland am häufigsten isoliert. Das ROBERT KOCH- INSTITUT (2002) berichtete über das erstmalige Auftreten einer *Y. enterocolitica*- Infektion ausgelöst durch das Bioserovar 1B/O:8 im Oktober 2001. Dieses Bioserovar machte im Jahr 2001 89,9% aller gemeldeten Yersiniose- Fälle in Deutschland aus, des Weiteren wurden pathogene *Y. enterocolitica* des Bioserovars 2/O:9 (5,8%) und 2/O:5,27 (0,7%) mit menschlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Beschränkte sich die Meldepflicht für Yersiniose früher noch auf einzelne Länder in Deutschland, so ist mit der Einführung des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) am 01.01.2001 eine Meldung bundesweit verpflichtend. Gemeldete Fälle werden

dabei verschiedenen Falldefinitionen zugewiesen: nur klinisch-labordiagnostisch und klinisch-epidemiologisch erfasste Yersiniose-Fälle gehen als so genannte Referenzdefinition in die Jahresstatistik der Yersiniosen ein. Ist von einem gemeldeten Yersiniose-Fall beispielsweise nur die labordiagnostische Erregerisolierung bekannt, nicht aber das klinische Krankheitsbild, so wird dieser Fall nicht in der Jahresstatistik berücksichtigt (ANONYMUS, 2002b). So wurden 7.191 Fälle 2001, 7.524 Fälle 2002 und 6.571 Fälle 2003 erfasst. Mit 4.974 gemeldeten Fällen im Jahr 2006 und durchschnittlich 83 Erkrankungsfällen pro Woche geht von dem Erreger *Yersinia enterocolitica* eine ernstzunehmende gesundheitliche Gefahr aus (ANONYMUS, 2007). Trotz der Meldepflicht für Yersiniose, ist von einer ca. zehnfach höheren Dunkelziffer auszugehen. In Deutschland steht sie somit nach *Salmonella* und *Campylobacter* auf Platz 3 der häufigsten Durchfallerreger. Nach KNAPP (1983) blieb *Y. enterocolitica* in der Humanmedizin lange Zeit weitgehend unbeachtet. Inzwischen wird der Erreger dank verbesserter diagnostischer Möglichkeiten immer mehr im Zusammenhang mit Darm-erkrankungen isoliert. Wegen der unterschiedlichen Pathogenität einzelner Stämme ist die Typisierung von Isolaten unumgänglich. Das muss auch bei epidemiologischen Erhebungen beachtet werden. *Y. enterocolitica*-Infektionen rufen beim Menschen eine akute Enteritis hervor. Als Komplikationen können reaktive Enteritis, Erythema nodosum, Uveitis und Thyreoiditis auftreten (NEUBAUER et al., 2001b). In Deutschland konnte bei gesunden Blutspendern eine serologische Prävalenz von ca. 40% festgestellt werden. Dies lässt eine Vielzahl subklinischer Infektionen beim Menschen vermuten (MÄKI- IKOLA et al., 1997).

2.3.1 Übertragungsmöglichkeiten von *Y. enterocolitica*

Die Infektion von Mensch und Tier erfolgt überwiegend oral-alimentär. Dafür sprechen sowohl der Erregernachweis in Tonsillen und Kot latent infizierter Tiere, wie auch der Ort des Primäreffektes beim Menschen, die Darm-schleimhaut (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Bei Menschen treten Infektionen mit *Y. enterocolitica* scheinbar häufiger auf als beim Tier (SELBITZ, 1992). Dennoch sind Tiere, soweit sie Träger pathogener Stämme sind, als Ansteckungsquelle für den Menschen anzusehen. Als Infektionsquelle für

Erkrankungen des Menschen wird u. a. der Verzehr von kontaminiertem Schweinefleisch bzw. -zungen und -innereien (TAUXE et al., 1987; FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 2001a), aber auch von Milch- und Sojaprodukten, sowie Quellwasser aufgrund epidemiologischer Studien vermutet (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Eine direkte Übertragung von Mensch- zu- Mensch ist möglich (SCHIEMANN, 1989). LEE et al., (1990) berichteten über *Y. enterocolitica* O:3 Erkrankungen bei Kleinkindern, die Infektionen durch erkrankte Pflegepersonen ausgesetzt waren. Eine indirekte Übertragung von Mensch- zu- Mensch kann über infizierte Blutkonserven stattfinden; die daraus entstehende Yersinien- Sepsis verläuft jedoch weitaus gefährlicher als die alimentäre Form (ABER, 1990; JACOBS et al., 1989). Nach einer 1997 in den USA durchgeführten Risikobewertung, kommen Yersinien-assoziierte Transfusionszwischenfälle mit einer Häufigkeit von etwa 1:500 000 übertragener Erythrozytenkonzentrate vor (N. N., 2000). Sowohl hier als auch in Lebensmitteln spielt die Psychrotoleranz bzw. das Wachstum des Bakteriums bei Temperaturen bis 0°C eine entscheidende Rolle (NESBAKKEN, 1992). Zwischen Tieren erfolgt die Übertragung bei gemeinsamer Aufstallung wahrscheinlich überwiegend durch erregerehaltigen Kot und über die damit kontaminierte Umwelt. Bei Karnivoren ist daneben eine Infektion über infizierte Beute- und Futtertiere denkbar (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Rohes Schweinefleisch hat sich als eine wichtige Quelle für *Y. enterocolitica* Infektionen bei Hunden und Katzen herausgestellt (FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 2001b). Erkrankungen bei Tieren treten selten auf. Dennoch kann der Erreger relativ häufig im Darminhalt nachgewiesen werden, obwohl die betroffenen Tiere keine klinischen Symptome zeigen (KNAPP und THAL, 1988b). Bei Hunden, Katzen und Ratten wurden Serotypen O:3 und O:9 im Kot nachgewiesen. Dadurch ergibt sich eine weitere mögliche Infektionsquelle für solche Menschen, die einen relativ engen Kontakt zu ihren Haustieren haben. Gesicherte Ergebnisse fehlen jedoch noch.

2.3.2 Epidemiologie von *Y. enterocolitica* beim Geflügel

Über die Häufigkeit der Isolation von *Y. enterocolitica* aus Geflügelfleisch gibt es widersprüchliche Angaben, was möglicherweise auf die unterschiedlichen

Isolierungsmethoden zurückgeführt werden kann. Als hauptsächliches Reservoir für die Übertragung von *Y. enterocolitica* auf dem Menschen gilt nach wie vor das Schwein. SAMADI et al. (1982) fanden in Hühnerfleisch neben den apathogenen *Yersinia* spp. auch pathogene *Y. enterocolitica*, was sie auf fäkale Kontaminationen zurückführen. Der Erreger kommt auch bei Wildvögeln aller Arten vor und ist häufig aus dem Kot der Tiere zu isolieren. Obwohl der Mensch ebenfalls an Pseudotuberkulose erkranken kann, sind derartige Infektionen im Zusammenhang mit dem Verzehr von Geflügelfleisch nicht bekannt. Bei Geflügel sind Erkrankungen durch *Y. pseudotuberculosis* verbreitet und haben besonders in Putenbeständen oft enzootischen Charakter. Serovaren von *Y. enterocolitica*, die beim Menschen gastrointestinale Komplikationen sowie Septikämien und Arthritiden hervorrufen, haben für das Geflügel keine pathogenetische Bedeutung. *Y. enterocolitica* wurde aber des Öfteren im Darminhalt von Mastgeflügel nachgewiesen, ohne dass humanpathogene Serovare ermittelt werden konnten. Rohes Geflügelfleisch wurde in den letzten Jahren wiederholt mit Erfolg auf Yersinien, insbesondere *Y. enterocolitica*, untersucht, wobei die Nachweisraten mit 5 – 50% allerdings recht unterschiedlich ausfielen. Auch in essbaren Schlachtnebenprodukten (Lebern, Muskelmägen) wurden Vertreter dieser Spezies gefunden. Soweit eine serologische Differenzierung vorgenommen wurde, konnten diese bisher nicht mit Erkrankungen des Menschen in Verbindung gebracht werden.

2.3.3 Epidemiologie von *Y. enterocolitica* beim Schwein

Die Ausbreitung von *Y. enterocolitica* in den 70er und 80er Jahren wird durch den Wandel der Schweinehaltungsformen hin zu Großmastanlagen erklärt. Durch Zukauf infizierter Ferkel durchseuchen solche Bestände in kurzer Zeit (VERHAEGEN et al., 1998). SHIOZAWA et al. (1991) berichteten, dass *Y. enterocolitica* -Stämme bei 85% von 40 frisch geschlachteten Tieren isoliert werden konnten. In Belgien (TAUXE et al., 1987) und Norwegen (OSTROFF et al., 1994) wurde beim Vergleich des Schweinefleischkonsums im Bezug zur Yersiniosis beim Menschen rohes oder halbgares Schweinefleisch in den meisten Fällen als Ursache für die Infektion festgestellt. Schweine sind ein bedeutsames Reservoir für humanpathogene *Y. enterocolitica*- Stämme (FUNK et al., 1998; OFFERMANN et al., 1999). Eine Vergleichsstudie zwischen

isolierten, pathogenen Stämmen von Menschen und Schlachtkörpern bzw. Schweinefleisch zeigte, dass 80% der Humanisolate nicht von denen der Herkunft Schwein zu unterscheiden waren (FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 2001b). Schweine gelten allgemein als symptomlose Träger verschiedener Serovaren, obwohl durch experimentelle Infektionen bei Ferkeln mit dem pathogenen *Y. enterocolitica*- Serovar O:3 Enteritiden, Serositiden, Arthritiden, Meningoenzephalitiden und nekrotisierende Tonsillitiden beobachtet wurden. Bei Sauen beschrieben NATTERMANN et al. (1986) Fruchtbarkeitsstörungen und Aborte. Die Tonsillen eignen sich für den Nachweis einer vorangegangenen Infektion des Schweins am besten, da der Erreger dort bereits kurze Zeit nach der Infektion nachzuweisen ist (THIBODEAU et al., 1999). Er kann über Monate in den Tonsillen persistieren, während die Ausscheidung über den Darm nicht sicher nachzuweisen ist (KAPPERUD, 1991). In Süddeutschland bewegten sich die Isolationsraten von *Y. enterocolitica* O:3 bei Tonsillen von Schlacht-Schweinen um 60% und bei Kotproben um 10% (FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 2001c). Dementsprechend sind die Tonsillen Ausgangspunkt der Kontamination auf dem Schlachthof (FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 2001b). Untersuchungen in Finnland zeigten, dass rohe Schweinefleischprodukte eine wichtige Infektionsquelle für pathogene *Y. enterocolitica* sind (FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 2001d). Aber auch in gekochtem Schweinefleisch konnte der Erreger nachgewiesen werden (LOGUE et al., 1996).

2.4 Diagnostik von *Y. enterocolitica*

2.4.1 Eigenschaften des Erregers

Y. enterocolitica ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes, pleomorphes, peritrich begeißeltes Stäbchenbakterium, das eine Länge von 1,0 - 5,0 µm und eine Breite von 0,5 - 0,8 µm besitzt. *Y. enterocolitica* ist psychrotrop, das bedeutet sie können sich bei Kühlungstemperaturen bis -2°C vermehren. Die optimale Wachstumstemperatur beträgt +28 - +30°C, wobei die Obergrenze der Vermehrungsfähigkeit bei +43°C liegt. *Y. enterocolitica* unterscheidet sich von anderen *Yersinia*- Spezies durch eine Reihe biochemischer Merkmale. Die Verstoffwechselung verschiedener Zucker, Decarboxylierung von Ornithin,

Citratverwertung, Voges- Proskauer Reaktion und Indolbildung werden häufig zur Differenzierung herangezogen (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990). Doch auch *Y. enterocolitica* verhält sich nicht biochemisch einheitlich, es können deshalb verschiedene Biovare unterschieden werden (BERCOVIER et al., 1978; KAPPERUD und BERGAN, 1984), von denen das Biovar 1A als apathogen angesehen wird. Die Spezies *Y. enterocolitica* zeigt Sequenzunterschiede im 16S- rRNA- Gen zwischen amerikanischen und europäischen Stämmen, die aber nur 3% betragen und somit die Speziesgrenze nicht überschreiten (IBRAHIM et al., 1993; NEUBAUER et al., 1999). NEUBAUER et al. (2000a) schlagen aber aufgrund der Unterschiede im 16S- rRNA- Gen und dem Auftreten von Hybridisierungsgruppen die Teilung der Spezies *Y. enterocolitica* in die Subspezies *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* (amerikanische Isolate) sowie *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* (europäische Isolate) vor. Neuere Hybridisierungs- und Sequenzierungsergebnisse zeigen, dass in Zukunft die Etablierung weiterer Spezies und Subspezies erwartet werden kann (FENWICK et al., 1996; IBRAHIM et al., 1997a; NEUBAUER et al., 2000b).

2.4.2 Kulturelle Nachweismethoden

Das Schema zur Isolierung und Identifizierung von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln ist auf dem Prinzip der *Enterobacteriaceae*- Diagnostik aufgebaut. Aufgrund des qualitativen Nachweises beginnt dies mit einer Anreicherung des Erregers. Hierzu wird ein Teil des Probenmaterials in ein oder mehrere Nährmedien gegeben. Danach erfolgt die Isolation mittels eines Selektivagars mit anschließender Anzüchtung von Reinkulturen verdächtiger Kolonien auf einem Nähragar (ISO, 1993). Der Erregerisolierung müssen immer eine Serotypisierung, Biotypisierung und der Nachweis von Pathogenitätsfaktoren folgen, da neben den pathogenen auch zahlreiche apathogene Yersinien in vielen Proben nachgewiesen werden können. Es existieren derzeit in Europa zwei standardisierte Methoden zum Nachweis von Yersinien aus Lebensmitteln. Eine Methode ist in der ISO/DIS 10273 veröffentlicht (ISO, 1993). Ein wesentlicher Aspekt dieser Methode ist die Verwendung der Anreicherung mit Irgasan- Tircacillin- Kaliumchlorat- Medium (ITC). Die Methode nach ISO/DIS 10273 findet in den meisten Ländern Europas

Anwendung. Eine weitere Referenzmethode für den Nachweis von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln ist die Methode des Nordischen Komitees für Lebensmitteluntersuchung, NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS (NCFA, 1996). Der entscheidende Unterschied dieser Methode zur ISO/DIS 10273 besteht in der Verwendung des modifizierten Rappaport- Bouillon (MRB) an Stelle von ITC. Dabei wird eine 3- Stufen- Methode angewendet, die aus einer Kombination von Kälteanreicherung, Anreicherung in einem wenig selektiven Medium und Anreicherung in einem stark selektiven Medium (MRB) besteht (NCFA, 1996). Handelt es sich bei dem Untersuchungsmaterial um extraintestinale Proben ohne oder mit geringgradiger Begleitflora, wie Blut, Lymphknoten, Punkate oder Eiter, können nichtselektive Isolierungs- und Anreicherungsverfahren angewandt werden. Bei Stuhlproben hingegen werden Selektivnährböden, wie MacConkey- Agar, Cefsulodin- Irgasan- Novobiocin- Agar (CIN) oder Salmonella- Shigella- Agar (SS) empfohlen. Eine Direktkultur reicht bei Enteritiserkrankungen in der Regel aus, bei Rekonvaleszenten und symptomlosen Ausscheidern hingegen ist ein flüssiges Anreicherungsverfahren erforderlich. Bei stark kontaminierten Untersuchungsmaterialien vom Tier, aus Lebensmitteln oder der Umwelt sind in der Regel spezifische Anreicherungsverfahren notwendig (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990).

2.4.2.1 Anreicherung

Der ISO- Standard stellt eine gute Grundlage für die Isolierung pathogener Yersinien dar. Man unterscheidet bei der Anreicherung von *Y. enterocolitica* zwischen der so genannten Kälteanreicherung und der Selektivanreicherung. Die Kälteanreicherung, die grundsätzlich als eine Form der Selektivanreicherung anzusehen ist, basiert auf den psychrotrophen Eigenschaften von *Y. enterocolitica*. Eine Bouillon zur selektiven Anreicherung pathogener *Y. enterocolitica* entwickelten WAUTERS et al. (1988) und bezeichneten sie nach ihrer Zusammensetzung als Irgasan- Ticarcillin- Kaliumchlorid (ITC)- Bouillon. Die ITC- Bouillon wird 48 Stunden bei +22°C - +25°C bebrütet. Beide Medien eignen sich gut, um *Y. enterocolitica* Bioserovar 4/O:3 aus stark kontaminiertem Material zu isolieren. Die Methode nach ISO 10273 (ANONYMUS, 1994b) fordert das ITC- Medium zur selektiven Voranreicherung.

2.4.2.2 Isolation

Nach den einzelnen Voranreicherungsschritten wird auf unterschiedlichen selektiven festen Nährböden ausgestrichen. Eigens für die Isolierung von *Y. enterocolitica* wurde von SCHIEMANN (1979) ein spezieller Nährboden entwickelt. Das so genannte Cefsulodin- Irgasan- Novobiocin (CIN)-Agarmedium hemmt durch das Antibiotikum Cefsulodin *Pseudomonas (P.) aeruginosa* und durch das Antibiotikum Irgasan andere gramnegative Keime (wie z. B. *E. coli*). In Vergleichsuntersuchungen mit anderen festen Nährböden konnte gezeigt werden, dass der CIN- Agar der am stärksten selektive Nährboden für Spezies ist (HEAD et al., 1982; SCHIEMANN, 1983b; COX und BAILEY, 1990). Yersinien wachsen nach 24 bis 48 Stunden aerober Inkubation bei +28 °C auf CIN- Agarmedium als etwa 1 mm große glatte Kolonien mit einem rosa Kranz und dunkelrotem Kern, in einer so genannten „Kuhaugenform“. Bei schrägem Lichteinfall erscheinen sie hier fein granuliert und nicht irisierend. Der am weitesten eingeführte Selektivnährboden zur Isolierung von *Y. enterocolitica* ist das CIN- Agarmedium, der nicht nur kommerziell angeboten wird und in der ISO 10273- Methode (ANONYMUS, 1994b) als Selektivnährboden empfohlen wird, sondern sich auch für alle herkömmlichen Probenmaterialien und –herkünfte eignet. Die auf dem CIN- Agar verdächtig aussehenden Kolonien werden nach der ISO 10273- Methode zunächst auf ein nicht selektives Medium überimpft. Hierbei empfiehlt es sich, dieses Medium bei +25 °C zu inkubieren, um einen Plasmidverlust zu vermeiden (SCHIEMANN und WAUTERS, 1992).

2.4.2.3 Biotypisierung

Für eine erste Orientierung eignen sich der Urease- Nachweis und die Reaktion auf dem Eisen- Zweizucker- Agar nach Kligler. KERBER (1997) empfiehlt zusätzlich die Prüfung von Lysindecaboxylase, Oxidase, Katalase, H₂S und Beweglichkeit. Einige Autoren stellten die Eignung des Nachweises der Pyrazinamidaseaktivität heraus, da er mit einfachen Mitteln innerhalb von 24 Stunden ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal liefert (HAHN, 1989; PICHHARDT, 1989; SEELIGER und SCHRÖTER, 1990).

2.4.2.4 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 plasmidkodierte Virulenzfaktoren 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 und DEVENISH, 1982; LAIRD und CAVANAUGH, 1980). Virulente Stämme zeigen außerdem ein Kalziumabhängiges 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 und ZINK, 1984; SCHIEMANN und SWANZ, 1985) und die Induzierbarkeit der Yop- Sekretion (HEESEMANN et al., 1986) sind ebenfalls plasmidkodierte Pathogenitätsmerkmale. Ein weiteres Pathogenitätsmerkmal ist die Expression des chromosomal kodierten hitzestabilen Enterotoxins (PAI und MORS, 1978). Sowohl im Genom als auch auf Plasmiden verankert ist die Serumresistenz (CHIESA und BOTTONE, 1983) der virulenten Stämme. Apathogene Stämme können, chromosomal bedingt, Äskulin hydrolysieren und Salicin fermentieren (SCHIEMANN und DEVENISH, 1982). Zusätzlich zeigen sie Pyrazinamidase-Aktivität (KANDOLO und WAUTERS, 1985). Aufgrund des Ergebnisses eines einzigen Tests kann jedoch 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 Kalziumabhängige Wachstum sowie die Fähigkeit zur Autoagglutination bereits relativ verlässliche Hinweise auf das Vorliegen von pathogenen Stämmen geben. KWAGA und IVERSEN (1992)

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. Auf der Basis des genannten biochemischen Tests stehen mehrere kommerziell erhältliche Testsysteme für die genauere Identifizierung und die Differenzierung von *Y. enterocolitica* zur Verfügung. Dazu gehören z. B. die Systeme Api 20E, Api Rapid 32DIE und Micronaut. Die besten Ergebnisse für pathogene Yersinien liefert nach Untersuchungen von NEUBAUER et al. (1998) der Test- Kit Api 20E, mit dessen Hilfe die Autoren 95% der Proben korrekt bestimmten. Es wird hierbei von einer Sensitivität von 96% für *Y. enterocolitica* und 90% für *Y. pseudotuberculosis* ausgegangen (NEUBAUER et al., 1998; LINDE et al., 1999). Um eine eindeutige Identifizierung zu erreichen, muss nach einer anschließenden Biotypisierung noch eine serologische Differenzierung und Zuordnung stattfinden. Diese kann beispielsweise mittels Objektträger-Agglutination durch entsprechende Faktorenseren durchgeführt werden.

2.4.2.5 Serotypisierung

Die Zuordnung zu einem Serotyp von *Yersinia enterocolitica* erfolgt über eine Agglutinationsreaktion von serotypspezifischen Antikörpern mit der Bakterien-Oberfläche. Diese Typisierung wird auf einem Objektträger durchgeführt. Bei Raumtemperatur ist die Reaktion am deutlichsten, da die O- Antigene nicht durch Adhäsinfibrillen verdeckt sind (HEESEMANN, 1990). Durch die Bestimmung der Serogruppe kann nicht auf die Pathogenität des Isolates geschlossen werden (ALEKSIC und 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.

2.5 Molekulare Nachweismethoden

Im Laufe der vergangenen Jahre wurden für die Bakterientypisierung klassische Methoden aus der Immunologie, Biochemie und Genetik übernommen und für Untersuchungen im Rahmen von epidemiologischen Fragestellungen mit dem Terminus „Molekulare Epidemiologie“ bedacht. Hierbei wird Typisierungssystem vorausgesetzt, dass epidemiologisch verwandte Bakterien- Isolate, die im Rahmen der klonalen Expansion aus einem einzigen Vorläuferstamm hervorgegangen sind, charakteristische Eigenschaften teilen, die sie von anderen, epidemiologisch nicht verwandten Isolaten unterscheidet. Die Verwendung spezieller, charakteristischer Eigenschaften hängt dabei von der Stabilität dieser Eigenschaften innerhalb des Stammes und der Diversität innerhalb der Spezies ab. Diese Diversität reflektiert die evolutionäre genetische Divergenz, die durch zufällige, nicht letale Mutationen entsteht, welche im Laufe der Zeit akkumulieren. Solche Mutationen sind nachweisbar, wenn sie an Stellen auftreten, für die mit den heutigen Methoden Detektionsmöglichkeiten bestehen (MASLOW et al., 1993a; SCHMITZ et al., 1995). Genotypische Methoden haben den Vorteil, dass sie nicht auf eine phänotypische Expression von gattungsspezifischen Merkmalen angewiesen sind, welche häufig eine Temperaturabhängigkeit aufweisen (ITEMAN et al., 1996).

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist ein hoch sensitives und hoch spezifisches diagnostisches Werkzeug, das seit 1989 verstärkt in die Diagnostik eingeführt wurde. Durch ihren Einsatz können die gesuchten Bakterien direkt aus dem Untersuchungsmaterial detektiert werden. Eine PCR auf Basis von chromosomal- kodierenden und plasmid- kodierenden Gene ersetzt gleichzeitig den Pathogenitätsnachweis. Falsch negative Ergebnisse nach Plasmidverlust sind jedoch möglich (NEUBAUER et al., 2000a). Mehrere Methoden auf Basis chromosomaler und plasmid- assoziierter Gene sind bereits für die Detektion von *Y. enterocolitica* entwickelt worden (NEUBAUER et al., 2001a), auch eine in- situ Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden ist möglich (TREBESIOUS et al., 1998). Hierzu zählen die Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), das Ribotyping, die Restriction

Endonuclease Analysis of Plasmid (REAP), die Restriction Endonuclease Analysis of Chromosome (REAC), das Multilocus Sequence Typing (MLST), die Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), die Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)- Methode und die Sequenzierung (Tabelle 1).

Tabelle 1: Charakteristika genotypischer Typisierungsmethoden (modifiziert nach VIRDI et al., 2005)

Methode	Typisier- barkeit	Reproduzier- barkeit	Diskriminierungs- stärke	Vorteile	Nachteile
REAP	variabel	gut	schwach	-einfache Handhabung -einfache Interpretation	-schlechte Diskriminierung
REAC	gut	mäßig	mäßig	-einfache Handhabung	-schwierige Interpretation
RAPD	mäßig	mäßig	gut	-schnell -preiswert	- schwierige Interpretation - viele Variablen beeinflussen Reproduzierbarkeit
Ribotyping	sehr gut	gut bis sehr gut	variabel	-mäßige Handhabung - einfache Interpretation	-aufwendige Durchführung - hohe Kosten (Gerät, Material) - hohe Zeitaufwand
PFGE	sehr gut	gut bis sehr gut	gut	-mäßige Handhabung - einfache Interpretation	- aufwendige Durchführung - hohe Kosten (Gerät, Material) - hohe Zeitaufwand
AFLP	sehr gut	sehr gut	gut	-einfach Handhabung - einfache Interpretation	- hohe Kosten (Gerät, Material)
Sequencing	sehr gut	sehr gut	gut	- mäßige Handhabung	- schwierige Interpretation

2.5.1 DNS- Isolierung

Die Isolierung von DNS aus Bakterienzellen, die sich für die molekularbiologischen Untersuchungen eignet, erfordert mehrere Schritte. Zuerst wird die Zellwand lysiert, um die DNS zugänglich zu machen. Anschließend wird die DNS gewonnen, nachdem die Verunreinigungen wie Proteine oder Zelldetritus durch Bindung der DNS an Trägermaterialien oder durch Präzipitation und Sedimentation entfernt wurden. Im letzten Schritt wird die DNS mit geeigneten Puffern von Trägermaterialien eluiert oder resuspendiert.

2.5.1.1 Lyse der Zellen

a. Enzyme

Durch den Einsatz von Enzymen (Proteinase K, Lysozym, Protease, Pronase) werden die in der Zellwand enthaltenen Proteine verdaut und somit die Stabilität der Zellwand zerstört. Proteinase K, eine Serinprotease, wird seit 1970 für die Lyse von Zellen eingesetzt. Das Enzym, dessen Name sich von seiner keratinhydrolysierenden Eigenschaften herleitet, wird aus dem Schimmelpilz *Tritirachium album* gewonnen. Es ist in der Lage, native Proteine zu hydrolysieren, in dem es Peptidbindungen bevorzugt zwischen Alanin und Arginin spaltet. Als positiver Nebeneffekt werden störende Enzyme wie DNAsen inaktiviert. EDTA wirkt laut EBELING et al. (1974) auf die Enzymaktivität nicht inhibitorisch. Das pH- Optimum liegt zwischen 7,5 und 12,0 (AUSUBEL et al., 1998; EBELING et al., 1974; MERCIER et al., 1990; HIGUCHI, 1992). Der Effekt von Proteinase K kann durch den Zusatz von Sodiumdodecylsulfat (SDS) verstärkt werden (GROSS-BELLARD et al., 1973). BARRY und GANNON (1991) versetzten autoklavierte Mykobakterienkulturen mit Proteinase K. Nach Inkubation bei +56°C und anschließender Hitzeinaktivierung bei +95°C wurde die DNS ohne weitere Behandlung in die PCR eingesetzt.

b. Detergenzien

Die Zellmembran besteht aus einer Doppelschicht, die sich durch den Einsatz von Detergenzien lysieren lässt. Detergenzien sind amphipatische, oberflächenaktive Substanzen, deren Moleküle polare und unpolare Regionen besitzen. Sie binden an hydrophobe Moleküle und lösen diese in wässriger Lösung. Anwendung finden sowohl ionische (SDS) als auch nichtionische (Triton X-100®, Tween®, Cetyltri-

methylammoniumbromid [CTAB]) Detergenzien. CTAB kann, in Abhängigkeit der NaCl- Konzentration, für die Präzipitation von Proteinen eingesetzt werden. Bei niedriger NaCl- Konzentration bilden Nukleinsäuren mit CTAB einen unlöslichen Komplex, der sedimentiert werden kann (MÜLLER und BRUCHHAUS, 1997).

2.5.1.2 Gewinnung der DNS

a. Phenol/Chloroform

Die klassische Methode der DNS- Isolierung stellt die Extraktion mit Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol dar (AUSUBEL, 1998). Das Phenol dient hierbei als organisches Lösungsmittel zur Lyse der Zellen, indem es die Zellwandproteine denaturiert. Die Proben werden mit Phenol ausgeschüttelt. Die DNS und RNS befindet sich aufgrund der polaren Gruppen des Zuckerphosphat- Rückgrats in der oberen wässrigen Phase. Die hydrophoben Lipide befinden sich in der organischen unteren Phase und die Proteine verbleiben in der Interphase (KIRBY, 1957; WALLACE, 1987a; BORST und MILLER, 1990). Die obere DNS- haltige Phase wird vorsichtig abgenommen. Chloroform wird als zweites organisches Lösungsmittel eingesetzt. Übermäßige Schaumbildung wird durch Zugabe von Isoamylalkohol verhindert. Dieser stabilisiert außerdem die Trennung der Phasen (MARMUR, 1961). Nach Präzipitieren und Waschen der DNS mit Ethanol oder Isopropanol wird diese in Aqua bidest. oder Puffer aufgenommen. So konnte aus für die PCR- Amplifikation problematischerem Ausgangsmaterial wie Gewebe und Vollblut DNA isoliert werden, da Inhibitoren ebenfalls entfernt werden (KOX et al., 1994). Phenol ist toxisch, kanzerogen und stark ätzend, so dass erhöhte Vorsichtsmaßnahmen (Abzug, Schutzbrille) erforderlich sind (LEWIS, 1993). Mit der Phenol/Chloroform-Methode wurde aus Leukozyten und Zellen eine höhere DNA- Ausbeute erzielt als mit Proteinase K- Verdau und anschließender Salzpräzipitation (BUFFONE und DARLINGTON, 1985). So wurde z.B. aus Hautbiopsieproben eine 5- Fach höhere Ausbeute erzielt als mit einer Guanidinthiocyanat (GITC)- Aufreinigung (DÖBBELING et al., 1997).

b. Ionenaustauscher

DNS kann mit Hilfe eines Ionenaustauschers isoliert werden. Ein Anionen- austauscher besitzt positiv geladene Gruppen, die mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS- Moleküle interagieren. Die Bindung erfolgt in

Abhängigkeit von der Salzkonzentration und dem pH- Wert der Lösung. Mittels Waschschritten werden Verunreinigungen wie Proteine oder Kohlenhydrate entfernt. Die DNS wird anschließend von dem Ionenaustauscher eluiert. Eine andere Art von Ionenaustauscher stellt Chelex® 100 dar. Die Chelex®- Matrix ist ein Chelatbildner mit einer hohen Affinität zu polyvalenten Metallionen. Sie besteht aus Polystyrendivinylbenzen- Kopolymeren und trägt Iminodiacetat- Ionen als chelatbildende Gruppen. Der stark alkalische pH- Wert der Matrix und die Einwirkung von Hitze beim Kochen zerstören die Zellwand. Auf dieser Weise wird die DNS aus der Zelle freigesetzt. Während des Kochvorgangs wird außerdem die Degradation der DNS durch die Chelierung von Metallionen verhindert. Eine Trennung der DNS von Verunreinigungen (Proteine, Zelldetritus) wird nicht vorgenommen (WALSH et al., 1991; BERNAL et al., 1997; DE LAMBALLERIE et al., 1992; SANTURDE et al., 1996). Die auf dieser Weise gewonnene DNS eignet sich für die Genotypisierung von Stämmen mittels PCR. Für die Feindifferenzierung der Stämme wird meistens reine DNS benötigt, die mittels DNS- Isolation- Kits gewonnen wird. Bei den meisten dieser Kits ist die gleichzeitige Isolierung, Gewinnung und Aufreinigung von DNS bzw. RNS möglich.

2.5.2 Restriktionsenzymanalyse des Plasmids (REAP)

Plasmide sind extrachromosomale Strukturen, die in der Bakterienzelle als zirkuläre, doppelsträngige DNS- Moleküle vorliegen und z. B. für Antibiotika- Resistenzen oder für die Produktion von Toxinen verantwortlich sind. Plasmide können selbstständig durch Konjugation, mit Hilfe eines Transferfaktors oder durch Bakteriophagen zwischen Bakterien ausgetauscht werden (ITMAN et al., 1996). Bei der Plasmid- Profil- Analyse werden Bakterien- Plasmide isoliert und anschließend separiert um ihre Zahl und Größe zu ermitteln. Zusätzliche Informationen gewinnt man durch die anschließende Restriktionsenzymanalyse des Plasmids, bei der die DNS des Plasmids mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen gespalten wird und anschließend Zahl und Größe der entstandenen Restriktionsfragmente verglichen werden. Die Diskriminierungsfähigkeit dieser Methode ist bei denjenigen Bakterienstämmen gering, die über keine bzw. nur ein oder zwei Plasmide verfügen. Die Durchführbarkeit dieser Methode ist einfach, auch die Ergebnisinterpretation bereitet keine Schwierigkeiten (MASLOW et al. 1993a, SCHMITZ et al., 1995). FUKUSHIMA et al. (1993, 1997) zeigte die Korrelation zwischen geografischer Verteilung und der

REAP- Muster unter der *Y. enterocolitica* Serotyp O:5, 27.

2.5.3 Restriktionsendonukleasen- Analyse chromosomaler DNS (REAC)

Restriktionsendonukleasen spalten enzymatisch DNS an definierten Stellen bestimmter Nukleinsäuresequenzen. Die Anzahl und Größe der so gewonnenen Restriktionsfragmente spiegelt die Frequenz und Verteilung dieser zu schneidenden Nukleinsäuresequenzen wider. Bei der REAC werden Endonukleasen mit einer hohen Zahl an Schnittstellen eingesetzt, so dass teilweise Hunderte von Fragmenten mit einer Länge von 0,5 – 50 kb entstehen. Diese Fragmente werden anschließend mittels Agarose- Gel- Elektrophorese separiert. Unterschiedliche Stämme der gleichen Bakterienspezies sollten voneinander zu diskriminierende Bandenmuster aufweisen, da DNS- Sequenzen verschiedener Bakterienstämme variierende Restriktionsschnittstellen besitzen. Das Hauptproblem dieser Methode liegt in der sehr schwierigen Interpretation der komplexen Bandenmuster die aus hunderten von teilweise nicht getrennten bzw. einander überlappenden Banden bestehen können, obwohl sie in der Praxis einfach und schnell durchführbar ist (MASLOW et al., 1993a).

2.5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR) ermöglicht es, spezifische DNS- Abschnitte mit Primern zu amplifizieren und nachzuweisen. Aufgrund dieser Amplifikationen benötigt man nur geringe Ausgangsmengen an ursprünglicher DNS. Diese kann sowohl aus rekombinanter DNS oder genomischer DNS (Bakterien, Parasiten, eukaryotische Zellen) bestehen. Die DNS wird als Template (DNS- Matrize) dem so genannten Mastermix zugegeben, der sich aus Reinstwasser, Oligonukleotiden, Desoxynukleosid- triphosphaten, Puffer und einer DNS- Polymerase zusammensetzt. Oligonukleotide sind kurze, einzelsträngige DNS- Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNS- Matrize sind. Von der Auswahl der Oligonukleotide hängen letztlich die Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit einer PCR- Methode ab (RYCHLIK, 1995). Das Prinzip der PCR ist, dass eine DNS- Polymerase, ausgehend von den vorliegenden Oligonukleotiden, einen neuen DNS-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure- Matrize aus den zugesetzten Desoxynukleosidtriphosphaten synthetisiert. Mit Hilfe der Primer kann die DNS- Polymerase milliardenfache Kopien der gewünschten

Sequenz produzieren (GLICK und PASTERNAK, 1995; ALBERTS et al., 1998). Der Puffer wird der Reaktion zugesetzt, um optimale Milieubedingungen für die DNS-Polymerase zu schaffen. Ein PCR- Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNS- Doppelstranges, indem dieser bei +92 bis +94 °C aufgeschmolzen wird. So entstehen einzelsträngige DNS- Matrizenmoleküle. Danach erfolgt die Anlagerung (sog. „Annealing“) der Oligonukleotide an die einzelsträngige DNS- Matrize bei einer für das Oligonukleotidpaar spezifischen Temperatur, die bei ca. +50 °C liegt. Auf diesem Weg wird die Amplifikation des dazwischenliegenden Sequenzabschnittes (sog. „Elongation“) eingeleitet. Diese erfolgt normalerweise bei +72 °C durch das Enzym DNS- Polymerase, da das Aktivitätsoptimum der DNS-Polymerase bei +72 °C liegt.

Aber auch bei einer Temperatur von +95 °C bleibt die DNS- Polymerase noch bis zu einer halben Stunde lang stabil, so dass sie auch alle Denaturierungsschritte der einzelnen Zyklen überstehen kann. Demnach besteht ein PCR- Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Die Zyklenzahl einer durchschnittlichen PCR- Methode besteht zwischen 25 und 35 Zyklen (MULLIS et al., 1986; SCHOCHETMAN et al., 1988; EISENSTEIN, 1990; ROLFS et al., 1992; HÖFLER, 1994; NEWTON und GRAHAM, 1997; MARTIN und TIMMERS, 1997). Anschließend erfolgt die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate, die Färbung der Gele und die Auswertung der erhaltenen Bandenmuster. Aufgrund des Vorhandensein von zahlreichen Kopien der 16S- rRNA- Gene in den Yersinien, konnten NEUBAUER et al. (2000a und 2000b) mittels PCR auf Basis von 16S- rRNA- Gen und anschließenden Sequenzierung die *Y. enterocolitica*- Stämmen in zwei Subspezies unterteilen: Die *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* und *Y. enterocolitica* subsp. *paleoartica*. Das Virulenzplasmid (pYV), das hitzestabile Enterotoxin- Gen (*yst*) und die an der Invasion beteiligten Gene *ail* und *inv* stellen die Basis für einen spezifischen Nachweis von *Y. enterocolitica* mittels PCR- gestützter Verfahren (FENG et al., 1992; HARENTT et al., 1996; IBRAHIM et al., 1997b; KWAGA et al., 1992).

WREN und TABAQCHALI (1990) berichteten, dass die Amplifikation eines 590 bp großen Bereiches des *virF*- Gens für die Identifikation von pathogenen Stämmen mittels PCR- Methode geeignet ist. Von 58 untersuchten Stämmen waren allerdings 8 Stämme falsch negativ, da sie durch mehrmalige Subkultivierung ihr Virulenz-

plasmid verloren hatten. Dieser Befund unterstreicht die Problematik von Nachweismethoden, die ausschließlich auf dem Virulenzplasmid basieren. Eine auf dem *yadA*-Gen des Virulenzplasmiids basierende „nested PCR“-Methode wurde von KAPPERUD et al. (1993) publiziert. Mit diesem Verfahren konnten alle pathogenen Serogruppen (O:3, O:5,27, O:8, O: 9, O:13 und O:21) von *Y. enterocolitica* identifiziert und von *Y. pseudotuberculosis* abgegrenzt werden. FENWICK und MURRAY (1991) gelang es, DNS von *Y. enterocolitica*, aber nicht von *Y. pseudotuberculosis* zu amplifizieren. Sie verwendeten Oligonukleotide, die auf dem chromosomalen *ail*- Gen basieren und konnten somit zwischen *Y. enterocolitica* und von *Y. pseudotuberculosis* differenzieren. Die spezies- spezifische PCR- Detektion von *Y. enterocolitica* auf Basis des *ail*- Gens gelang aber erst KWAGA und Mitarbeitern (1992). Durch eine Multiplex- PCR- Reaktion, die auf den Genen *virF*, *ail* und *inv* basiert, konnten NAKAJIMA et al. (1992) 27 *Y. enterocolitica*- Stämme und 31 *Y. pseudotuberculosis*- Stämme hinsichtlich ihrer Spezies und des Vorhandenseins eines Plasmids charakterisieren.

Das chromosomal lokalisierbare *ail*- Gen pathogener Isolate wurde von KWAGA et al. (1992) genutzt, um ein 273 bp großes Fragment von pathogenen Isolaten zu amplifizieren. Zum Nachweis von *Y. enterocolitica* wurden in den letzten Jahren verschiedenste PCR- Methoden entwickelt, um den Erreger in Lebensmitteln, klinischem Material und Umweltproben zu detektieren. Die PCR- Methoden unterscheiden sich im Wesentlichen durch ihre Probenaufbereitung. Die Zielsequenzen sind oft die gleichen, sie werden jedoch mit unterschiedlichen Aufbereitungsmethoden kombiniert und diese dann an das zu untersuchende Material mit seinen jeweiligen spezifischen inhibitorischen Substanzen angepasst.

2.5.5 Ribotypisierung

Die Ribotypisierung nutzt das Prinzip der "Southern Blot"- Analyse. Nach Enzymrestriktion chromosomaler DNS und Auftrennung der Restriktionsfragmente mit Hilfe der Gelelektrophorese wird das die DNS enthaltende Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Zur Erkennung von bestimmten Gensequenzen setzt man radioaktiv oder enzymatisch markierte Nukleinsäure-Abschnitte, so genannte Gen- Sonden ein, die an komplementäre Nukleinsäure Abschnitte der Probe binden. Bei der Ribotypisierung verwendet man dabei Sonden zum Nachweis von Genen, die ribosomale RNS (rRNA) kodieren. Solche Gene werden auch

Operone genannt und kommen in mehreren Kopien im Bakteriengenom vor (MASLOW et al., 1993a). rRNA ist ein Bestandteil der Ribosomen, dem Ort, an dem die Proteinbiosynthese der Zelle stattfindet. Sie kommt bei allen Bakterienspezies vor und ist hochgradig konserviert. Das Ribosom von *Escherichia coli* ist sehr gut untersucht, ihre rRNA besteht aus 16S, 23S und 5S großen Sequenzen, diese werden als gängige Gen- Sonden verwendet. Da die Gene für rRNA in mehreren Kopien im Genom vorliegen, können Bakterien 5 – 7 Operone enthalten, die jeweils auf unterschiedlich großen Restriktionsfragmenten liegen können. Mit Hilfe der Ribotypisierung gelingt dann die Darstellung von typischerweise 10 – 15 Banden, so dass in der Regel eine übersichtliche Interpretation der Ergebnisse möglich ist. Auch eine gute Reproduzierbarkeit ist bei dieser Methode gegeben, nachteilig ist der hohe Zeitaufwand (SCHMITZ et al., 1995).

2.5.6 Sequenzierung

Mit Hilfe der DNS- Sequenzierung kann die Primärstruktur des Bakterien- Genoms entschlüsselt werden, sie ergibt sich durch die Bestimmung der Reihenfolge der Nukleotide im DNS- Strang. Zu ihrer Durchführung hat sich die enzymatische Methode nach Sanger bewährt. Der konzeptionelle Kern liegt in der Fähigkeit der DNS- Polymerase, einzelsträngige DNS von einem doppelsträngigen Startpunkt (Primer) ausgehend durch Einbau von komplementären Nukleotiden zu einem Doppelstrang zu ergänzen. Diese DNS- Polymerase kann aber auch natürlicherweise nicht vorkommende Nukleotide als Substrat verwenden, bei Verwendung von zweifach desoxygenerter Ribose als Bestandteil des Nukleotids (Didesoxynukleotid) kommt es zum Abbruch der weiteren Kettenverlängerung da eine Verknüpfungsstelle verloren geht. In vier parallelen Ansätzen wird bei dieser Methode eine DNS- Replikation gestartet, die dann durch die Anwesenheit eines der vier möglichen Didesoxynukleotids (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) gestoppt wird. Es entstehen dabei DNS- Ketten unterschiedlicher Länge die elektrophoretisch aufgetrennt werden und z. B. aufgrund einer radioaktiven Markierung sichtbar gemacht werden können. Aus der Kettenlänge im Zusammenhang mit dem verwendeten Didesoxy- Nukleotid ergibt sich der relative Abstand der einzelnen Basen zum Primer. Handelt es sich bei der am weitesten gewanderten Bande beispielsweise um eine Reaktion die durch den Zusatz eines ddTTP gestoppt wurde, so lässt dies den Rückschluss zu, dass sich das komplementäre Nukleotid ATP in

unmittelbarer Nachbarschaft zum Primer befinden muss und deshalb die Replikation frühzeitig durch ddTTP abgebrochen werden konnte (HENTZE et al., 1990).

2.5.7 Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Bis etwa 1992 wurden genetische Fingerabdrücke mit der Methode des Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) hergestellt. Zur Ermittlung der Längenunterschiede (Polymorphismen) an den Loci wird zunächst mit einem Restriktionsenzym die DNS in Fragmente geschnitten. Die hierbei entstandenen Bruchstücke werden anschließend in einem Agarose- Gel im elektrischen Feld der Länge nach sortiert. Anschließend werden diese DNS- Bruchstücke mit der Methode des „Southern Blot“ auf eine Nylonmembran spiegelverkehrt übertragen und durch Wärme fixiert. Beim darauf folgenden Vorgang der Hybridisierung wird eine DNS- Sonde, ein DNS- Einzelstrang bekannter Basensequenz, verwendet, die aufgrund ihres komplementären Aufbaus von den gesuchten Loci angezogen wird und sich dort anlagert. Da diese Sonden mit Hilfe eines Leuchtmoleküls erkannt werden können, legt man die Nylonmembran auf einen Röntgenfilm und lässt den Film über Nacht belichten. Der Film ist schließlich nach dem Entwickeln an allen Stellen, wo sich die Sonden an eines der gesuchten DNS- Fragmente gebunden haben, schwarz gefärbt. Dabei entsteht das für den genetischen Fingerabdruck charakteristische Bandenmuster. Die Charakterisierung und Typisierung von *Y. enterocolitica*- Isolate aus Human- und Tierstämmen mittels RFLP wurde in zahlreichen Studien beschrieben (GABRIEL et al., 1992; SAKEN et al., 1994; SKWARK et al., 1994; SHARMA et al., 2006). Der Nachteil der RFLP- Technik ist die große Menge benötigter DNS (5 – 10 µg).

2.5.8 Random amplified polymorphic DNS (RAPD)

Normalerweise ist die Kenntnis der DNS- Sequenz an den Enden des gewünschten Fragments eine Voraussetzung für die PCR- Amplifikation, für die spezifische Primer benötigt werden. Es können aber auch mit Hilfe einer, durch einen einzelnen, kurzen, unspezifischen Primer gestarteten Polymerase- Kettenreaktion Fragmente amplifiziert werden. Diese Reaktion hat das Ziel, die Gesamt- DNS eines Organismus zu vermehren. Fingerprint- Muster mit einer Auflösung, die die Unterscheidung verschiedener Stämme einer Spezies von Organismen erlauben, können so erzeugt werden. Als Primer für die PCR wird ein einziges Oligonukleotid verwendet, die

Sequenz dieses Primers ist dabei beliebig. Bei der PCR- Amplifikation werden DNS- Regionen aus dem Genom, die zwischen jeweils zwei entgegengesetzt orientierten Primerbindungsstellen liegen, exponentiell angereichert. Nach Auftrennen der Amplifikationsprodukte durch Elektrophorese auf einem Agarosegel zeigt sich nach Anfärben mit Ethidiumbromid das Fingerprint- Bandenmuster verschiedener Stämme (TICHY und SIMON, 1994). Die Genotypisierung von *Y. enterocolitica* mittels RAPD wurde in zahlreiche Studien (RASMUSSEN et al., 1994; ODINOT et al., 1995a, 1995b; SHAYEGANI et al., 1995; LEAL et al., 1999). angewendet. Die RAPD ist eine sehr schnelle Methode. Diese Technik ist jedoch schwierig zu standardisieren und hat eine schlechte Reproduzierbarkeit (OLIVE und BEAN, 1999; WASSENAAR et al., 2000).

2.5.9 Multilocus sequence typing (MLST)

In den letzten Jahren ermöglichte die Einführung leistungsfähiger Verfahren zur DNS- Sequenzierung einen Zugewinn an Informationen über die Epidemiologie und die Populationsgenetik verschiedener Bakterienstämme. Bei einiger Spezies treten häufig Rekombinationen auf, die zu einem starken Austausch verschiedener Erbanlagen führen. Dadurch können sogar schwache klonale Beziehungen zwischen den untersuchten Isolaten aufgedeckt werden. Deshalb wird zur Genotypisierung eine Methode benötigt, die einerseits unempfindlich gegenüber geringgradigen Änderungen im Genom ist, andererseits diese Veränderungen zugleich detektiert. Im Jahre 1998 wurde das so genannte Multilocus Sequence Typing (MLST) als neues Typisierungsverfahren vorgestellt, welches auf der Sequenzierung mehrerer sog. Haushalts- Gene basiert. Dieses Verfahren entwickelte sich schon bald zu einem „Goldstandard“ für die Typisierung genetisch variabler Bakterienarten (ACHTMAN et al., 1999; KOTETISHVILI et al., 2005). Die MLST ermöglicht die Identifizierung eines Isolates durch den Vergleich der Nukleotid- Sequenzen einzelner konservierter Gene mit bekannten Allelen aus einer zuvor erstellten Datenbank. Diese Methode ist geeignet um genetische Beziehungen verschiedener Linien und Klone zu bestimmen, für epidemiologische Studien wird sie von WASSENAAR (2000) allerdings nicht empfohlen. Hingegen sprachen sich DUIM et al. (2003) und DINGLE et al. (2002) für eine Nutzung der MLST im Rahmen von Studien aus.

2.5.10 Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

Bei der konventionellen Gelelektrophorese in konstanten Feldern wandern die negativ geladenen DNS- Moleküle in einer Richtung zur Anode (SCHMITZ et al., 1995). Dies ist die gebräuchlichste Technik zur Trennung von DNS- Molekülen bis zu einer Größe von 50 kb, und entspricht etwa dem Genom des *Escherichia coli*-Phagen Lambda. Größere DNS- Moleküle richten ihre Längsachse parallel zu den elektrischen Feldlinien aus und wandern somit schlangenartig durch die Poren des Gels da die Porengröße im Agarosegel für eine horizontale Wanderung zu klein ist. Dies hat zur Folge, dass alle DNS- Moleküle die größer als ca. 50 kb sind, in einer Bande wandern. Eine Auftrennung oder Größenbestimmung dieser Moleküle ist somit nicht möglich (WINTER und DRIESEL, 1988). Der entscheidende Schritt zur Überwindung dieses physikalischen Phänomens gelang SCHWARTZ und CANTOR (1984) mit der Entwicklung der neuen Technologie der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Hierbei werden von in einem bestimmten Winkel angeordneten Elektroden alternierende elektrische Felder erzeugt, d. h. die Richtung der Feldlinien verändert sich in einem bestimmten Zeitintervall. Daher müssen die DNS- Moleküle ihre Ausrichtung und Konformation ständig ändern, um sich in Feldrichtung zu orientieren (SCHMITZ et al., 1995). Die Modellvorstellung besagt, dass große Moleküle zur Reorientierung längere Zeit brauchen als kleinere, so dass die Nettowanderungsgeschwindigkeit der kleineren Moleküle größer ist (WINTER und DRIESEL, 1988).

Mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese können somit auch größere DNS- Fragmente mit einer Größenordnung von 50 kb bis 10000 kb aufgetrennt werden. Das gesamte Genom einer Bakterienzelle wird somit darstellbar (METZ et al., 1996). Um alternierende elektrische Felder zu erzeugen sind zahlreiche Apparaturen entwickelt worden, die sich sowohl in der Geometrie der Elektrophoresekammer als auch in der Form, Anzahl, und Stellung der Elektroden unterscheiden und die hier nur namentlich erwähnt sein sollen. WINTER und DRIESEL (1988) haben diese Verfahren ausführlich beschrieben. Heute kommen die Gelelektrophorese in orthogonal- alternierenden Feldern (OFAGE), Feldinversionsgelelektrophorese (FIGE), die Rotaphor Apparatur, PFGE in rotierenden Gelen, und die Elektrophorese im transversal alternierenden elektrischen Feld zur Anwendung.

Häufig wird die so genannte CHEF- PFGE, contour clamped homogeneous electric field PFGE benutzt. 24 Elektroden sind hier in einer Elektrophorese- Kammer hexagonal zueinander angeordnet, die beiden sich gegenüberliegenden Seiten des Sechsecks werden abwechselnd aktiviert. Der Strom wird dabei in einem Winkel von 120° zur Nettolaufrichtung der DNS in kurzen Impulsen aus wechselnder Richtung angelegt. Die Pulszeit und die Stärke des elektrischen Feldes sind dabei die entscheidenden Parameter, die den Molekulargewichtsbereich der auftrennbaren DNS Fragmente festlegen: je länger die Pulszeiten sind, desto größere Moleküle können aufgetrennt werden. Man kann die Pulszeit auch linear ansteigen lassen, so dass während eines Laufes sowohl kleinere als auch größere Fragmente aufgetrennt werden (Metz et al., 1996). Desweiteren haben auch die Konfiguration und Winkel des elektrischen Feldes, Temperatur und Konzentration des Gels sowie des verwendeten Puffers und Konzentration der eingesetzten Agarose Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit (SCHMITZ et al., 1995). Die Größe des Erbgutes verschiedener Bakterienstämme reicht von 50 kb bis 10 mb.

Abhängig vom Bakteriengenom und verwendeten Enzym entstehen 6 bis 40 Fragmente mit einer Größe von 50 bis 2000 kb (METZ et al., 1996). Bei der Interpretation nach Tenover et al., (1995) wird zwischen vier Verwandtschafts-Graden unterschieden. Hierfür müssen jedoch Muster mit mindestens zehn Fragmenten vorliegen. Isolate von Krankheitsausbrüchen zeigen eine vollständige Übereinstimmung in Fragmentanzahl und Fragmentgrößen. Eng verwandte Isolate unterscheiden sich durch eine genetische Veränderung (Punktmutation, Insertion, Deletion) in 2 – 3 Fragmenten. Bei wahrscheinlich verwandten Isolaten zeigen sich aufgrund von zwei genetischen Veränderungen Unterschiede in 4 – 6 Fragmenten. Genetisch verschiedene Isolate differieren schließlich in mehr als sechs Fragmenten aufgrund von mehreren genetischen Vorkommnissen.

ITEMAN et al. (1996) und KAPPERUD et al. (1990) bewerteten drei verschiedene Typisierungsverfahren hinsichtlich ihrer Diskriminierungsfähigkeit innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica*, Plasmid- Profil- Analyse (REAP), Ribotypisierung und Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) kamen dafür zur Anwendung. Sowohl die REAP als auch die Ribotypisierung erwiesen sich als geeignetes Werkzeug, um verschiedene Bioserovaren voneinander abzugrenzen. Sie stellen somit eine

Alternative zur getrennten Bio- und Serovarisierung dar, haben aber den Nachteil, von der phänotypischen Merkmalsausprägung abhängig zu sein. Die Diversität innerhalb einzelner Bioserovaren war nicht ausreichend, um diese beiden Methoden für epidemiologische Studien heranziehen zu können. Nicht mehr als 5 (REAP) bzw. 10 (Ribotypisierung) verschiedene Bandenmuster konnten insgesamt identifiziert werden. Die PFGE erwies sich dagegen als eine hervorragende Methode um epidemiologische Erkenntnisse abzuleiten. Mit ihrer Hilfe konnten insgesamt 43 verschiedene Pulstypen erzeugt werden, vor allem innerhalb des Bioserovars 4/O:3 konnte dabei ein hohes Maß an Diversität festgestellt werden, indem verschiedene Subtypen unterschieden werden.

Auch FREDRIKSSON- AHOMAA et al. (1999) stuften die PFGE im Vergleich zur Ribotypisierung vorteilhafter, um innerhalb des Bioserovars 4/O:3 verschiedene Subtypen zu diskriminieren. Die PFGE fand in zahlreichen Studien zur Feintypisierung von *Y. enterocolitica* Anwendung (BUCHRIESER et al., 1994a; NAJDENSKI et al., 1994; ASPLUND et al., 1998; BEE, 2000; FILETICI et al., 2000; FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 2001a, 2001b, 2003, 2004). Obwohl spontane Mutationen vorkommen, die das Restriktionsmuster verändern können, ist dies bei dieser Spezies ein seltenes Ereignis (NAJDENSKI et al., 1995). BUCHRIESER et al., (1994b) konnten bei 24 Stämmen der gleichen Region während eines Zeitraums von acht Jahren identische PFGE- Muster nachweisen. Ein häufig eingesetztes Restriktions-Enzym ist *Not* I (BUCHRIESER et al., 1994b, NAJDENSKI et al., 1994; ITEMAN et al., 1996). Durch den parallelen Einsatz von zusätzlichen Enzymen kann der diskriminatorische Index weiter erhöht werden (FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 2001b). 35 verschiedene Enzyme wurden im Rahmen einer Pilotstudie auf ihre Brauchbarkeit für die Typisierung von *Y. enterocolitica* geprüft. Die besten Ergebnisse wurden durch eine Kombination der Enzyme *Not* I, *Apa* I und *Xho* I erzielt (FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 1999). Pulstypen desselben Bioserovars weisen sehr ähnliche Bandenmuster auf, was auf eine enge Verwandtschaft dieser Stämme schließen lässt (BUCHRIESER et al., 1994a; FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 1999).

Auch wenn mit Hilfe der PFGE eine Vielzahl verschiedener Pulstypen identifiziert werden können, so gibt es häufig einige wenige dominierende Typen die in einer Vielzahl von Proben anzutreffen sind, die anderen treten dagegen zahlenmäßig

zurück und sind manchmal auch in nur einer einzigen Probe nachweisbar (BUCHRIESER et al., 1994a; FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 2000, 2001a). Auch zur Aufklärung von epidemiologischen Zusammenhängen bei größeren Krankheitsausbrüchen mit *Y. enterocolitica* ist diese Methode erfolgreich angewendet worden (SWAMINATHAN et al., 2001). Die PFGE- Methode ist zeitaufwendig und für große Probenmengen nicht geeignet. Von Nachteil ist auch die begrenzte Diskriminierungsfähigkeit bei PFGE- Mustern mit geringer Fragmentanzahl (DE BOER et al., 2000).

2.5.11 Amplified Fragment Length Polymorphism- PCR (AFLP- PCR)

Die PFGE galt in den vergangenen 15 Jahren als „gold Standard“ zur Feintypisierung von Bakterien. Nachteile der PFGE sind vor allem die aufwendige Handhabung und der vergleichsweise hohe Zeitaufwand. Bis zum endgültigen Fragmentmuster sind zeitaufwendige Arbeiten von meist über einer Woche zu bewältigen. Die 1993 von ZABEAU und VOS eingeführte AFLP- Methode hat sich in den vergangenen Jahren als viel versprechende Genotypisierungsmethode für Mikroorganismen durchgesetzt. Diese neuere Methode wurde ursprünglich zur Genotypisierung von Pflanzen entwickelt (VOS et al., 1995). Daraufhin erfolgte die Angleichung der Methode zur Typisierung verschiedener Bakterien (JANSSEN et al., 1996; KIEM et al., 1997; KOELEMAN et al., 1998). Bei dieser Methode wird die chromosomale DNS der zu untersuchenden Organismen zuerst mit Restriktionsendonukleasen verdaut, und anschließend eines Teiles der entstehenden DNS- Fragmente mit spezifischen Primern amplifiziert (FROST, 2001). Bei dieser Methode werden DNS- Polymorphismen der untersuchten Stämme, die innerhalb oder unmittelbar neben der Restriktionsenzym- Erkennungssequenz auftreten oder aufgrund von Insertionen und Deletionen entstehen, erkannt und verglichen, wobei die gesamte chromosomale DNS berücksichtigt wird. Zudem benötigt man wie bei der RAPD- PCR nur sehr geringe Mengen ursprünglicher DNS und keine Kenntnisse über die zu amplifizierenden DNS-Sequenzen. Zuvor muss aber die eindeutige Identität der zu untersuchenden Spezies klar sein (SAVELKOUL et al., 1999).

Die AFLP beinhaltet vier Schritte. Der erste Schritt bei einer AFLP- PCR ist die Restriktion der DNS mit zwei unterschiedlich häufig schneidenden Enzymen wie z.B. *Hind* III / *Hha* I, *Bgl* II / *Csp*6 I oder *Eco* RI / *Mse* I, wobei die erstgenannten eine 6- bp (six- cutter oder rare- cutter) und die an zweiter Stelle genannten eine 4- bp (four-

cutter oder frequent- cutter) große Erkennungssequenz aufweisen. Dadurch erhält man eine Auswahl von DNS- Fragmenten unterschiedlicher Größe. In dem zweiten Schritt erfolgt die Ligation von doppelsträngigen, spezifischen Oligonukleotid-Adaptoren an die Enden der entstehenden Restriktionsfragmente mit Hilfe der DNA-Ligase. Die Adapter sind so konzipiert, dass die ursprünglichen Erkennungssequenzen nicht mehr hergestellt werden und somit die um den Adapter verlängerten Fragmente nicht erneut gespalten werden können. Somit können die Restriktion und Ligation gleichzeitig in einem Arbeitsschritt durchgeführt werden, und Fragmente, die sich wieder zusammenlagern, werden erneut durch die Restriktionsendonukleasen verdaut. Es folgen die beiden PCR- Schritte mit adapterspezifischen Primern, die an ihren 3'- Enden ein, zwei oder drei zusätzliche Nukleotide tragen. Bei der Erweiterung der Primer um ein selektives Nukleotid wird jedes vierte Fragment, bei zwei Nukleotiden jedes 256. und bei drei jedes 4096. Fragment amplifiziert. Dadurch werden die Anzahl und die Komplexität der entstehenden Amplifikate, auf ein für die spätere Auswertung der Produkte akzeptables Maß, reduziert, und es wird nur ein Teil der Fragmente unter strengen PCR- Bedingungen amplifiziert. Die präselektive Amplifikation erhöht die Spezifität und limitiert die Anzahl der Fragmente für den nachfolgenden selektiven Schritt. In der selektiven PCR, die die Produkte der ersten als Template verwendet, werden Primer benutzt, die an ihrem 3'- Ende eine oder mehrere weitere Extensionen haben, aber ansonsten dieselbe Sequenz wie die präselektiven Primer aufweisen. Dies erhöht die Selektivität und Komplexität weiter, und die Amplifikation von ungewollten Bruchstücken wird verhindert. Anschließend erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Produkte auf Polyacrylamid- Gelen und die Auswertung der erhaltenen Banden. Nach der Elektrophorese erhält man ca. 35 – 100 Banden (abhängig von der gewählten Enzymkombination) im Bereich von 35 – 570 bp.

Zur Detektion der Produkte können radioaktiv markierte Primer, mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Oligonukleotide und die Färbung der Gele mit Ethidiumbromid oder mit Silbernitrat verwendet werden (SAVELKOUL et al., 1999; WASSENAAR und NEWELL, 2000; ACHTMAN, 2001; ANONYMUS, 2002a). Für die Analyse der Produkte kann man diese durch einen automatischen Sequenzierer auswerten oder die gefärbten Gele unter UV- oder Weiß- Licht fotografieren. Die DNS-Bandenmuster der untersuchten Stämme werden dann mittels spezieller Software miteinander verglichen, und deren verwandtschaftlichen Verhältnisse fasst man in

Dendrogrammen zusammen. Die Stämme werden aufgrund der ermittelten verschiedenen DNS- Muster in Cluster eingeteilt. AFLP ist eine sehr stabile Methode und wird nicht durch äußere Einflüsse wie Nutzung verschiedener Thermocycler oder unterschiedliche Ausgangs- DNA- Konzentration beeinträchtigt (SAVELKOUL et al., 1999; BERRES, 2002; ANONYMUS, 2004a).

Es gibt viele verschiedene Anwendungsmöglichkeiten für die AFLP- Typisierung. Für diverse Erreger wie *Campylobacter* spp. (ALTER et al., 2003; DUIM et al., 1999, 2004), Salmonellen (LINDSTEDT et al., 2000; NAIR et al., 2000) sowie Enterokokken (ANTONISHYN et al., 2000) wurde die AFLP bereits erfolgreich durchgeführt. Vor allem in der Mikrobiologie wird diese sehr effektive und stark diskriminierende Methode zur Klärung von taxonomischen und epidemiologischen Fragestellungen, zur Subtypisierung und Identifizierung von Bakterienstämmen angewandt (SAVELKOUL et al., 1999). Auch für die Darstellung taxonomischer und epidemiologischer Beziehungen und zur Typisierung von *Y. enterocolitica*- Stämmen humane und tierische Herkunft wurde die AFLP- PCR eingesetzt (FEARNLEY et al., 2005; KUEHNI, 2005). Hierbei konnte insbesondere die enge Verwandtschaft von *Y. enterocolitica*- Isolat aus Tier- und Humanstämmen mit Hilfe von AFLP- PCR gut nachgewiesen werden.

2.5.12 Vergleich der Methoden

Zur Identifizierung können Methoden, die einen oder wenige Genloci nachweisen wie PCR und Ribotyping, ausreichend sein. Zur Klärung epidemiologischer Fragestellungen sind sie jedoch nicht geeignet, da Muster und Änderungen im restlichen Genom nicht erfasst werden. Hierfür bieten sich die RFLP, die RAPD, die PFGE, die AFLP- Analyse und die MLST an, die das gesamte Genom oder mehrere Genloci darstellen. Aufgrund des Mangels an Reproduzierbarkeit scheiden die REAP, REAC, RFLP und RAPD für die Aufklärung epidemiologischer Fragestellungen aus und lassen allein die PFGE-, die MLST- und die AFLP- Methode für diese Fragestellung übrig. DUIM et al. (2003) zeigte am Beispiel von *Campylobacter*- Isolat, dass MLST, PFGE, AFLP- Analyse und Ribotyping für die epidemiologische Typisierung gleichwertig sind.

Die PFGE hat ein gutes Differenzierungspotential, ist aber zeitaufwendig und für große Probenmengen ungeeignet (DE BOER et al., 2000). Zudem erfüllen die

Fragmentmuster, insbesondere wenn sie nur mit einem Enzym geschnitten werden, nicht immer die sog. Tenover- Kriterien. Die AFLP- Analyse ist hoch diskriminierend, weniger zeitaufwendig als die PFGE und für die Bearbeitung von großen Probenmengen (DE BOER et al., 2000) geeignet. Auch wenn identische AFLP- Muster durch die PFGE weiter differenziert werden können, ist die AFLP- Analyse doch häufiger in der Lage, identische PFGE- Muster zu differenzieren (HEIN et al., 2003; HÄNNINEN et al., 2001; DE BOER et al., 2000; LINDSTEDT et al., 2000). Der Vergleich von AFLP- Mustern mit der Ergebnissen aus anderen Laboren gestaltet sich jedoch schwierig (SCHOULS et al., 2003). Die MLST hat den Vorteil der Kompatibilität, der Reproduzierbarkeit und der vereinheitlichten Nomenklatur, was einen Vergleich zwischen verschiedenen Studien ermöglicht (DUIM et al., 2003, SCHOULS et al., 2003). In epidemiologischen Studien ist häufig auch die Kombination von zwei Genotypisierungsmethoden oder die Verbindung von Phäno- und Genotypisierung sinnvoll (ISHIHARA et al., 2006; HÄNNINEN et al., 2001; DE BOER et al., 2000; WASSENAAR, 2000).

3 Eigene Untersuchungen

Insgesamt wurden 30 Masthähnchen in einem Zeitraum von 28 Tage nach einer oralen Infektion mit der *Y. enterocolitica* DSM 13030 Bioserovar 4/O:3 auf das Vorhandensein des Erregers in deren Kot untersucht. Parallel dazu wurden 30 Tiere separat als Kontrolle gehalten. Hierzu wurden in 15 Durchgängen (A – O) die Tiere beprobt und ihnen jeweils zwei Tupferproben entnommen. Die Versuchsdurchgänge sind anhand der Tage nach der oralen Infektion benannt, an denen die Tiere beprobt wurden. Die Isolierung der *Y. enterocolitica*-Stämmen wurde in Anlehnung an die Norm ISO 10273 (Internationales Standardverfahren zur Isolation präsumptiv pathogener *Y. enterocolitica*) durchgeführt. Die PCR erfolgte in Anlehnung an NEUBAUER et al. (2000a), LANTZ et al. (1998) und ARNOLD et al. (2001). Die PFGE wurde modifiziert nach FREDRIKSSON- AHOMAA et al. (1999) und das AFLP- Verfahren modifiziert nach DUIM et al. (1999) durchgeführt. Eine Computergestützte Auswertung der PFGE- und AFLP- Ergebnisse erfolgte mit der Software Bionumerics Version 4.6 (Applied Maths, Belgien).

3.1 Material

3.1.1 Materialien für mikrobiologische Arbeiten

3.1.1.1 Schafblut- Nährmedium, Standard

Merck, Art.- Nr. 1.07881.0500	37 g/l
Pepton	10,0 g/l
Hefeextrakt	3,0 g/l
Natriumchlorid	6,0 g/l
Glucose	1,0 g/l
Agar	12,0 g/l
<u>Zusatz: definiertes Schafblut</u>	<u>5%</u>

37 g der Reagenzien wurden in einem Liter Aqua bidest. unter Rühren suspendiert. Der Ansatz zur Lösung des Agars wurde im Dampfkochapparat aufgekocht und danach kräftig aufgerührt. Die Basis wurde für 15 Minuten bei +121 °C im Autoklav sterilisiert. Nach Abkühlen der Basis auf +45 – 50 °C

wurde die aseptisch abgemessene Menge Schafblut dem Nährmedium unter leichtem Rühren zugesetzt. Anschließend wurden ca. 15 ml des Nährmediums in Petrischalen gegossen und diese zur Erstarrung und Akklimatisation einige Stunden stehen gelassen.

3.1.1.2 BHI- Bouillon (Brain Heart Infusion Bouillon)

<u>Oxoid, Art.- Nr.: CM225</u>	<u>37 g/l</u>
Kalbshirninfusion	12,5 g/l
Rinderherzinfusion	5,0 g/l
Proteose-Pepton	10,0 g/l
Glucose	2,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
di-Natriumhydrogenphosphat	2,5 g/l
<u>pH: 7,4 / +25°C</u>	<u>Toleranz: ±0,2</u>

Die Reagenzien wurden in einem Liter Aqua bidest. unter Rühren gelöst. Der pH- Wert wurde gemessen und gegebenenfalls korrigiert. Die Bouillon wurde 10 Minuten bei +121 °C im Autoklav sterilisiert. Die Abkühlung erfolgte einige Stunden bei Raumtemperatur belassen.

3.1.2 Materialien für die Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.1.2.1 Stamm- und Gebrauchslösungen für PCR

Ladepuffer

10 ml 15 %iges Ficoll 400 wurde durch leichtes Erhitzen in Aqua bidest. gelöst. Nach Zugabe von 0,25 ml 5 %iger Bromphenolblau- Lösung (gelöst in TAE- Puffer) wurde das Ganze gut gemischt, mit Aqua bidest. 1:4 verdünnt, in 1,5 ml Eppendorf- Reaktionsgefäße aliquotiert und bei 4 °C aufbewahrt.

50x Tris- Acetat- EDTA (TAE)- Puffer

242,5 g Tris, 57,1 ml Eisessig und 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) wurden mit Aqua bidest. auf 1 Liter aufgefüllt und gut gemischt. Für den Gebrauch wurde diese Lösung mit Aqua bidest. 1:50 verdünnt.

Ethidiumbromid- Färbe- Lösung

0,5 ml Ethidiumbromid- Lösung wurden mit 1 Liter Aqua bidest. gemischt und unter Lichtausschluss in einem Abzug aufbewahrt. Bei der Herstellung und dem Umgang mit dieser Lösung wurden immer Handschuhe getragen, da Ethidiumbromid als kanzerogen und mutagen gilt.

3.1.2.2 Reagenzien und Chemikalien für PCR

Für die Polymerase Chain Reaction (PCR) wurden folgende Reagenzien und Chemikalien verwendet (Tabelle 2):

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien/Chemikalien für die PCR

Substanzen	Firma	Artikel-Nummer
Agarose Molecular Grade	Bioline	BIO41025
Bromphenolblau	VWR	1.08122.0005
Chelex® 100 Resin (Sodium)	BioRad	1422832
dNTP- Mix (10 mM)	Bioline	BIO39054
Ethidiumbromid	Merck	1.11608.0030
Ficoll 400	Sigma- Aldrich	F4375
MgCl ₂ (50 mM)	Bioline	BIO21040
Natriumchlorid	Roth	9265
Primer	BioTez	Online
Taq- Polymerase	Bioline	BIO21040
Tris (hydroxymethyl-aminomethan)	VWR	1.08418.1000
10 x Reaktionspuffer	Bioline	BIO21040
Größenmarker Hyperladder IV	Bioline	BIO33030

3.1.3 Material für die Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

3.1.3.1 Gebrauchslösungen für die PFGE

Die verwendeten Gebrauchslösungen für die Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Die Gebrauchslösungen und deren Zusammensetzung für die Durchführung der Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

Verbrauchsmaterial	Zusammensetzung	Anwendung
TE (Tris- EDTA)-Puffer	10 mM Tris- HCl, 1 mM EDTA, Aqua bidest., pH 7,6	Puffer zum Herstellen von Agarose- Blöckchen, Waschen der lysierten Blöckchen
InCert- Agarose (1%ig)	InCert- Agarose, 1x TE-Puffer,	Herstellung der Agarose- Blöckchen
Lysis Lösung	1 mg Lysozym, 200µl Lysis- Puffer,	Verdau der Zellwand
Lysis- Puffer	1 M NaCl, 6 mM Tris, 100 mM EDTA, 0,5% Brij, 0,5% Laurylsarcosin, 0,2% Desoxycholat, 0,1% Proteinase K, pH 7,6	Lysis- Puffer zum Freilegen der Zell- DNS
Stopplösung	0,174 g PMSF 10ml Isopropanol	Lösung zum Abstoppen der Enzymreaktion
Restriktionspuffer	1 x NEpuffer 3 (für <i>Not</i> I, <i>Eco</i> RI und <i>Xba</i> I), 100 x BSA, Aqua bidest.	Restriktionspuffer für den Verdau in Kombination mit den Restriktionsenzymen <i>Not</i> I, <i>Xba</i> I, <i>Eco</i> RI,
Agarose Gel (1,1%ig)	Ultra pure DNS grade Agarose, 0,5 x TBE- Puffer	Herstellung des Gels
TBE- Puffer	0,5 x TBE- Puffer	Lauf- Puffer
Ethidiumbromid- Lösung	Stammlösung (1%ig), Aqua bidest.	Färbelösung zum Färben des Gels

3.1.3.2 Chemikalien und Reagenzien für die Pulsfeld gelelektrophorese

Die Tabellen 4, 5, und 6 geben einen Überblick über die für die PFGE verwendeten Chemikalien, Reagenzien, DNS-Marker und Restriktionsenzymen.

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Enzyme für die PFGE

Substanzen	Firma	Artikel-Nummer
Brij 35 (Polyoxyethylenlaurylether)	Merck	801962
Borsäure	Merck	1.12015.0500
Bovium Serum Albumin (BSA)	New England BioLabs	B9001S
Desoxycholat	Merck	106504
EDTA, Titriplex III	Merck	1.08417.0250
Ethidiumbromid	Merck	1.11608.0030
InCert- Agarose	Biozym	850123
Isopropanol	Merck	108544
Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich	L 5777
Lysozym	Boehringer, Mannheim	107255
NaCl	Merck	101540
Natronlauge	Merck	105587
PMSF	Boehringer, Mannheim	236608
Proteinase K	Boehringer, Mannheim	1373196
Tris (hydroxymethyl-aminomethan)	Merck	101549
Salzsäure	Merck	100317
Ultra pure grade DNS Agarose	Biorad	162-0133

Tabelle 5: Verwendete Restriktionsenzymen für die PFGE

Sunstanzen	Firma	Artikel-Nummer
<i>Not</i> I	New England BioLabs	R0189M
<i>Xba</i> I	New England BioLabs	R0145M
<i>Eco</i> RI	New England BioLabs	R0101S

Tabelle 6: Verwendete DNS-Marker für die PFGE

Substanz	Firma	Artikel-Nummer
Pulsed- Field- Marker	Sigma- Aldrich	2291

3.1.3.3 Restriktionsenzyme

Zum Schneiden der DNS wurden die Restriktionsenzyme *Not* I (gewonnen aus einem *E. coli*- Stamm, der das geklonte *Not* I- Gen von *Nocardia otitidis caviarum* trägt), *Xba* I (gewonnen aus einem *E. coli*- Stamm, der das geklonte *Xba* I- Gen von *Xanthamonas badrii* trägt) und *Eco* RI (gewonnen aus einem *E. coli*- Stamm, der das geklonte *Eco* RI- Gen von *E. coli* RY13 trägt) verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 7: Verwendete Restriktionsenzyme für die PFGE

<i>Not</i> I:	5'.... <u>C▼GGCCG</u>3' 3'....GCCGG▲C....5'	<i>Xba</i> I:	5'.... <u>T▼CTAGA</u>3' 3'....AGATC▲T....5'
<i>Eco</i> RI:	5'.... <u>G▼AATTC</u>3' 3'....CTTAA▲G....5'		

3.1.4 Material für die Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

3.1.4.1 AFLP Stamm- und Gebrauchslösungen

Für die Amplified fragment length polymorphism (AFLP) wurden folgende Stammlösungen und Gebrauchslösungen (Tabelle 8) verwendet:

Stammlösungen

1 M Tris-HCl

-Tris- HCl, Aqua bidest., pH auf 8,0 einstellen

0,5 M EDTA

-EDTA, Aqua bidest., pH auf 8,0 einstellen

Tabelle 8: Gebrauchslösungen und deren Zusammensetzung für die Durchführung der AFLP

Verbrauchsmaterial	Zusammensetzung	Anwendung in der AFLP
TE (Tris- EDTA)- Puffer	10 mM Tris- HCl, 1 mM EDTA, Aqua bidest., pH 8,0	Puffer zur Aufnahme von <i>Yersinia</i> spp.- Kolonien aus der Agar- Platte
Ladepuffer für DNS	98% Formamide, 10 mM EDTA, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylene Cyanol, pH 8,0	Lade-Puffer für den Verlauf der Elektrophorese
Restriktionspuffer	1 x NEpuffer 3 (für <i>Eco RI</i>), 1 x NEpuffer 2 (für <i>Mse I</i> , <i>Hha I</i> und <i>Hind III</i>) 100 x BSA, Aqua bidest.	Restriktionspuffer für den Verdau in Kombination mit den Restriktionsenzymen <i>Eco RI</i> , <i>Mse I</i> , <i>Hind III</i> und <i>Hha I</i>

3.1.4.2 Chemikalien und Reagenzien für die AFLP

Die Tabellen 9, 10, und 11 geben einen Überblick über die für die AFLP verwendeten Chemikalien, Reagenzien, DNS-Marker und Restriktionsenzymen.

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Enzyme für die AFLP

Substanzen	Firma	Artikel-Nummer
DNS Silver Staining Kit	Amersham Biosciences	17600030
Dneasy Tissue Kit	Quiagen	69506
dNTP- Mix (10 mM)	Bioline	BIO39054
Di- Thio- Threitol (DTT)	Amersham Biosciences	US15397
Excelgel DNS Analysis Kit	Amersham Biosciences	17119807
EDTA, Titriplex III	Merck	1.08417.0250
MgCl ₂ (25 mM)	Q- Biogene	EPMGCL25
Natriumchlorid	Roth	9265
Natronlauge	Merck	105587
One- Phor- All Buffer Plus	Amersham Biosciences	27090102
Primer	Bio Tez	Online
Rnase A	Roche	10109169
Salzsäure	Merck	100317
Taq- Polymerase	Bioline	BIO21040
Tris(hydroxymethyl-aminomethan)	VWR	1.08418.1000
T4 DNS Ligase	New England BioLabs	M0202L
10 x Reaktionspuffer	Bioline	BIO21040
1.1 x ReddyMix PCR Master Mix	ABgene	AB0575LD/B

Tabelle 10: Verwendete Restriktionsenzymen für die AFLP

Sunstanzen	Firma	Artikel-Nummer
<i>Hha</i> I	New England BioLabs	R0145S
<i>Hind</i> III	New England BioLabs	R0104L
<i>Eco</i> RI	New England BioLabs	R0101S
<i>Mse</i> I	New England BioLabs	R0525S

Tabelle 11: Verwendete DNS-Marker für die AFLP

Substanz	Firma	Artikel-Nummer
peqGOLD DNS- Sizer XII	peqLab	252160

3.1.4.3 Restriktionsenzyme

Zum Schneiden der DNS wurden die Restriktionsenzyme *Hha* I, *Hind* III, *Eco* RI und *Mse* I verwendet. Tabelle 12 zeigt die Schnittstellen der ausgewählten Restriktionsenzyme.

Tabelle 12: Verwendete Restriktionsenzymen mit deren Schnittstellen

Six-Cutter	Four-Cutter
Schnittstelle <i>Hind</i> III: 5'... <u>A</u> ▼AGCTT...3' 3'...TTCGA▲A...5'	Schnittstelle <i>Hha</i> I: 5'...GCG▼C...3' 3'...C▲GCG...5'
Schnittstelle <i>Eco</i> RI: 5'...G▼AATTC...3' 3'...CTTAA▲G...5'	Schnittstelle <i>Mse</i> I: 5'...T▼TAA...3' 3'...AAT▲T...5'

3.1.5 Arbeitsgeräte

3.1.5.1 Arbeitsgeräte für die mikrobiologische Untersuchungen

Die Proben wurden in einem Labor mit der üblichen Ausstattung eines mikrobiologischen Labors (Sterilisator, Brutschränke, Glaswaren, Messpipetten, kleine Petrischalen [nach DIN 12339], Impfösen) aufgearbeitet. Darüber hinaus war eine Kühlzentrifuge sowie ein einstellbarer Thermomixer für die Durchführung notwendig. Als Aufbewahrungsgefäße für die DNS eigneten sich hierbei 1,5ml- Eppendorf- Tubes. Des Weiteren kamen Reagenzglasmixer (neoLab[®], Vortex) sowie ein temperiertes Wasserbad (GFL[®]) für die mikrobiologischen Untersuchungen zum Einsatz.

3.1.5.2 Arbeitsgeräte für die PCR

Für die PCR- Untersuchungen wurden eine UV- Werkbank (Heraeus, Typ HS12), ein Thermocycler (Perkin Elmer, GeneAmp 9600), ein Mastercycler gradient (Eppendorf), ein Gelelektrophorese- System Mini- Sub- Cell GT (Bio- Rad, Art.- Nr.: 1704467), ein Thermo- Schüttler (Eppendorf, Thermomixer comfort 5355), eine Elektrophorese- Kammer (Bio Rad, Mini- Sub[®] Cell GT), eine Kamera mit UV- bzw. Weiß- Licht und ein Dokumentationsgerät (Vilbert Laurmat, Bio- Print Dokumentations- System), eine computergestützte Aufnahmesoftware (Ift- Labortechnik, Bio- Capt/Photo- Capt) zur Dokumentation sowie Tiefkühlschränke (Bosch, economic- froster- super) zur Lagerung der Proben bei -20 °C verwendet.

3.1.5.3 Arbeitsgeräte für die PFGE

Für das Einstellen der Zelldichte wurde ein Densimat (bioMérieux, ID N006411) benutzt. Die Blöckchen wurden in Gießformen (BioRad, Plug Mold 170-3706) hergestellt und in Zentrifugenröhrchen (Nunc, 373660) aufbewahrt. In weiteren Arbeitsschritten zur Vorbereitung der PFGE wurden unter anderem ein Schüttel- Wasserbad (GFL, 1083), ein Thermostat (Eppendorf, 5320) und ein Magnetrührer mit Heizplatte (Heidolph, MR 3001) eingesetzt. Mit einer CHEF DR-III Elektrophoreseeinheit (BioRad Laboratories) wurde anschließend die Pulsfeld-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit einer CCD

(Charge coupled Device)- Kamera (Ift Labortechnik, Bio- Profil- System) fotografiert, computergestützt mit einer Aufnahmesoftware (Ift-Labortechnik, Bio- Capt/Photo- Capt) dokumentiert und mit der Software BionumericsTM, Version 4.6 (Applied Maths, Belgien) ausgewertet.

3.1.5.4 Arbeitsgeräte für die AFLP

Für die AFLP- Analyse wurden eine UV- Werkbank (Heraeus, Typ HS12), ein Thermocycler (Perkin Elmer, GeneAmp 9600), ein Thermo- Schüttler (Eppendorf, Thermomixer comfort 5355), eine CCD (Charge coupled Device)- Kamera (Ift Labortechnik, Bio- Profil- System), ein Dokumentationsgerät mit Weiß-Licht (Vilbert Laurmat, Bio- Print Dokumentations- System), eine computergestützte Aufnahme- Software (Ift- Labortechnik, Bio- Capt/Photo- Capt) zur Dokumentation, eine Elektrophorese- Kammer (Pharmacia Biotech, Elektrophoresis Power Supply EPS 3500), eine Färbevorrichtung (Pharmacia Biotech, Hoefer Automated Gel Stainer, Multi Temp III, Multi Phor II), die Gel-Fix[®]- Folie (Serva) und eine Analyse-Software zur Auswertung von Daten (BionumericsTM, Version 4.6) eingesetzt.

3.2 Methoden

3.2.1 PCR- Untersuchungen

747 verdächtige Bakterienstämme, die mittels biochemischen Untersuchungen als *Y. enterocolitica*- Feldstämme identifiziert worden waren, wurden mittels PCR- Verfahren einer weiteren Untersuchung unterworfen. Mittels einer Multiplex- PCR sollten Fragestellungen bezüglich des Genus (Yersinien), der Spezies (*Y. enterocolitica*) und die Pathogenität (*yopT*- Gene) der Feldstämme geklärt werden. Die PCR- Ergebnisse sollten helfen, die biochemischen Befunde der Speziesdifferenzierung molekularbiologisch zu bestätigen bzw. zu korrigieren.

3.2.1.1 DNS- Isolation

Die Stämme wurden zunächst aus der -80°C Stammsammlung auf Schafsblutagar ausgerollt. Die Nährmedien wurden 18 – 24h bei +28°C aerob bebrütet. Anschließend wurde eine Einzelkolonie in BHI-Bouillon überführt und 18 – 24h bei +28°C im Brutschrank inkubiert. Von der beimpften und für 24h bebrüteten BHI- Bouillon wurde je 1 ml in sterile Tubes überführt und etwa 10 min im Eis gekühlt, dann bei 7000 g für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Auf das Pellet wurden 500 µl NaCl- Lösung (0,85 %ig) gegeben, das Ganze mittels eines Vortex- Mixers geschüttelt und bei 7000 g für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf das Pellet wurden 400 µl Chelex®100- Resin- Lösung (5 %ig) und 20µl Proteinase K gegeben und ebenfalls mit dem Vortex- Schüttler behandelt. Die Proben wurden dann für 60 min bei +56°C im Thermoschüttler inkubiert und danach für weitere 15 min bei +95°C. Nach der Inkubation wurden die Proben 10 min bei 7000 g zentrifugiert. Bei direkter Weiterverarbeitung wurden die Proben für 5 min auf Eis abgekühlt, ansonsten bei -20°C eingefroren.

3.2.1.2 Vorbereitung und Durchführung der Multiplex- PCR (MPCR)

Zum Ansetzen der Multiplex- PCR wurden alle Reagenzien während des Pipettierens des Reaktionsansatzes im Eisbad aufbewahrt. Die Zugabe des Enzyms erfolgte zum Schluss. Um mögliche Schwankungen in der

Pipettiergenauigkeit zu umgehen, wurde ein Mastermix berechnet und vorbereitet, der alle Komponenten außer der DNS für die zu untersuchenden Proben, den Kontrollen (Positiv- Kontrolle: Referenzstämme, Negativ- Kontrolle) sowie einer Zusatzmenge (Menge für 4 Ansätzen) beinhaltet.

Vor der Untersuchung der Feldstämme mittels Multiplex- PCR wurde das Verfahren optimiert. Hierzu wurde eine Gradienten- PCR durchgeführt, um eine geeignete Annealing- Temperatur für die weitere Untersuchung festzustellen. Dabei wurde in einem Temperaturbereich von +50°C bis +70°C die Gradienten- PCR durchgeführt. Für die MPCR wurden 3 Primerpaare im einen Ansatz verwendet. Die Menge der einzelnen Primer variierte in einem MPCR- Ansatz, da nur so alle Fragmente detektiert werden konnten. Tab. 12 zeigt die für die PCR verwendeten Primer.

Tabelle 13: Verwendete Primer für die Multiplex- PCR

Primer	Sequenz 5' zu 3'	Zielgen	PCR	Reference
Y	5'-GGA ATT TAG CAG AGA TGC TTT A-3' 5'-GGA CTA CGA CAG ACT TTA TCT-3'	16SrRNA	300bp	Lantz et al., 1998
YE	5'-AT ACC GCA TAA CGT CTT CG-3' 5'- TT CTT CTG CGA GTA ACG TC-3'	16SrRNA	330bp	Neubauer et al., 2000b
yopT	5'-TAT GTG CAC ATT GGA TTT -3' 5'- AAT GAT ACA TAG AAT TTT -3'	<i>yopT</i>	485bp	Arnold et al., 2001

3.2.1.2.1 Multiplex- PCR

Mastermix für eine Probe

A. bidest.	14,0 µl
10x Reaktionspuffer (ohne MgCl ₂)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
dNTP- Mix (10 mM)	2,0 µl
Primer- Mix*	2,5 µl
Taq- Polymerase (5 U/µl)	0,01 µl

* Y1: 0,125 µl, Y2: 0,125 µl, YE1: 0,125 µl, YE2: 0,125 µl, yopT1: 1,0 µl, yopT2: 1,0 µl

Nach der Fertigstellung des Mastermixes wurde dieser durch mehrmaliges Schwenken und Invertieren kurz gemischt und der Inhalt in die sterilen 0,2 ml

Reaktionsgefäße mit jeweils 22,5 µl aliquotiert. Außerhalb der Werkbank erfolgte unverzüglich die Zugabe von 2,5 µl der DNS sowohl der Proben als auch der Referenzstämme (*Y. enterocolitica* DSM 13030 und *Y. pseudotuberculosis* ATCC 29833) zum Aliquot. Die Reaktionsgefäße wurden dann gut verschlossen und in den Thermocycler gestellt. Anschließend wurde folgendes PCR- Programm gestartet.

PCR- Programm für Multiplex- PCR

Denaturierung	4 min +94 °C	
Denaturierung	45 sec +94 °C	} 30 Zyklen: Schritt 2 – 4
Annealing	45 sec +55,5 °C	
Elongation	45 sec +72 °C	
Annealing:	4 min +72 °C	
herunterkühlen auf +4 °C		

3.2.1.2.2 Herstellung des Agarosegel

Zur Herstellung eines 3%igen Agarosegels wurden 6 g Agarose in eine 500 ml Glasflasche abgewogen und auf 200 ml mit TAE- Puffer aufgefüllt. Das Ganze wurde dann in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis keine Schlieren mehr zu erkennen waren und anschließend für ca. 20 min im +56 °C heißen Wasserbad abgekühlt. Ca. 60 ml von dem noch flüssigen Gel wurden in eine Gel-Kammer gegossen und zwei Gel- Kämme mit je 15 Zähnen ins Gel gehängt. Das restliche Flüssiggel wurde im Wasserbad belassen, um später weitere Gele zu gießen. Nach Erstarren des Gels wurden die Kämme entfernt und das Gel zur Gelelektrophorese benutzt. Nicht verwendete Gele wurden in kleine Plastiktaschen verpackt, mit TAE- Puffer befüllt und bei +4 °C gelagert. Die so gelagerten Gele wurden bis zum Gebrauch maximal eine Woche gelagert.

3.2.1.2.3 Gelelektrophorese

Die anschließende Gelelektrophorese fand in mit TAE- Puffer gefüllten Gelelektrophorese- Kammern statt. Die PCR- Amplifikate wurden mit je 10 µl

Ladepuffer gemischt. Von dieser Mischung wurden 10 µl in die Geltaschen gefüllt. Pro Laufbahn wurden ebenfalls Marker, Positiv- und Negativ- Kontrollen mitgeführt. Nach Anschließen der Gelkammer an ein Spannungsgerät wurde die Gelelektrophorese (200 mA, 100 V, 42 min) gestartet. Nach Beenden der Elektrophorese wurde das Gel 15 min in Ethidium- Bromid- Färbelösung geschwenkt und für weitere 20 min in Aqua bidest. gewässert.

3.2.1.3 Dokumentation und Auswertung der PCR- Ergebnisse

Die Dokumentation des Gels erfolgte über ein speziell hierfür entwickeltes System. Dieses bestand aus einer verschließbaren UV- Kammer, einem IT- System mit spezifischem Programm (bio- CaptMW von LTF Labortechnik, Wasserburg) sowie einem Gelfotodrucker. In der UV- Kammer wurde das Gel zunächst unter Beobachtung am Monitor in die richtige Position geschoben. Anschließend wurde die UV- Kammer verschlossen und das UV- Licht eingeschaltet. Durch Einstellung bestimmter Parameter am Bildschirm (z. B. Fokussierung) konnte die Ausdrucksstärke des Bildes verbessert werden. Das so erhaltene Gelbild wurde elektronisch gespeichert, ausgedruckt und ausgewertet. Das Gel und die dabei benutzten Handschuhe wurden in einer kleinen Autoklaventüte entsorgt. Die Auswertung der PCR- Produkte erfolgte durch den Vergleich der Fragmente mit den Banden des Größenmarkers und mit denen der mitgeführten positiv- Kontrollen. In einem 1. Schritt wurden deshalb alle Kontrollen überprüft. War eine positiv- Kontrolle nicht zu sehen oder die negativ- Kontrolle verunreinigt, wurde die PCR wiederholt. Bei der Auswertung galt eine Probe als positiv, wenn ein spezifisches Amplifikat nachgewiesen werden konnte, und die negativ- Kontrolle negativ war. Die Probe galt als negativ, wenn trotz positiver positiv- Kontrolle ein spezifisches Amplifikat nicht nachgewiesen werden konnte.

3.2.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Insgesamt wurden 151 ausgewählte *Yersinia* spp.- Stämme mittels PFGE genotypisch feindifferenziert. Dabei handelte es sich um 130 positive *Yersinia enterocolitica*- Isolate und 21 Isolate der *Yersinia* spp. ohne *yopT*- Gene. Für

die Pulsfeldgelelektrophorese wurde eine modifizierte Methode nach FREDRIKSSON- AHOMAA et al. (1999) angewendet.

3.2.2.1 Vorbereitung und Durchführung der Pulsfeld-Gelelektrophorese

3.2.2.1.1 Aktivierung der Isolate

Die Stämme wurden von -20 °C auf Schafblutagar ausgerollt und 24 h bei +30 °C bebrütet und dann für ein ausreichendes Wachstum (ca. Ø 2-3 mm) bei +4 °C zwei bis drei Tage gelagert. 3 – 5 Kolonien pro Stamm wurden in 5 ml BHI-Bouillon eingerieben und 18 – 20 h bei +30 °C ohne Schütteln inkubiert.

3.2.2.1.2 Isolierung und Reinigung der Bakterienzelle

Die Bakteriensuspension wurde 30 min auf +4 °C abgekühlt, die Zentrifuge gleichzeitig auf +4 °C vorgekühlt. Danach erfolgte die Zentrifugation in 50 ml Nunc- Zentrifugenröhrchen für 15min bei 2500g und +4 °C. Der Überstand wurde dekantiert, und das Sediment in 5ml gekühltem TE- Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (15min, 2500g, +4 °C) und Dekantieren des Überstandes wurde das Sediment in 250 µl gekühlten TE- Puffer resuspendiert. 2,5 ml TE- Puffer wurden in ein Fiolax- Röhrchen eingefüllt, 50 µl Bakterien-suspension zugegeben, gut gemischt und im Densimat gemessen. Die Dichte sollte im Bereich von 5,0 bis 6,0 McFarland ($\cong 1 \times 10^9$ Zellen / ml) liegen. 800 µl der eingestellten Suspension wurde in Eppendorf- Reaktionsgefäß aliquotiert.

3.2.2.1.3 Herstellung der Agarose-Blöckchen

Es wurden pro Isolat 3 Blöckchen gegossen. Die InCert- Agarose wurde mit 1x TE- Puffer (pH 7,6) angesetzt, aufgekocht und anschließend bei +56 °C im Wasserbad flüssig gehalten. Dabei wurde die Agarose- Blöckchen mit verschiedenen Konzentrationen (1,0 % und 1,2 %ig) hergestellt um den Vorgang zu optimieren. Die InCert- Agarose besaß einen besonders niedrigen Schmelzpunkt (low melting point Agarose) und ermöglichte dadurch das Einbetten thermolabiler Elemente, wie z.B. lebender Zellen. Es wurde darauf geachtet, dass sich nach dem Kochen keine Schlieren gebildet hatten und die Flüssigkeit klar blieb. Die eingestellte Bakteriensuspension wurde im

Thermomixer auf +56°C angewärmt. 150 µl Bakteriensuspension wurden mit 150 µl flüssiger InCert- Agarose in ein Eppendorfgefäß versetzt, gut gemischt und à 90 µl in den Gießblock gefüllt. Der Gießblock wurde 15 – 30 min bei +4°C abkühlt und verfestigt. Das Einbetten ganzer Zellen in die Agarose in Form von Blöckchen verhinderte ein Scheren oder Brechen der DNS. Die Agarose schützte und bewahrte einerseits die langen DNS- Moleküle und andererseits war sie für Puffer und Enzyme permeabel. Alle weiteren Lyse- und Verdauungsschritte wurden mit diesen Blöckchen durchgeführt.

3.2.2.1.4 Freilegen der DNS mit Hilfe des Lysis-Lösung

Für die Herstellung vom Lysispuffer wurde zunächst 0,5%iges N- Laurylsarcosin in 100 mM EDTA- Puffer gelöst und anschließend 0,2% Desoxycholat, 0,5% Brij, 1 M NaCl und 6 mM Tris zugegeben und auf 500 ml mit Aquabidest. aufgefüllt. Pro Agaroseblöckchen wurden 1 mg Lysozym und 200 µl Lysispuffer benötigt. Je Stamm wurden 3 Blöckchen hergestellt (3 mg Lysozym in 600 µl Lysispuffer). Das Lysozym wurde in 1 ml Lysispuffer vorgemischt, dann wurde der restliche Lysispuffer zugegeben. Die so hergestellte Lysislösung wurde à 600 µl in sterile PP -Röhrchen gegeben und die entnommenen Agaroseblöckchen in die Lysislösung überführt. Dazu wurde die Folie vom Gießblock entfernt, die Nut abgebrochen, mit 9%igen Ethanol gesäubert und das Blöckchen durchgestoßen. Die Lysis erfolgte über Nacht bei +37°C im Wasserbad. Nach der Inkubation wurden 15 µl Proteinase K- Lösung direkt auf 600 µl Lysisansatz mit Blöckchen gegeben (5 µl pro Blöckchen). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei +56°C im Wasserbad. Nach erfolgreicher Inkubation sollten die Blöckchen durchsichtig sein. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Temperatur von +56°C nicht überschritten wurde, da ansonsten die Proteinase K- Aktivität eingeschränkt worden wäre. Der Lysispuffer diente zum Verdau der Zellmembran und die Proteinase K zur proteolytischen Spaltung von Proteinen des Chromatins, um eine reine DNS zu erhalten. Der Lysisansatz wurde mit steriler Pasteurpipette abgezogen, die Blöckchen mit 600 µl TE- Puffer (200 µl / Blöckchen) versetzt und 30min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Abziehen des TE- Puffers erfolgte die erneute Zugabe von 600 µl TE- Puffer und 6 µl PMSF (2µl / Blöckchen) unter dem Abzug. Die Inkubation erfolgte 1 h

bei +56°C im Wasserbad. Das PMSF wurde in 2 M NaOH verworfen. Danach wurde erneut mit 600 µl TE- Puffer gewaschen und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um Lysispuffer und Proteinase K zu inaktivieren und diese zusammen mit anderen Verdau-Resten bzw. Spaltprodukten zu entfernen. Die so behandelten Blöckchen konnten nun entweder in 1 ml TE- Puffer bei +4°C gelagert werden, wo sie bis zu 6 Monaten aufbewahrt werden konnten oder sofort für den Restriktions- verdau eingesetzt werden.

3.2.2.1.5 Restriktionsverdau

Direkt nach dem Waschen wurden die Blöckchen aus den Tubes entnommen und einzeln in sterile Eppendorftubes überführt. Für den anschließenden Verdau wurde eine Restriktionslösung verwendet. Dazu erfolgte zunächst die Herstellung eines Restriktionsmixes, bestehend aus RNS- freiem Aqua bidest., 1x konzentriertem NE- Puffer 3 (*Not* I, *Xba* I und *Eco* RI) und 100 fach-konzentriertem Bovinen Serumalbumin (BSA). Zum Optimieren des Restriktionsverdau wurden verschiedene Restriktionsenzyme verwendet, um ein optimales Enzym für weitere Untersuchungen zu wählen. Zum Restriktionsmix wurden je nach Verdau 20 Units *Not* I, *Xba* I oder *Eco* RI als Restriktionsendonukleasen dazugegeben und jeweils 150 µl dieses Restriktionsgemisches in die Eppendorftubes pipettiert. Das Blöckchen wurde vorsichtig in diesen Ansatz überführt. Es folgte eine 24- stündige Inkubation im Thermostat bei +37°C. In dieser Zeit sollte die DNS des jeweiligen Isolates mit den genannten Restriktionsenzymen geschnitten werden.

3.2.2.1.6 Herstellung und Beladen des Gels

Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen (0,8%, 1,0%, 1,1% und 1,3%) des Gels hergestellt um den Ablauf der Elektrophorese zu optimieren. Zur Herstellung des Gels wurde der Ultra pure DNS grade- Agarose in 0,5x TBE- Puffer suspendiert. Danach wurde die Agarose- Suspension vorsichtig aufgeköcht, bis sie flüssig, klar (ohne Schlieren) und blasenfrei war und anschließend bei +56°C in den Thermomixer gestellt. Die Agarose- Lösung wurde dann unter Vermeidung von Luftblasen in die Kammer gegossen. Anschließend wurde der Kamm (0,75 mm dick, 15 wells) eingesetzt und das

Gel 30 min im Kühlschrank bei +4°C bis zum Erstarren gelagert. Es wurden immer pro Gel 15 Spuren belegt. 11 Spuren wurden mit Proben, 1 Spur mit der positiv- Kontrolle *Y. enterocolitica* DSM 13030, 1 Spur mit *Y. pseudotuberculosis* ATCC 29833 und 2 Spuren mit dem Pulsed- Field- Großenmarker (0,1 – 200kb) zur Größenbestimmung (Kilobasen) der Banden belegt. Für die Beladung des Gels wurden die Blöckchen in den Eppendorftubes in einen Heizblock gestellt und 10 Minuten bei +68°C geschmolzen. Von jedem geschmolzenen Blöckchen wurden anschließend 30 µl in die Geltaschen pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen bildeten. Von dem Marker wurde mit dem Skalpell eine hauchdünne Scheibe abgeschnitten. Die beiden jeweils ersten und letzten Slots wurden mit geschnittenen Marker bestückt und mit der abgenommenen Agarose verschlossen. Anschließend wurde das Gel in die PFGE- Kammer, in der 2,2 Liter 0,5 x TBE als Laufpuffer eingefüllt waren, eingesetzt. Die Kammer wurde konstant auf +10°C temperiert. Die Gele wurden im Laufpuffer 30 min äquilibriert und danach die DNS- Fragmente mit Hilfe einer CHEF- DR®- III Elektrophorese- Einheit elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.2.1.7 Pulsfeld- Gelelektrophorese

Zunächst wurde die Elektrophorese hinsichtlich der Lauf- und Pulszeiten optimiert. Dafür wurde die Pulsfeldgelelektrophorese mit linear ansteigenden Pulszeiten von 1 bis 18 sec bzw. 1,5 bis 50 sec und mit einer Laufzeit von 20 Stunden bzw. 18 Stunden in einem Feld von 6 Volt/cm und einem Winkel von 120° durchgeführt. Während des Versuches lag die Temperatur in der Kammer konstant bei +10°C. Nach dem Start erschien die aktuelle Stromstärke, die zwischen 115 – 135 mA lag. Die Pumpen- Geschwindigkeit betrug 0,75 l/min. Nachdem der Lauf des Gels beendet war, wurde es zur Anfärbung der DNS für 30 min in Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend für 2 Stunden in Aqua bidest. gewässert. Zur Dokumentation des Ergebnisses wurde das Gel in eine Dunkelkammer gelegt. Die Banden wurden mit UV- Licht sichtbar gemacht und das Gel mit einer CCD- Kamera fotografiert. Anschließend wurden die Aufnahmen mit Hilfe der Dokumentationssoftware in ein für die Auswertungs-

software lesbares Dateiformat umgewandelt (TIFF [Tagged Image File]-Format, zweidimensional, 256 Grautöne).

3.2.2.2 Auswertung der PFGE- Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte computergestützt mit der Software BionumericsTM, Version 4.6 (Applied Maths, Belgien). Die Bearbeitung der Spuren erfolgte in drei Abschnitten: Konvertierung, Normalisierung und Analyse. Die Ähnlichkeiten der festgestellten Bandenmuster wurden über den Dice- Koeffizienten berechnet und durch phylogenetische Bäume nach der unweighted pair- group method using arithmetic averages (UPGMA) dargestellt. Isolate, die eine Ähnlichkeit von über 90 % aufwiesen, wurden als Cluster bezeichnet.

3.2.3 Genotypische Differenzierung ausgewählter Isolate mittels der AFLP

151 ausgewählte Stämme wurden der molekularbiologischen Identifizierung und Feindifferenzierung unterzogen. Dabei handelte es sich um 130 nach PCR- Untersuchungen ermittelte *Yersinia enterocolitica*- Isolate (YopT⁺) und 21 Isolate der *Yersinia enterocolitica* (yopT⁻). Für die AFLP wurde eine modifizierte Methode nach Duim et al., (1999) angewendet.

3.2.3.1 DNS-Isolation

Die bei -20 °C gelagerten Stämme wurden auf Schafblut- Agar gebracht und bei +30 °C für 24h aerob bebrütet. Anschließend wurde die DNS mittels DNeasy-Kits (Fa. Qiagen GmbH) und Anwendung dessen Protokolls für gram- negative Bakterien isoliert. Hierzu wurde Koloniematerial in 1,4 ml TE- Puffer verrieben, auf einem Vortex- Schüttler gemischt und bei 4000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 180 µl ATL- Puffer (Fa. Qiagen) gelöst. Dann wurden 20 µl Proteinase K dazugegeben, gevortext und bei +55 °C für 2 h unter Rütteln auf dem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 4 µl RNase A hinzugegeben, gemischt und bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert. Im Anschluß an diese Prozedur wurden die Proben 15 sec lang auf einem Vortex- Schüttler gemischt und nach Zugabe von 200 µl AL- Puffer

(Fa. Qiagen) und erneutem Mischen für 10 min bei +70°C inkubiert. Danach wurden zu jeder Probe 200 µl Ethanol (90 – 100%) gegeben und das Ganze auf dem Vortex- Schüttler gemischt. Die Mischung wurde nun in DNeasy- Säulen, die auf einem 2 ml Sammel- Tube saßen, pipettiert und für 1 min bei 4000 g zentrifugiert. Wenn sich noch Flüssigkeit in der Säule befand, wurde zusätzlich für eine weitere Minute zentrifugiert. Die DNeasy- Säulen wurden dann auf neue 2 ml Sammel- Tubes gesetzt. Anschließend wurden 500 µl AW1- Puffer (Fa. Qiagen) zugegeben, und die Proben für 1 – 2 min bei 4000 g zentrifugiert. Die DNeasy- Säulen wurden erneut auf neue 2 ml Sammel- Tubes gesetzt. Nach Zugabe von 500 µl AW2- Puffer (Fa. Qiagen) wurden die Proben für 4 min bei 7000 g zentrifugiert. Nach dem Setzen der DNeasy- Säulen auf neue 2 ml Tubes wurden 100 µl AE- Puffer zugegeben und die Proben 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 min bei 7000 g zentrifugiert. Zum Schluss wurden nochmals 100 µl AE- Puffer (Fa. Qiagen) zugegeben, die Proben 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut für 2 min bei 7000 g zentrifugiert. Die Reinheit und die Menge der gewonnenen DNS wurde im Spektralphotometer durch Messung der Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt. Bei einem Quotienten der gemessenen Absorption bei 260 nm und 280 nm zwischen 1,7 und 1,9 konnte man von gut gereinigter DNS ausgehen. In 200 µl Eluationspuffer waren ca. 10 bis 30 µg DNS enthalten, dies entsprach einer DNS- Konzentration von 50 bis 150 ng/µl. Die auf die Weise erhaltenen DNS- Lösungen wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

3.2.3.2 Vorbereitung und Durchführung des AFLP- Verfahrens

3.2.3.2.1 Restriktion

Um das AFLP-Verfahren zu optimieren, wurden die DNS-Proben mit verschiedenen Restriktionsenzymen, vereinzelt und in Kombination mit anderen Restriktionsenzymen, geschnitten (Siehe Tabelle 12). Dabei wurden zwei Restriktionsmix- Ansätze hergestellt.

Restriktionsmix für eine Probe

Aqua bidest.	add.
NE2 Puffer	0,8 µl
BSA (10 mg/ml)	0,5 µl
<i>Hind III</i> (100.000 U/ml)	0,4 µl
<i>Hha I</i> (20.000 U/ml)	1,0 µl
DNS	1-9 µl (entsprechend 100-150ng DNS)
Summe	12 µl

Der Restriktionsmix- Ansatz wurde für eine Stunde bei +37°C inkubiert und anschließend weitere 15 Minuten bei +70°C auf dem Thermorüttler inkubiert. Um festzustellen, ob die DNS mit den eingesetzten Enzymen geschnitten war, wurden 10 µl der Restriktion- Amplifikate mit je 10 µl Ladepuffer gemischt, und von dieser Mischung wurden 10 µl in die Geltaschen gefüllt. Nach Anschließen der Gelkammer an ein Spannungsgerät wurde die Gelelektrophorese (100 mA, 50 V, 3 Std.) gestartet. Nach Beenden der Elektrophorese wurde das Gel in Ethidium-Bromid- Färbelösung geschwenkt und in Aqua bidest. gewässert.

3.2.3.2.2 Ligation

Ligationsmix für eine Probe

Aqua bidest.	8,4 µl
Ligasepuffer	1,6 µl
Ligase (1:40)	1,0 µl
Adaptermix	2,0 µl
Restriktionsmix	12 µl
Summe	25 µl

Vor der Herstellung des Ligationsmix, wurden die Adapterpaare (siehe Tabelle 13) zusammengemischt und 5 min bei +95°C erhitzt. Danach wurde der Adaptermix 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Dieser Vorgang wurde nur beim ersten Mal durchgeführt. Der so behandelte Adaptermix konnte für weitere Versuche ohne nochmaliges Erhitzen eingesetzt werden. Der Ligationsmix wurde für zwei Stunden bei +37°C inkubiert.

Adaptermix für eine Probe

<i>Hind</i> ad1 (5 pmol / µl)	0,5 µl
<i>Hind</i> ad2 (5 pmol / µl)	0,5 µl
<i>Hha</i> ad1 (50 pmol / µl)	0,5 µl
<i>Hha</i> ad2 (50 pmol / µl)	0,5 µl
Summe	2,0 µl

Tabelle 14: Verwendete Adapter

Adapter	Erkennungs- Sequenz
Hhaad1	5'- GAC GAT GAG TCC TGA TCG- 3'
Hhaad2	5'- ATC AGG ACT CAT CG- 3'
Hindad1	5'- CTC GTA GAC TGC GTA CC- 3'
Hindad2	5'- AGC TGG TAC GCA GTC- 3'

3.2.3.2.3 Präselektive PCR

Präselektiver PCR-Mix für eine Probe

Mix (dNTPs, MgCl ₂ , Polymerase)	15 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 µl
<i>Hhap</i> re	2,0 µl
<i>Hindp</i> re	0,6 µl
Restriktion-Ligation-Mix	4,0 µl

Vor dem Herstellen des präselektive PCR- Ansatzes wurde die Restriktion-Ligation- Lösung mit 175 µl Aqua bidest verdünnt. Danach wurden 4 µl der verdünnten Lösung für den präselektiven PCR- Ansatz verwendet. Nachdem Mischen der Komponenten wurden die Tubes verschlossen und in den Thermocycler gestellt. Tabelle 14 zeigt die für die präselektive PCR verwendete Primer.

Tabelle 15: Verwendete Primer für präselektive PCR

Primer	Erkennungs- Sequenz
<i>Hhap</i> re	5'- GAT GAG TCC TGA TCG C- 3'
<i>Hindp</i> re	5'- GAC TGC GTA CCA GCT T- 3'

Es wurde folgendes Cyclingschema verwendet:

Elongation	+72 °C	2 min	} 20 Zyklen
Denaturierung	+94 °C	20 sec	
Annealing	+56 °C	30 sec	
Elongation	+72 °C	120 sec	
Kühlen auf +4 °C			

3.2.3.2.4 Selektive PCR

Selektiver PCR- Mix für eine Probe

Mix (dNTPs, MgCl ₂ , Polymerase)	15 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 µl
<i>Hhase</i>	2,0 µl
<i>Hindse</i>	0,6 µl
präselektive PCR- Mix	4,0 µl

Die präselektive PCR- Lösung wurde mit 178 µl Aqua bidest. verdünnt und 4 µl davon wurde für den selektive PCR- Ansatz verwendet. Nach dem Zusammenmischen der Komponenten wurden die Tubes verschlossen und in den Thermocycler gestellt. Tabelle 15 zeigt die für die selektive PCR verwendete Primer.

Tabelle 16: Verwendete Primer

Primer	Erkennungs- Sequenz
<i>Hhasel</i>	5'- GAT GAG TCC TGA TCG CA- 3'
<i>Hindsel</i>	5'- GAC TGC GTA CCA GCT TA- 3'

Es wurde folgendes Cyclingschema verwendet:

Denaturierung:	+94 °C	20 sec	} 10 Zyklen
Annealing:	+66 °C	30 sec	
Elongation :	+72 °C	120 sec	
Denaturierung:	+94 °C	20 sec	} 20 Zyklen
Annealing:	+56 °C	30 sec	
Elongation:	+72 °C	120 sec	
Annealing:	+60 °C	30min	
Kühlen auf +4 °C			

3.2.3.2.5 Gelelektrophorese

Für die sich anschließende Gelelektrophorese wurde ein 12,5%iges Polyacrylamidgel auf die durch Wasserkühlung auf +15°C gekühlte Elektrophoreseplatte gelegt. Zuvor wurde die Platte mit Kerosin dünn bestrichen, um eine genügende Temperierung und Haftung des Gels zu gewährleisten. Danach wurden die beiden Laufpuffer an den Längsseiten des Gels (Anode und Kathode) luftblasenfrei aufgelegt. 5 µl PCR- Amplifikate wurden mit je 2 µl Laufpuffer gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Pro Laufbahn wurden ebenfalls Längenmarker, Positiv- und Negativ- Kontrollen mitgeführt. Nach Anschließen der Gelkammer an ein Spannungsgerät wurde die Gelelektrophorese (50 mA, 600 V, 30 W, 90 min) gestartet. Nach Beenden der Elektrophorese wurden die PCR- Amplifikate mit einer Silberfärbung mit einem DNS- Silver- Staining- Kit sichtbar gemacht. Das Gel wurde nach Silberfärbung getrocknet und auf Gel- Fix[®]- Folie gebracht. Tabelle 16 zeigt den Ablauf der Silber- Nitrat- Färbung der Polyacrylamid- Gele.

Tabelle 17: Ablauf der Silberfärbung

Lösung	Zusammensetzung	Dauer
Fixierung	benzensulfonat, Ethanol	30 min
Färbung	Sibernitrat, Aqua bidest.	30 min
Waschen	Aqua bidest.	2 min
Entwicklung	Natrium Carbonat, Naturim Thiosulfat, Formaldehyd, Aqua bidest.	3 min
Stoppen und Fixierung	EDTA, Glycerol, Natrium Acetat, Aqua bidest.	30 min

Die Banden wurden unter Weiß- Licht mit einer CCD- Kamera fotografiert. Anschließend wurden die Aufnahmen mit Hilfe der Dokumentationssoftware in ein für die Auswertungssoftware lesbares Dateiformat umgewandelt (TIFF- Tagged Image File-Format, zweidimensional, 256 Grautöne).

3.2.3.3 Auswertung der AFLP-Ergebnisse

Die Auswertung der Fragmentmuster erfolgte mit der Software von BionumericsTM, Version 4.6 (Applied Maths, Belgien). Hierzu wurden die Gelspuren zuerst konvertiert und dann normalisiert. Die Ähnlichkeiten der festgestellten Bandenmuster wurden über den Pearson- Korrelations- Koeffizienten berechnet und durch phylogenetische Bäume nach der unweighted pair- group method using arithmetic averages (UPGMA) dargestellt. Isolate, die eine Ähnlichkeit von über 90% aufwiesen, wurden als ein Cluster bezeichnet.

3.2.4 Auswertung der Typisierungsdaten mit Hilfe von BionumericsTM- Software

Zunächst wurde das Gelbild als Negativ abgespeichert (Invertieren). Die Banden erschienen dadurch dunkel auf hellem Hintergrund. Jeder Spur wurde Genus, Spezies und Stammnummer zugeordnet. Die Bearbeitung der Spuren erfolgte in drei Abschnitten: Konvertierung, Normalisierung und Analyse.

3.2.4.1 Konvertierung

Der zu untersuchende Bereich des Gels wurde mit einem flexiblen Rahmen festgelegt. Innerhalb dieses Bereiches befanden sich alle sichtbaren Banden. Auswertbare Banden von Yersinien- Stämmen sowie die Marker wurden als Spuren auf dem Gel definiert und ihre Laufstrecke densitometrisch erfasst. Der Kontrast der Banden zum Hintergrund wurde optimiert, so dass auch schwache Banden deutlich sichtbar erschienen. Die einzelnen Laufstrecken wurden in densitometrischen Kurven erfasst und dunkel erscheinende Staubpartikel, kleine Luftbläschen etc. mit Filtern aus dem Hintergrund entfernt.

3.2.4.2 Normalisierung

Als nächster Schritt erfolgte eine Entzerrung des Gels. Diese war notwendig, um eine Angleichung verzerrter, schiefer und verschieden weit gelaufener Banden zu erreichen. Außerdem konnten smiling- Effekte ausgeglichen werden. Sie entstanden dann, wenn die inneren Bahnen auf dem Gel schneller als die äußeren liefen. Ziel der Normalisierung war es, die einzelnen Laufspuren so zu optimieren, dass sie untereinander vergleichbar wurden. Dafür wurde aus allen Gelbildern ein optimal gelaufener Marker (Pulsed- Marker für PFGE und DNS- Sizer XII für AFLP) ausgewählt. Die gleichmäßig verteilten Banden wurden anschließend als Standard- Referenz- System definiert. Dieses wurde für alle Gele zur Normalisierung verwendet, wobei die jeweiligen Marker der äußeren Spuren mit dem Standard- Referenz- System über Referenzlinien in Beziehung gesetzt wurden und gleichzeitig eine Ausrichtung aller dazwischen liegenden Spuren erfolgte. Dadurch konnten die DNS- Fragmentmuster aller Gele miteinander verglichen werden. Nach Angleichung der DNS- Fragmentmuster an das Standard- Referenz- System wurden alle erkennbaren Banden einzeln manuell markiert und die fertigen Spuren zur weiteren Auswertung in einer Datenbank gespeichert.

3.2.4.3 Bandenmuster- Analyse

Zur Feststellung von Verwandtschaftsgraden der untersuchten Stämme wurde die Cluster- Analyse durchgeführt. Dafür wurde ebenfalls das Computer- Programm Bionumerics™, Version 4.6 verwendet. Die Software konnte Ähnlichkeiten zwischen den DNS- Fragmentmustern der einzelnen Stämme über Ähnlichkeitskoeffizienten bestimmen. Dabei wurde die Übereinstimmung von Bandenmustern charakterisiert, indem die Anzahl gleicher Banden in Beziehung zur Gesamtbandenzahl gesetzt wurde. Zusätzlich wurde auch die Lage jeder individuellen Bande zu Vergleichsbanden mit einbezogen. Die Abstände wurden über die Auswertungssoftware berechnet. Aus der Summe der Abstandsdifferenzen wurde dann ein Ähnlichkeitsfaktor zwischen Paaren von Bandenmustern berechnet. Die daraus resultierenden Ähnlichkeits- Koeffizienten konnten auch als Verwandtschaftsgrade unter den Isolaten interpretiert werden.

3.2.4.4 Dice- und Pearson- Korrelation- Koeffizient

Zum Vergleich der DNS- Fragmentmuster wurde mittels des Dice- Koeffizienten die Positionstoleranz bei 1,0% und die Optimierung bei 0,5% festgelegt. Für Pearson- Korrelations- Koeffizient wurde die Positionstoleranz bei 1,0% und die Optimierung bei 5,0% festgesetzt. Die Positionstoleranz (in prozentualem Bezug zur Gesamtlänge der Spuren) begrenzte für den paarweisen Vergleich die maximal erlaubte Distanz zwischen Positionen zweier Banden auf verschiedenen DNS- Fragmentmustern. Innerhalb dieses festgelegten Bereiches wurden die Banden als übereinstimmend gewertet. Die Optimierung setzte fest, in welchem Rahmen das Computerprogramm ganze Bandenmuster als übereinstimmend werten durfte.

3.2.4.5 UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages)

Für die Berechnung der Verwandtschaftsgrade wurde der UPGMA- Cluster Algorithmus ausgewählt. Er verwendete arithmetische Mittelwerte bei seiner Berechnung zur hierarchischen Gruppenbildung (Cluster). Alle Versuchsergebnisse wurden gleich gewichtet (unweighted). Ein Stamm wurde einem Cluster zugeordnet, wenn die durchschnittliche Ähnlichkeit mit diesem größer war als die Ähnlichkeit mit einem anderen Cluster. Zunächst wurden die Ähnlichkeitskoeffizienten aus Vergleichen von Bandenmustern aller Isolate untereinander in einer Ähnlichkeits- Matrix erstellt. Die gesamte Laufstrecke der einzelnen Spuren und damit sämtliche aufgetretene Einzelbanden wurden durch eine Gesamtprofilanalyse erfasst. Dann wurden die am besten übereinstimmenden Bandenmuster zweier Isolate (pair group) mit dem größten Ähnlichkeitskoeffizienten als Cluster zusammengefasst. Dieses Cluster wurde als einzelnes Objekt behandelt, wobei der Mittelwert für weitere Vergleichsuntersuchungen genommen wurde. Bei der weiteren Berechnung wurden das nächste Paar mit dem größten Ähnlichkeitskoeffizienten zu einem Cluster zusammengefasst. Eine Wiederholung dieser Vorgänge wurde so lange durchgeführt, bis das letzte Cluster mit kleinsten Ähnlichkeitskoeffizienten (mit dem geringsten Verwandtschaftsgrad) berechnet worden war.

3.2.4.6 Darstellung und Vergleich der PFGE- und AFLP- Ergebnisse

Die Ergebnisse der Ähnlichkeitsberechnungen wurden graphisch anhand eines Dendrogrammes dargestellt. Im Dendrogramm wurden die Bandenmuster der Isolate zu Clustern zusammengestellt. Ähnlichkeitsgrade wurden durch die Höhe der vertikalen Verbindungslinie zwischen zwei Gruppen oder Stämmen ausgedrückt und konnten auf einer Skala in Prozent abgelesen werden. Die Grenze der Ähnlichkeit (Cut off) wurde bei 90% festgelegt. Stämme, die eine Ähnlichkeit von über 90% aufwiesen, wurden in gemeinsamen Clustern zusammengefasst. Stämme mit einer Ähnlichkeit von 90% wurden als identisch angesehen.

4 Ergebnisse

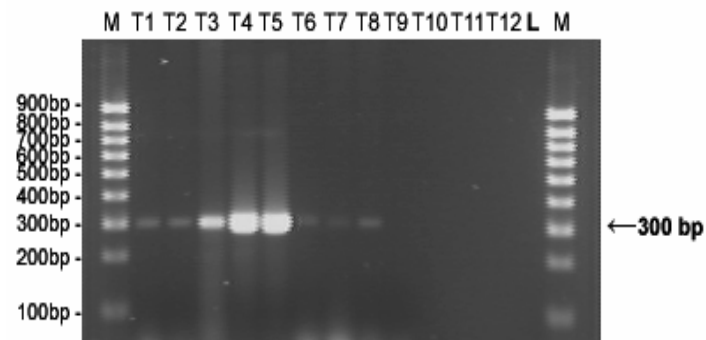
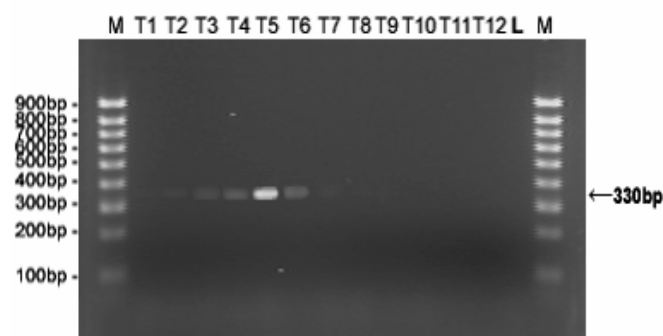
In einem Zeitraum von 28 Tage nach der oralen Infektion der Masthähnchen wurden die Tiere jede zwei Tage (ein Durchgang) auf das Vorhandensein der *Y. enterocolitica* DSM 13030 in deren Kot untersucht. Die Isolierung der Verdächtige Kolonien aus Kottupfer bzw. Kloakenabstrich erfolgte sowohl mittels Direktausstrich auf Cefsulodin- Irgasan- Novobiocin- Medium (CIN) mit anschließenden Verdünnungsausstriche als auch mittels selektive Anreicherung auf Irgasan- Ticarcillin- Chlorate- Bouillon (ITC) und Phosphate- gepufferte Kochsalzlösung (PBS, 6 Wochen Kälteanreicherung). Insgesamt wurden 747 verdächtige *Y. enterocolitica*- Stämme aus den 15 Durchgängen (A – O) untersucht. Mit Hilfe der PCR- Verfahren sollten die Ergebnisse der biochemischen Differenzierung bestätigt und ggf. korrigiert werden. Mittels PFGE und AFLP wurden die ausgewählte *Yersinia* spp.- Stämme feintypisiert.

4.1 Multiplex- PCR (MPCR) zur Nachweis von Genus, Spezies und Pathogenität der *Yersinia* spp.- Feldstämme

Mittels einer Multiplex- PCR wurden das Genus (Yersinien), die Spezies (*Y. enterocolitica*) und die Pathogenität (*yopT*- Gene) der Feldstämme bestimmt. Vorher wurde mittels Gradienten- PCR die optimale Annealing- Temperatur für die PCR- Untersuchungen von isolierten *Y. enterocolitica*- Feldstämme bestimmt (Abbildungen 1A bis 1C).

4.1.1 Ergebnisse der Gradienten- PCR

Die Ergebnisse der Gradienten- PCR zeigten, dass die optimale Annealing- Temperatur für die drei ausgewählten Primer zwischen +51,4°C und +55,5°C lag. Daher wurde für die weitere PCR- Untersuchungen von *Y. enterocolitica*- Feldstämme die Annealing- Temperatur von +55,5°C verwendet. In Abbildung 1A bis 1C sind die Unterschiede hinsichtlich der Annealing- Temperatur zwischen den drei Gradienten- PCR mit Y-, YE- und *yopT*- Primer dargestellt.

1A (Y- Primer)**1B (YE- Primer)****1C (yopT- Primer)**

Abbildungen 1A-1C: Gradienten- PCR von *Y. enterocolitica* DSM 13030 zur Ermittlung der Annealing- Temperatur für die Y-, YE- und yopT- Primer. Abbildung 1A: Nachweis des Genus mittels Y- Primer, Abbildung 1B: Nachweis der Spezies anhand YE- Primer. Abbildung C: Nachweis der Pathogenität mittels yopT- Primer. Jeweils in Spur 1 und 15 ist die DNS-Längenmarker (M) aufgetragen. Spur 14 ist die Negativ-Kontrolle (L). T1= +50,0°C; T2= +50,3°C; T3= +51,4°C; T4= +53,2°C; T5= +55,5°C; T6= +58,1°C; T7= +60,8°C; T8= +63,5°C; T9= +66,0°C; T10= +68,1°C; T11= +69,7°C; T12= +70,5°C.

Während bei Y- und yopT- Primer die Annealing- Temperatur zwischen +51,4°C und +55,5°C schwankte, war die optimale Temperatur bei YE- Primer +55,5°C. Bei alle drei Primer konnte ab eine Annealing- Temperatur von +60,8°C keine Signale detektiert werden.

4.1.2 Ergebnisse der Multiplex- PCR (MPCR)

Von insgesamt 747 verdächtigen *Y. enterocolitica*- Isolate, die mittels Multiplex-PCR- Methode untersucht wurden, konnten 596 (79,8%) Isolate als *Yersinia*-negativ, 130 (17,4%) Isolate als *Y. enterocolitica* positiv (mit *yopT*- Gen) und 21 (2,8%) Isolate als *Yersinia* spp.- positiv ohne *yopT*- Gen identifiziert werden. Die meiste *Y. enterocolitica*- positive Stämme wurden in den Durchgänge B (2. Tag post infectionem) bis F (10. Tag post infectionem) gefunden. Ab den Durchgang G (12. Tag post infectionem) wurden keine *Yersinia* spp.- Stämme identifiziert. Daher wurden nur die Durchgänge B bis F für die Genotypisierung der Stämme untersucht. Die Abbildung 2 zeigt die Multiplex- PCR- Ergebnisse einiger ausgewählten *Yersinia* spp.- Stämme.

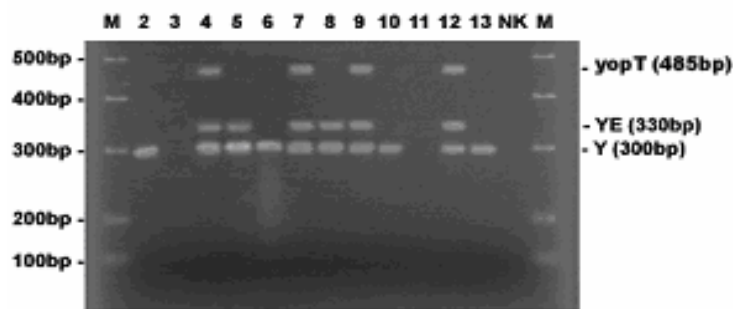


Abbildung 2: Multiplex- PCR von einigen isolierten Feldstämmen mit Y-, YE- und yopT-Primer. Jeweils in Spur 1 und 15 ist die DNS-Längenmarker (M) aufgetragen. In Spur 2, 6, 10 und 13 sind *Y. kristensenii* (ATCC 33638), *Y. frederiksenii* (ATCC 33641), *Y. aldovae* (ATCC 35236) und *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833), in Spur 3 *Yersinia*-negativer Stamm, in Spuren 5 und 8 *Yersinia enterocolitica*- Stämme ohne *yopT*- Gen, in Spuren 4, 7 und 9 *Y. enterocolitica* Stämme mit *yopT*- Gen, in Spur 11 *Providencia rettgeri* (DSM 1130), in Spur 12 ist die positiv-Kontrolle *Y. enterocolitica* (DSM 13030) und in Spur 14 ist die negativ-Kontrolle (NK).

Es konnte bei allen *Yersinia* spp.- Stämmen ein Signal bei 300bp detektiert werden. Alle *Y. enterocolitica*- Isolate zeigten ein Signal bei 330bp. Die *Y. enterocolitica*- Isolate (mit *yopT*- Gen) zeigten zusätzlich eine Bande bei 485bp. Zur Kontrolle der Primer-Spezifität wurden die *Y. kristensenii* (ATCC33638), *Y. aldovae* (ATCC35236), *Y. frederiksenii* (ATCC33641) und *Y. pseudotuberculosis* (ATCC29833) mitgeführt. Diese Stämme zeigten nur ein Signal bei 300bp. Aufgrund des Verdachts auf eine Kreuzkontamination mit *Providencia rettgeri*, wurde dieser Stamm als zweite Negativ-Kontrolle mitgeführt. Das Ergebnis der PCR-Untersuchung hat diesen Verdacht nicht bestätigt. Die Ergebnisse aus der Multiplex-PCR-Untersuchungen stimmten mit den biochemischen Resultaten 100% überein.

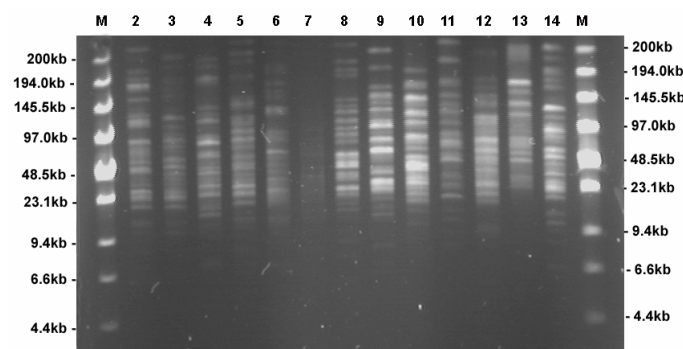
4.2 Feintypisierung der *Yersinia* spp.- Feldstämme mittels Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

Für die Feintypisierung der isolierten *Yersinia* spp.- Stämmen mittels PFGE wurden insgesamt 151 Stämme ausgewählt. Davon waren 130 *positive Y. enterocolitica*- Isolate mit und 21 *Yersinia* spp. Isolate ohne *yopT*- Gen. Als Referenzstamm wurde wie bei der PCR die *Y. enterocolitica* (DSM 13030 4/O:3) benutzt. Zusätzlich wurden drei *Y. enterocolitica*- Stämme unterschiedlicher Bioserovare (4/O:3 *yopT*- negativ; 1A/O:41,43; O:5,27; 1A/O:7,8) und *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833) aus der Stammsammlung des Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) mitgeführt. Es sollte neben der Genotypisierung der isolierten *Yersinia* spp.- Stämmen, die genotypische Unterschiede zwischen den Referenzstämmen und innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* unterschiedlicher Serotypen untersucht werden. Außerdem sollte die Reproduzierbarkeit der Methode mit Hilfe dieser Stämme untersucht werden. Vorher wurde die PFGE Methode optimiert. Hierbei wurden die Restriktion- und der Elektrophorese- Schritte optimiert.

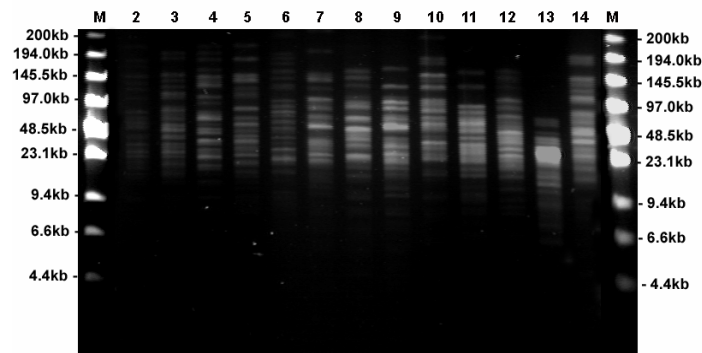
4.2.1 Ergebnisse der Optimierung des Restriktionsschrittes

Für die Restriktion der chromosomalen DNS wurden die Restriktionsenzyme *Not* I, *Xba* I und *Eco* RI verwendet. Dabei wurden 20 Units des jeweiligen Enzymes verwendet. Die Abbildungen 3A bis 3C zeigen die entstandenen Bandenmuster nach der Restriktion der chromosomalen DNS mit jeweiligen Enzymen.

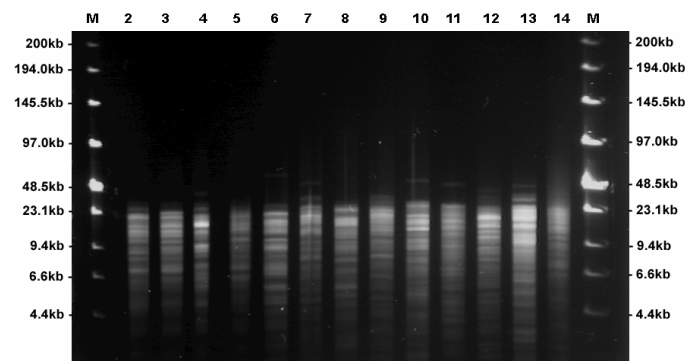
3A (Restriktion mit *Not* I)



3B (Restriktion mit *Xba* I)



3C (Restriktion mit *Eco* RI)



Abbildungen 3A bis 3C: PFGE der *Yersinia* spp.- Stämme mit den Restriktionsenzymen *Not* I, *Xba* I und *Eco* RI. Jeweils in Spur 1 und 15 sind die DNS- Längenmarker (M), in Spur 2 *Y. enterocolitica* 4/O:3 (Tier- Isolat, ohne *yopT*- Gen), in Spur 3 *Y. enterocolitica* 4/O:3 (Human- Isolat, mit *yopT*- Gen), in Spur 4 *Y. enterocolitica* 1A/O:41,43 (Tier- Isolat, ohne *yopT*- Gen), in Spur 5 *Y. enterocolitica* O:5,27, in Spur 6 *Y. enterocolitica* 1A/O:7,8, in Spur 7 *Y. pseudotuberculosis* (Tier- Isolat), in Spur 8 *Y. kristensenii* (ATCC 33638), in Spur 9 *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833), in Spur 10 *Y. aldovae* (ATCC 35236), in Spur 11 *Y. frederiksenii* (ATCC 33641), in Spur 12 *Y. bercovieri* (ATCC 43970), in Spur 13 *Providencia rettgeri* (DSM 1130) und in Spur 14 *Y. enterocolitica* 4/O:3 (DSM 13030).

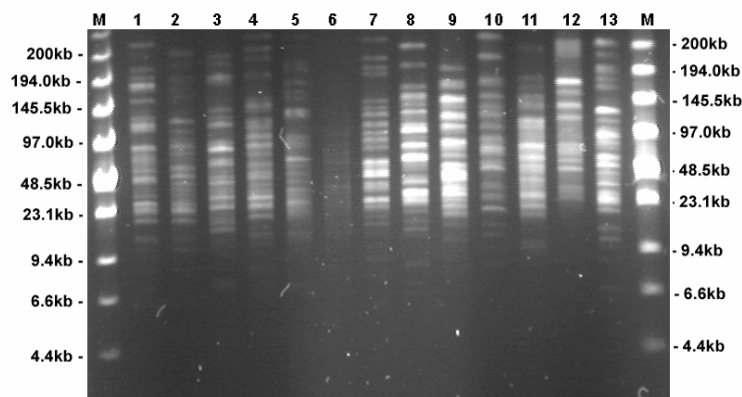
Wie aus der Abbildungen 3A bis 3C zu entnehmen ist, wurden bei der Restriktion der chromosomalen DNS mit der Endonuclease *Not* I ca. 18 – 24 Banden im Bereich von 10,5 – 250 kb entstanden. Bei der Restriktion mit der *Xba* I waren lediglich ca. 12 – 18 Banden im Bereich von 18 – 194 kb zu sehen. Bei der Restriktion der DNS mit *Eco* RI entstanden 10 – 14 Banden im unteren Bereich (4,4 – 48,5 kb) des Gels.

4.2.2 Ergebnisse der Gelkonzentration-, Lauf- und Pluszeit- Optimierung

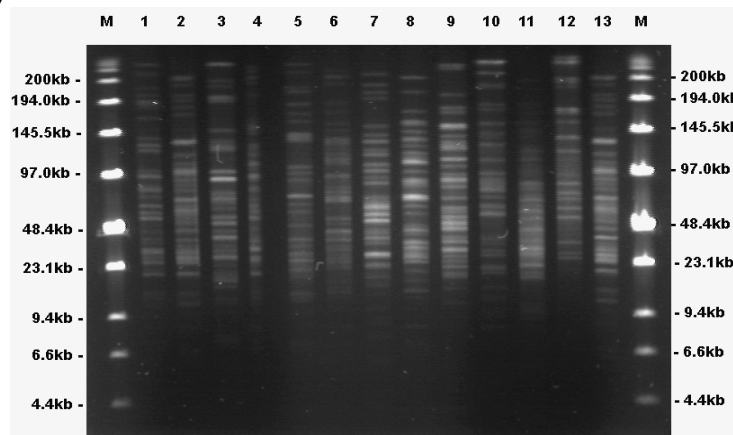
Hierbei wurde die Pulsfeldgelelektrophorese mit Restriktionsenzym *Not* I bei verschiedenen Gelkonzentrationen, Puls- und Laufzeiten durchgeführt um eine optimale Trennung und Auflösung der Banden zu erzielen. Zunächst wurden

verschiedene Konzentrationen (0,8%, 1,0%, 1,1% und 1,3%) des Agarose-Gels hergestellt um den Ablauf der Elektrophorese zu optimieren. Die Ergebnisse zeigten, dass das 1,1%- Agarose Gel aufgrund höherer Auflösung der Banden am besten geeignet war. Als nächstes wurden zwei verschiedene Lauf- und Pulszeiten (18h / 1,5sec-50sec bzw. 20h / 1sec-18sec) für die Elektrophorese ausgewählt. Die Abbildungen 4A und 4B zeigen die Ergebnisse der Gelelektrophorese bei verschiedenen Puls und Laufzeiten. Die Konzentration der beiden Agarose- Gele betrug 1,1%.

4A (Pulsfeldgelelektrophorese mit Lauf- und Pulszeit von 18h / 1,5sec-50sec)



4B (Pulsfeldgelelektrophorese mit Lauf- und Pulszeit von 20h / 1sec-18sec)



Abbildungen 4A und 4B: PFGE der *Yersinia* spp.- Stämme mit den Restriktionsenzym *Not* I bei verschiedene Lauf- und Pulszeiten. Jeweils am Anfang und Ende des Gels sind die DNS-Längenmarker (M), in Spur 1 *Y. enterocolitica* 4/O:3 (Tier- Isolat, ohne *yopT*- Gen), in Spur 2 *Y. enterocolitica* 4/O:3 (Human- Isolat, mit *yopT*- Gen), in Spur 3 *Y. enterocolitica* 1A/O:41,43 (Tier- Isolat, ohne *yopT*- Gen), in Spur 4 *Y. enterocolitica* O:5,27, in Spur 5 *Y. enterocolitica* 1A/O:7,8, in Spur 6 *Y. pseudotuberculosis* (Tier- Isolat), in Spur 7 *Y. kristensenii* (ATCC 33638), in Spur 8 *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833), in Spur 9 *Y. aldovae* (ATCC 35236), in Spur 10 *Y. frederiksenii* (ATCC 33641), in Spur 11 *Y. bercovieri* (ATCC 43970), in Spur 12 *Providencia rettgeri* (DSM 1130) und in Spur 13 *Y. enterocolitica* DSM 13030 (4/O:3).

Die Abbildungen 4A und 4B zeigen, dass die Auflösung und die Trennung der Banden mit einer Laufzeit von 20 Stunden und einer Pulszeit von 1 – 18 sec deutlicher erscheinen. Wie bereits erwähnt, lagen die Banden im Bereich von 6,2 – 250 kb. Bei der Restriktion von *Y. enterocolitica* DSM 13030 mit dem Enzym *Not* I konnten 22 Banden im Bereich von 10,5 – 210 kb detektiert werden.

4.2.3 PFGE- Typisierung

Für die Überprüfung der Reproduzierbarkeit dieser Methode wurden fünf Referenz- Stämme (*Y. enterocolitica* DSM 13030; *Y. enterocolitica* 4/O:3 *yopT*-negativ; *Y. enterocolitica* O:5,27; *Y. enterocolitica* 1A/O:7,8 und *Y. pseudotuberculosis* ATCC 29833) und fünf Feldstämme in 10 Durchgängen nacheinander geprüft. Es konnten von Gel zu Gel minimale Variationen beobachtet werden. Nach der Normalisierung der Gele wurden die Bandenmuster der mitgeführten Stämme miteinander verglichen. Hierbei konnte eine Homologie von 90- bis 100- Prozent beobachtet werden. Bei den folgenden Untersuchungen wurden Isolate, die eine Ähnlichkeit (cut- off) $\geq 90\%$ zeigten, als genetisch eng miteinander verwandt (klonal) angesehen. Die verwandtschaftlichen Verhältnisse der Isolate wurden in Dendrogramme dargestellt.

4.2.3.1 Genotypisierung der Referenzstämme

Wie bereits erwähnt wurden neben *Y. enterocolitica* DSM 13030 als Kontrollstamm vier weitere Referenzstämme bei der PFGE- Untersuchungen genotypisiert. Ziel dieses Teil der Untersuchung war es, den Verwandtschaftsgrad der Referenzstämme untereinander festzustellen. Das Ergebnis der Typisierung der Referenzstämme wurde in einem Dendrogramm dargestellt (Abbildung 5).

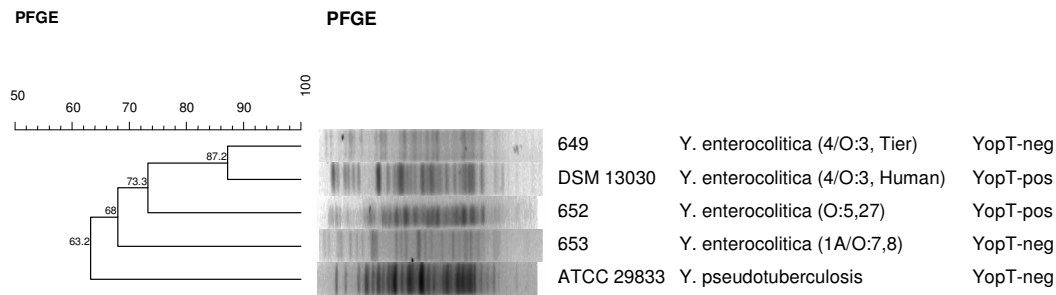


Abbildung 5: PFGE- Feintypisierung der Referenzstämmen. Die Ähnlichkeitsgrad wurde mit dem bandenbasierenden Dice- Koeffizient- Methode errechnet. Für das Erstellen des Dendrogramm wurde die UPGMA (unweighted Paargruppe- Methode mit arithmetischen Mitteln) eingesetzt. Es wurde eine Position Toleranz von 1.0% angewendet. Die cut- off wurde bei 90% gelegt.

Die Ergebnisse der Feintypisierung von Referenzstämmen zeigen, dass der Verwandtschaftsgrad zwischen *Y. enterocolitica*- Stämmen unterschiedlicher Serotypen 68% betrug. Zwischen *Y. enterocolitica*- Stämmen und *Y. pseudotuberculosis*- Stamm gab es einen Verwandtschaftsgrad von 63,2%. Außerdem zeigten die beiden *Y. enterocolitica*- (DSM 13030 4/O:3, Human) und *Y. enterocolitica*- (4/O:3, Tier) Stämme eine Homologie von 87,2%. Zwischen den beiden yopT- positiven Stämmen (*Y. enterocolitica* DSM 13030 4/O:3 und *Y. enterocolitica* O:5,27) gab es eine Ähnlichkeit von 73,3%. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster zwischen *Y. enterocolitica* (1A/O:7,8) und *Y. enterocolitica* (DSM 13030 4/O:3) betrug 68%.

4.2.3.2 Genotypisierung der isolierten *Yersinia* spp.- Stämme

Insgesamt wurden 151 ausgewählte *Yersinia* spp.- Stämme, die mit Multiplex-PCR als *Y. enterocolitica* identifiziert wurden, für die Feintypisierung mittels PFGE- Methode herangezogen. Hierbei waren 130 Isolate *Y. enterocolitica*- positiv mit yopT- Gen und 21 Isolate *Yersinia* spp. ohne yopT- Gen. Die zu untersuchenden Isolate verteilten sich auf 5 Durchgänge. Die Durchgänge (B bis F) entsprechen den Tagen nach der oralen Infektion, an denen die Tiere beprobt wurden. Neben *Y. enterocolitica* DSM 13030 (4/O:3) als Referenz-Stamm wurden zusätzlich drei *Y. enterocolitica*- Stämme unterschiedlicher Bioserotypen (4/O:3 yopT- negativ; O:5,27; 1A/O:7,8) und *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833) in jedem Durchgang mitgeführt. Die Ergebnisse der Feintypisierungen wurden als Dendrogramm dargestellt. Dabei

wird auf die Abbildungen 6 – 11 im Anhang dieser Arbeit verwiesen. Zum Einteilen der typisierten Isolate wurde der cut-off- Wert aufgrund der minimalen Variationen zwischen Gele bei 90% festgelegt. Isolate die eine Ähnlichkeit von $\geq 90\%$ aufwiesen, wurden als genetisch eng miteinander verwandt (klonal) angesehen.

4.2.3.2.1 PFGE- Typisierung der Isolate im Durchgang B (2. Tag post Infectionem)

In diesem Durchgang wurden insgesamt 79 *Yersinia* spp.- Isolate mittels PFGE- Methode typisiert und miteinander verglichen. Davon wurden 72 Stämme als *Y. enterocolitica* mit *yopT*- Gen und 7 Stämme als *Y. enterocolitica* ohne *yopT*- Gen identifiziert. Zwischen den *Yersinia* spp.- Isolaten (*yopT*⁺) und *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm gab es eine Homologie von 91,7% und zwischen *Yersinia* spp.- Isolat (*yopT*⁻) und *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm 90,2%. Innerhalb der *Yersinia* spp.- Isolate betrug die Ähnlichkeit der Bandenmustern 90,65%. Die Bandenmuster der *Yersinia* spp.- Isolate (*yopT*⁻) und *Y. enterocolitica* 4/O:3 (tierische Herkunft) waren zur 85,8% ähnlich. Innerhalb der *Y. enterocolitica* 4/O:3- Gruppe herrschte eine Ähnlichkeit von 85,2%. Die *Y. enterocolitica*- Stämme unterschiedlicher Serotypen (1A/O:7,8 und O:5,27) wiesen eine Ähnlichkeit von 69,2 – 74,1% gegenüber den *Yersinia* spp.- Isolaten auf. Die Homologie zwischen *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833)- Stamm und *Y. enterocolitica*- Stämmen betrug 64,7% (Abbildung 6 im Anhang).

4.2.3.2.2 PFGE- Typisierung der Isolate im Durchgang C (4. Tag post Infectionem)

Hier wurden insgesamt 28 *Yersinia* spp.- Isolate mittels PFGE- Methode typisiert. Mittels PCR wurden 18 Isolate als *Y. enterocolitica* mit *yopT*- Gen und 10 Isolate als *Y. enterocolitica* ohne *yopT*- Gen identifiziert. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster zwischen den *Y. enterocolitica*- Stämmen (*yopT*⁺) und *Y. enterocolitica*- Stämmen (*yopT*⁻) betrug 91,9%. Zwischen den *Yersinia* spp.- Isolaten (*yopT*⁺) und *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm gab es eine Homologie von 94,8% und zwischen *Yersinia* spp.- Isolat (*yopT*⁻) und *Y.*

enterocolitica (DSM 13030)- Stamm 90,75%. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster zwischen *Y. enterocolitica*- Stämme unterschiedlicher Serotypen und *Yersinia* spp.- Isolate betrug 64,8 – 73,9%. Die Bandenmuster der *Yersinia* spp.- Isolate (*yopT*⁻) und *Y. enterocolitica* 4/O:3 (tierische Herkunft) waren zur 88,4% ähnlich. Innerhalb der Bioserogruppe 4/O:3 gab es eine Ähnlichkeit der Bandenmuster von 86,33%. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster zwischen den *Y. enterocolitica*- Stämmen und *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833)- Stamm betrug 65,6% (Abbildung 7 im Anhang).

4.2.3.2.3 PFGE- Typisierung der Isolate im Durchgang D (6. Tag post Infectionem)

In dem Durchgang D wurden insgesamt 18 *Yersinia* spp.- Isolate für die Typisierung mittels PFGE- Methode ausgewählt. Davon waren 17 *Y. enterocolitica* (*yopT*⁺) Isolate und ein *Y. enterocolitica* (*yopT*⁻) Isolat. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster zwischen den *Y. enterocolitica*- Stämmen (*yopT*⁺) und *Y. enterocolitica*- Stamm (*yopT*⁻) betrug 90,15%. Zwischen den *Yersinia* spp.- Isolate (*yopT*⁺) und *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm gab es eine Homologie von 97,3% und zwischen *Yersinia* spp.- Isolat (*yopT*⁻) und *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm 95,1%. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster innerhalb der Bioserogruppe 4/O:3 betrug 84,9%. Die Bandenmuster des *Yersinia* spp.- Isolates (*yopT*⁻) und *Y. enterocolitica* 4/O:3 (tierische Herkunft) war zur 87,9% ähnlich. Die *Y. enterocolitica*- Stämme unterschiedlicher Serotypen wiesen eine Ähnlichkeit von 69,9 – 74,3% zu den *Yersinia* spp.- Isolate auf. Die Bandenmuster der *Y. enterocolitica*- Stämme und *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833)- Stamm waren zu 64,1% identisch (Abbildung 8 im Anhang).

4.2.3.2.4 PFGE- Typisierung der Isolate im Durchgang E (8. Tag post Infectionem)

Insgesamt 22 *Yersinia* spp.- Isolate wurden in diesem Durchgang mit PFGE- Methode genotypisiert. Hierbei waren 18 Isolate *Y. enterocolitica* (*yopT*⁺) und 4 Isolate *Y. enterocolitica* (*yopT*⁻). Zwischen den *Y. enterocolitica*- Stämmen (*yopT*⁺) und *Y. enterocolitica*- Stamm (*yopT*⁻) gab es eine Homologie von

90,63%. Die Bandenmuster der *Y. enterocolitica*- Stämme (*yopT*⁻) und des *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm waren zu 92,4% identisch. Zwischen den *Yersinia* spp.- Isolaten (*yopT*⁺) und *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm gab es eine Homologie von 95,9%. Die Bandenmuster des *Yersinia* spp.- Isolates (*yopT*⁻) und *Y. enterocolitica* 4/O:3 (tierische Herkunft) waren zur 89,47% ähnlich. Die Homologie zwischen den *Y. enterocolitica*- Stämmen unterschiedlicher Serotypen und den *Yersinia* spp.- Isolaten betrug 68,2 – 73,4%. Zwischen der Bioserogruppe 4/O:3 gab es eine Ähnlichkeit von 84,92%. Die Bandenmuster der *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833)- Stamm war zu 65,42% identisch mit den Bandenmuster der *Y. spp.*- Isolate (Abbildung 9 im Anhang).

4.2.3.2.5 PFGE- Typisierung der Isolate im Durchgang F (10. Tag post Infectionem)

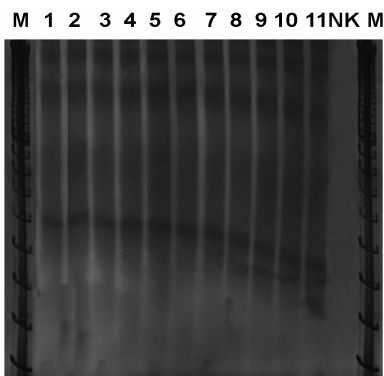
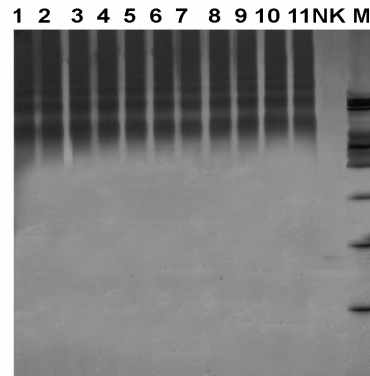
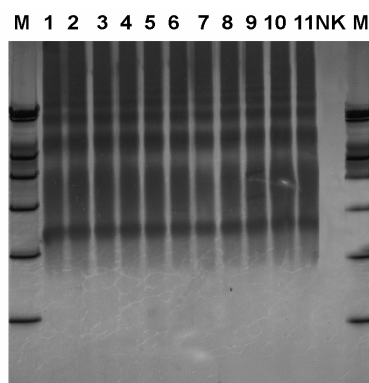
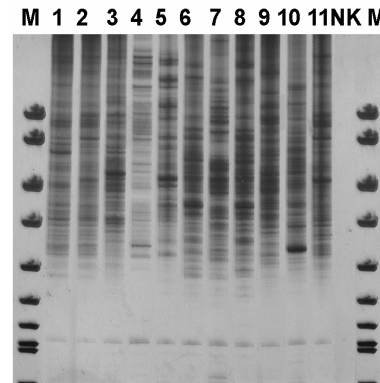
In dem Durchgang F wurden 4 *Yersinia* spp.- Isolate mittels PFGE- Methode typisiert. Dabei handelte es sich um 4 *Y. enterocolitica*- Stämme (*yopT*⁺), die mittels ITC- Anreicherungsverfahren isoliert wurden. Die Ähnlichkeit der Bandenmustern dieser Isolate mit denen des *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm betrug 90,8%. Innerhalb der *Yersinia* spp.- Isolate betrug die Ähnlichkeit der Bandenmustern 99,9%. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster innerhalb der *Y. enterocolitica*- Stämme betrug 84,11%. Die Homologie zwischen den *Y. enterocolitica*- Stämmen unterschiedlicher Serotypen und den *Y. enterocolitica*- Isolaten betrug 67,2 – 73%. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster des *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833)- Stamm mit den Bandenmuster der *Y. enterocolitica*- Isolate betrug 63,9% (Abbildung 10 im Anhang).

4.3 Feintypisierung der *Yersinia* spp.- Feldstämme mittels Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

Wie bereits im Abschnitt 4.2 erwähnt wurde, wurden insgesamt 151 *Yersinia* spp.- Stämmen mittels AFLP- Methode feintypisiert. Davon waren 130 *Y. enterocolitica*- Isolate mit und 21 *Yersinia* spp.- Isolate ohne *yopT*- Gen. Als Referenzstamm wurde wie bei der PCR und PFGE der *Y. enterocolitica* DSM 13030 (4/O:3)- Stamm verwendet. Die *Y. enterocolitica*- Stämme unterschiedlicher Serotypen (4/O:3 *yopT*- negativ; O:5,27; 1A/O:7,8) und der *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833)- Stamm wurden zusätzlich mitgeführt. Neben der Genotypisierung der isolierten *Yersinia* spp.- Stämmen sollten die genotypischen Unterschiede innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* untersucht werden. Außerdem sollte die Reproduzierbarkeit der Methode mit Hilfe der Zusatzstämme festgestellt werden. Da zur Zeitpunkt der eigenen Untersuchungen keine Publikation über Genotypisierung der Yersinien mittels AFLP- Methode veröffentlicht war, wurde in Anlehnung an die Methode von DUIM et al. (1999) gearbeitet. Hierbei wurde der Restriktions- und Elektrophorese- Schritt optimiert.

4.3.1 Ergebnisse der Optimierung des Restriktionsschrittes

Für die Restriktion der chromosomalen DNS wurden die Restriktionsenzyme *Hind* III, *Hha* I, *Eco* RI und *Mse* I verwendet. Hierbei betrugen die Konzentrationen der six- cutter (*Hind* III und *Eco* RI) 40 U/μl und der four- cutter (*Hha* I und *Mse* I) 20 U/μl. Um eine optimale Fragmentmuster zu erhalten wurden die Enzyme in Kombination mit anderen Enzymen getestet. Die Abbildungen 12A bis 12D zeigen die Ergebnisse der Restriktion mit jeweiligen Enzymkombinationen.

12A (AFLP mit *Eco* RI und *Mse* I)**12B (AFLP mit *Eco* RI und *Hha* I)****12C (AFLP mit *Hind* III und *Mse* I)****12D (AFLP mit *Hind* III und *Hha* I)**

Abbildungen 12A bis 12D: AFLP- Typisierung der *Yersinia* spp.- Stämme mit den Restriktionsenzymen *Hind* III, *Hha* I, *Eco* RI und *Mse* I. Jeweils links und rechts sind die DNS-Längenmarker (M) aufgetragen. in Spur 1 ist *Y. enterocolitica* 4/O:3 (Tier- Isolat, ohne *yopT*- Gen), in Spur 2 *Y. enterocolitica* 4/O:3 (Human- Isolat, mit *yopT*- Gen), in Spur 3 *Y. enterocolitica* 1A/O:41,43 (Tier- Isolat, ohne *yopT*- Gen), in Spur 4 *Y. enterocolitica* O:5,27, in Spur 5 *Y. enterocolitica* 1A/O:7,8, in Spur 6 *Y. pseudotuberculosis* (Tier- Isolat), in Spur 7 *Y. kristensenii* (ATCC 33638), in Spur 8 *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833), in Spur 9 *Y. aldovae* (ATCC 35236), in Spur 10 *Y. frederiksenii* (ATCC 33641), in Spur 11 *Y. enterocolitica* 4/O:3 (DSM 13030). Die negativ- Kontrolle wurde mit NK vermerkt.

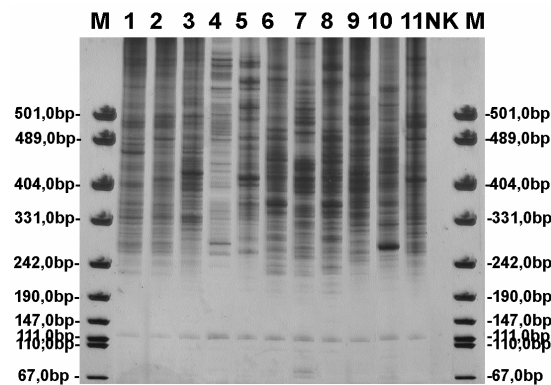
Für die Durchführung der AFLP- Untersuchung wurde die Enzymkombination *Hind* III und *Hha* I verwendet. Die Elektrophorese der *Yersinia* spp.- Isolate mit anderen Enzymkombinationen führte zu keinen Ergebnisse.

4.3.2 Ergebnisse der Polyacrylamid- Gelelektrophorese- Optimierung

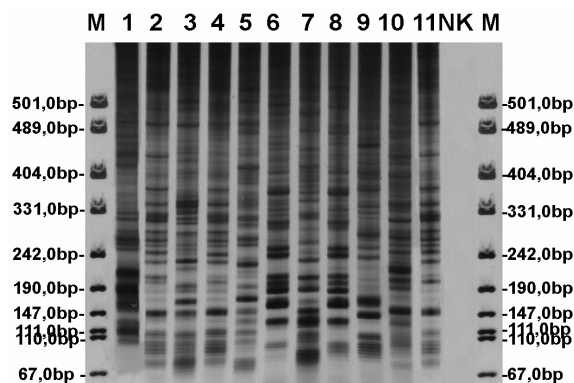
Die Polyacrylamid- Gelelektrophorese wurde bei verschiedenen Laufzeiten durchgeführt, um eine optimale Trennung und Auflösung der Banden zu erzielen. Dabei wurden zwei verschiedene Laufzeiten (60min / 300V, 25mA und 9W bzw. 80min / 600V, 50mA und 30W) für die Elektrophorese ausgewählt. Die Abbildungen 13A und 13B zeigen die Ergebnisse der Gelelektrophorese bei

Laufzeiten. Die Konzentration der Polyacrylamid- Gel betrug für beide Laufzeiten 12,5%.

13A (Polyacrylamid- Gelelektrophorese mit einer Laufzeit von 60min / 300V, 25mA und 9W)



13B (Polyacrylamid- Gelelektrophorese mit einer Laufzeit von 80min / 600V, 50mA und 30W)



Abbildungen 13A und 13B: AFLP- Typisierung der *Yersinia* spp.- Stämme mit den Restriktionsenzymen *Hind* III, *Hha* I bei verschiedene Laufzeiten. Jeweils am Anfang und Ende des Gels sind die DNS-Längenmarker (M), in Spur 1 *Y. enterocolitica* 4/O:3 (Tier- Isolat, ohne *yopT*- Gen), in Spur 2 *Y. enterocolitica* 4/O:3 (Human- Isolat, mit *yopT*- Gen), in Spur 3 *Y. enterocolitica* 1A/O:41,43 (Tier- Isolat, ohne *yopT*- Gen), in Spur 4 *Y. enterocolitica* O:5,27, in Spur 5 *Y. enterocolitica* 1A/O:7,8, in Spur 6 *Y. pseudotuberculosis* (Tier- Isolat), in Spur 7 *Y. kristensenii* (ATCC 33638), in Spur 8 *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833), in Spur 9 *Y. aldovae* (ATCC 35236), in Spur 10 *Y. frederiksenii* (ATCC 33641), in Spur 11 *Y. enterocolitica* 4/O:3 (DSM 13030) und in Spur NK die negativ- Kontrolle.

Die Abbildungen 13A und 13B zeigen, dass die Auflösung und Trennung der Banden mit einer Laufzeit von 80 min. bei gegebenen Bedingungen deutlicher war. Nach der Gelelektrophorese der behandelten *Yersinia* spp.- Stämme mit den Restriktionsenzyme *Hind* III und *Hha* I konnten ca. 45 – 50 Banden im Beriech von 67,0 – 570bp detektiert werden.

4.3.3 AFLP- Typisierung

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu prüfen wurden, wie bei der PFGE-Methode, fünf Referenz- Stämme (*Y. enterocolitica* DSM 13030; *Y. enterocolitica* 4/O:3 yopT- negativ; *Y. enterocolitica* O:5,27; *Y. enterocolitica* 1A/O:7,8 und *Y. pseudotuberculosis* ATCC 29833) und fünf Feldstämme zehnmal nacheinander geprüft. Es konnten von Gel zu Gel eine Variationen bis zu 1,1% beobachtet werden. Nach der Normalisierung der Gele wurden die Bandenmuster der mitgeführten Stämme miteinander verglichen. Hierbei konnten Bandenmuster mit einer 90- bis 100-prozentigen Homogenität beobachtet werden. Bei den folgenden Untersuchungen wurden Isolate, die eine Ähnlichkeit (cut- off) ≥ 90 % zeigten, als genetisch eng miteinander verwandt (klonal) angesehen.

4.3.3.1 Genotypisierung der Referenzstämme

Hierbei wurde der *Y. enterocolitica* DSM 13030 als Kontrollstamm und fünf weitere Referenzstämme mittels AFLP- Methode typisiert. Ziel der Genotypisierung war die verwandtschaftlichen Verhältnisse der Referenz- Stämme untereinander zu untersuchen. Das Ergebnis der AFLP- Typisierung der Referenz- Stämme wurde in Dendrogramm dargestellt (Abbildung 14).

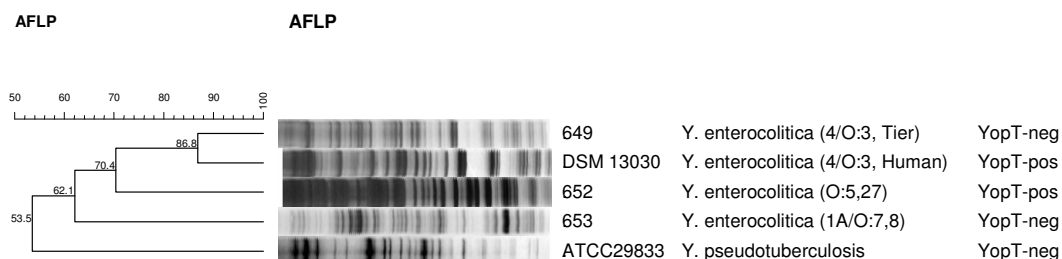


Abbildung 14: AFLP- Typisierung der Referenzstämme. Die prozentuale Ähnlichkeit der Bandenmuster wurde mit dem kurvenbasierenden Pearson- Korrelations- Koeffizient errechnet. Für das Erstellen des Dendrogramm wurde die UPGMA (unweighted Paargruppe Methode mit arithmetischen Mitteln)Methode angewendet. Es wurde ein Position Toleranz von 5.0% angewendet. Die Cut- off wurde bei 85% festgelegt.

Die AFLP- Typisierung der Referenz- Stämmen zeigte, dass innerhalb der *Y. enterocolitica*- Stämmen das Verwandtschaftsverhältnis 62,1% betrug. Die Bandenmuster der *Y. enterocolitica*- Stämmen und des *Y. pseudotuberculosis*- Stammes waren zur 53,5% identisch. Die Homologie zwischen *Y.*

enterocolitica- (DSM 13030 4/O:3, Humanisolat) und *Y. enterocolitica*- (4/O:3, tierische Herkunft) betrug 86,8%. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster der *Y. enterocolitica*- Serotypen 1A/O:7,8 und O:5,27 lag zwischen 62,1 – 70,4%.

4.3.3.2 Genotypisierung der isolierten *Yersinia* spp.- Stämme

Nach der Restriktion mit den Enzymen *Hind* III und *Hha* I folgten zwei PCR-Schritte (modifizierte Methode nach DUIM et al., 1999). Durch die Elektrophorese der *Y. enterocolitica*- Amplifikate konnten 45 Banden im Bereich von 70,0 – 520bp detektiert werden. Die charakteristischen Banden für *Y. enterocolitica* DSM 13030 lagen bei 520, 497, 489, 420, 360, 310, 200, 147, 92 und 70 bp. Auf jedem Gel wurde der Referenzstamm *Y. enterocolitica* DSM 13030 und eine Negativ- Kontrolle aufgetragen. Die Ergebnisse der AFLP-Typisierungen wurden in Dendrogrammen dargestellt. Nach der Normalisierung der Gele und dem anschließenden Vergleich der Banden miteinander konnten Bandenmuster mit einer Homologie von 90% bis 99,8% beobachtet werden. Bei den folgenden Untersuchungen wurden Isolate deren Bandenmuster mehr als 90% Ähnlichkeit zeigten, als genetisch identische (Homologe) Stämme bezeichnet. Wie bei der PFGE- Typisierung wurden 130 *Y. enterocolitica*- Isolate mit *yopT*- Gen und 21 *Y. enterocolitica*- Isolate ohne *yopT*- Gen für die Feintypisierung mittels AFLP ausgewählt. Die Isolate waren in 5 Durchgänge (Tage nach der Infektion) unterteilt. Zusätzlich zum *Y. enterocolitica* DSM 13030 (4/O:3) als Kontrollstamm wurden drei *Y. enterocolitica*- Stämme unterschiedlicher Serotypen (4/O:3 *yopT*- negativ; O:5,27; 1A/O:7,8) und ein *Y. pseudotuberculosis*- Stamm (ATCC 29833) bei der Typisierung der Isolate in jedem Durchgang mitgeführt. Die Ergebnisse der Feintypisierungen wurden als Dendrogramm dargestellt. Die Abbildungen 15 – 20 im Anhang dieser Arbeit zeigen die Ergebnisse der AFLP- Typisierung der Isolate in jedem Durchgang. Zum Einteilen der typisierten Isolate wurde der cut-off- Wert aufgrund der Variationen zwischen Gele bei 90% festgelegt. Isolate die eine Ähnlichkeit $\geq 90\%$ aufwiesen, wurden als genetisch engverwandte Stämme (klonal) angesehen.

4.3.3.2.1 AFLP- Typisierung der Isolate im Durchgang B (2. Tag post infectionem)

79 *Yersinia* spp.- Isolate wurden mittels AFLP- Methode typisiert und verglichen. Davon waren 72 Stämme *Y. enterocolitica* (*yopT*⁺) und 7 Stämme *Y. enterocolitica* (*yopT*⁻). Innerhalb der Isolierten *Yersinia* spp.- Stämme betrug die Ähnlichkeit der Bandenmustern 90,3%. Die Homologie zwischen den Bandenmustern der *Yersinia* spp.- Isolaten (*yopT*⁺) und des *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm betrug 91,5%. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster zwischen den *Y. enterocolitica*- Stämmen (*yopT*⁻) und *Y. enterocolitica*- (DSM 13030) betrug 90,1%. Die Bandenmuster der *Yersinia* spp.- Isolate (*yopT*⁻) und *Y. enterocolitica* 4/O:3 (tierische Herkunft) waren zur 89,76% ähnlich. Innerhalb der *Y. enterocolitica* 4/O:3- Gruppe herrschte eine Ähnlichkeit von 89,5%. Die *Y. enterocolitica*- Stämme unterschiedlicher Serotypen (1A/O:7,8 und O:5,27) wiesen eine Ähnlichkeit von 59,2 bzw. 71,8% zu den *Yersinia* spp.- Isolaten auf. Zwischen den *Y. enterocolitica*- Stämmen und *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833)- Stamm gab es eine Homologie von 49,9% (Abbildung 15 im Anhang).

4.3.3.2.2 AFLP- Typisierung der Isolate im Durchgang C (4. Tag post infectionem)

In diesem Durchgang wurden insgesamt 28 *Yersinia* spp.- Isolate typisiert. 18 Isolate waren *Y. enterocolitica* (*yopT*⁺) und 10 Isolate *Y. enterocolitica* (*yopT*⁻). Die Ähnlichkeit der Bandenmuster der *Yersinia* spp.- Isolaten zueinander betrug 92,71%. Zwischen den *Yersinia* spp.- Isolaten (*yopT*⁻) und *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm betrug die Ähnlichkeit der Bandenmustern 91,3% und zwischen den *Y. enterocolitica*- Stämmen (*yopT*⁺) und *Y. enterocolitica*- (DSM 13030) 93,7%. Die *Y. enterocolitica*- Stämme unterschiedlicher Serotypen (1A/O:7,8 und O:5,27) wiesen eine Ähnlichkeit von 59,1 bzw. 68,0% zu den *Yersinia* spp.- Isolaten auf. Innerhalb der *Y. enterocolitica* 4/O:3- Gruppe herrschte eine Ähnlichkeit von 89,5%. Die Bandenmuster der *Yersinia* spp.- Isolate (*yopT*⁻) und *Y. enterocolitica* 4/O:3 (tierische Herkunft) waren zur 84,85% ähnlich. Die Homologie zwischen den *Y. enterocolitica*- Stämmen und *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833)- Stamm betrug 50,7% (Abbildung 16 im Anhang).

4.3.3.2.3 AFLP- Typisierung der Isolate im Durchgang D (6. Tag post infectionem)

In dem Durchgang D wurden insgesamt 18 *Yersinia* spp.- Isolate genotypisch untersucht. Davon wurden mittels PCR-Untersuchungen 17 Isolate als *Y. enterocolitica* (*yopT*⁺) und ein Isolat als *Y. enterocolitica* (*yopT*⁻) identifiziert. Die Bandenmustern der *Yersinia* spp.- Isolate (*yopT*⁺) und des *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm waren zu 92,3% identisch. Die *Yersinia* spp.- Isolate waren zu 90,6% miteinander verwandt. Die Bandenmuster von *Y. enterocolitica*- Stamm (*yopT*⁻) und des *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm waren zu 94,7% identisch. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster zwischen den *Y. enterocolitica*- Stämmen (*yopT*⁻) und *Y. enterocolitica* 4/O:3 (tierische Herkunft) betrug 86,4%. Die *Y. enterocolitica*- Stämme unterschiedlicher Serotypen (1A/O:7,8 und O:5,27) wiesen eine Ähnlichkeit von 58,3 bzw. 68,8% zu den *Yersinia* spp.- Isolate auf. Innerhalb der *Y. enterocolitica* 4/O:3- Gruppe herrschte eine Ähnlichkeit von 84,5%. Die Verwandtschaftsverhältnis zwischen den *Y. enterocolitica*- Stämmen und *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833)- Stamm betrug 49,3% (Abbildung 17 im Anhang).

4.3.3.2.4 AFLP- Typisierung der Isolate im Durchgang E (8. Tag post infectionem)

Von 22 *Yersinia* spp.- Isolate, die in diesem Durchgang typisiert wurden, waren 18 Isolate *Y. enterocolitica* (*yopT*⁺) und 4 Isolate *Y. enterocolitica* (*yopT*⁻). Zwischen den Bandenmuster der *Yersinia* spp.- Isolate gab es eine Ähnlichkeit von 91,42%. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster den *Y. enterocolitica*- Stämmen (*yopT*⁺) und *Y. enterocolitica*- (DSM 13030) betrug 94,34% und zwischen den *Y. enterocolitica*- Stämmen (*yopT*⁻) und *Y. enterocolitica*- (DSM 13030) gab es eine Homologie von 90,77%. Die Bandenmuster der *Y. enterocolitica*- Stämme (*yopT*⁻) und des *Y. enterocolitica* 4/O:3 (tierische Herkunft) waren zu 84,7% identisch. Innerhalb der *Y. enterocolitica* Serogruppe 4/O:3 konnte eine Ähnlichkeit 82,6% festgestellt werden. Die Bandenmuster der *Y. enterocolitica*- Stämme unterschiedlicher Serotypen (1A/O:7,8 und O:5,27) zeigten eine Ähnlichkeit von 59,4% bzw. 72,2% zu der *Y. enterocolitica* Serogruppe 4/O:3.

Die Ähnlichkeit der Bandenmuster von *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833)-Stamm und der *Y. spp.*- Isolate betrug 48,8% (Abbildung 18 im Anhang).

4.3.3.2.5 AFLP- Typisierung der Isolate im Durchgang F (10. Tag post infectionem)

In diesem Durchgang F wurden 4 *Yersinia spp.*- Isolate AFLP- typisiert. Alle 4 Isolate waren *Y. enterocolitica*- Stämme (*yopT*⁺). Die Bandenmustern dieser Isolaten zeigten eine Ähnlichkeit von 92,2% zu dem *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm. Zwischen den *Yersinia spp.*- Isolate gab es eine Ähnlichkeit von 92,38%. Die Homologie der Bandenmuster innerhalb der *Y. enterocolitica* Serogruppe 4/O:3 betrug 89,2%. Die Bandenmuster der *Y. enterocolitica*- Stämme unterschiedlicher Serotypen (1A/O:7,8 und O:5,27) weisen eine Ähnlichkeit von 61,8% bzw. 70,7% zu der *Y. enterocolitica* Serogruppe 4/O:3 auf. Zwischen den Bandenmuster von *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833)- und *Y. enterocolitica*- Stämme gab es eine Ähnlichkeit von 51,6% (Abbildung 19 im Anhang).

5 Diskussion

60 Masthähnchen wurden in einem Zeitraum von 28 Tagen auf das Vorhandensein von *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in deren Kot untersucht. Kot wurde untersucht, weil *Y. enterocolitica* am häufigsten in Tonsillen und Kot latent infizierter Tiere nachgewiesen werden kann (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990) und die Übertragung bei gemeinsamer Aufstallung überwiegend durch erregerhaltigen Kot und über die damit kontaminierte Umwelt erfolgt. 30 Tiere wurden als Negativ- Kontrolle (unbehandelt) geführt und 30 Tiere wurden mit *Yersinia enterocolitica* DSM 13030 (4/O:3) oral infiziert. Jedem zweiten Versuchstag wurden Kot- Tupferproben von den Tieren genommen. Die Isolierung der verdächtigen Kolonien erfolgte sowohl durch Direktausstrich auf CIN- Agar als auch durch selektive Anreicherung im ITC- und PBS- Bouillon mit anschließendem Ausstrich auf CIN- Agar. Die Verdächtige Kolonien wurden nach der Kultivierung auf TSA- Agar biochemisch untersucht.

5.1 Multiplex- PCR (MPCR)

Insgesamt wurden 747 verdächtige *Y. enterocolitica*- Feldstämme aus 15 Durchgänge (A bis O) neben der biochemischen Differenzierung ebenfalls mittels PCR- Verfahren spezifiziert. Hierbei wurde das Genus (Yersinien), die Spezies (*Y. enterocolitica*) und die Pathogenität (*yopT*- Gen) der Feldstämme mittels Multiplex- PCR- Verfahren bestimmt. Mit Hilfe der PCR- Verfahren sollten die Ergebnisse der biochemischen Differenzierung bestätigt und ggf. korrigiert werden.

5.1.1 Optimierung der PCR- Methode

Die *Y. enterocolitica*- Stämme wurden zunächst aus der -80°C Stamm-Sammlung auf Blutagar ausgerollt und 18 – 24h bei +28°C aerob bebrütet. Der Grund für die Bebrütung der Nährmedien bzw. BHI- Bouillon bei einer Temperatur von +28°C lag darin, dass manchmal nach der Bebrütung der Nährmedien bei +30°C kein *yopT*- Gen mittels PCR detektiert werden konnte. Aus diesem Grund wurde die Bebrütungstemperatur von +30°C auf +28°C

reduziert, um den Verlust des Plasmid zu verhindern. Einige Autoren konnten dasselbe Phänomen beobachten (CORNELIS et al., 1987; KAY et al., 1982; HEESEMANN et al., 1983; PORTNOY et al., 1981; IBRAHIM et al., 1992; BHADURI und COTTRELL, 1997; LI et al., 1998; LAMBERTZ et al., 2000). Sie beschrieben, dass das Plasmid bei der *in vitro*- Vermehrung leicht verloren gehen kann, wenn die Inkubation bei Temperaturen $\geq +30^{\circ}\text{C}$ erfolgt. Andere Autoren hingegen berichteten, dass sogar nach der Bebrütung der Nährmedien bei $+25^{\circ}\text{C}$ das Plasmid detektiert werden konnte (SCHIEMANN et al., 1992). Aufgrund des positiven Nachweises von *yopT*- Gen bei $+28^{\circ}\text{C}$ wurde jedoch keine niedrigere Bebrütungstemperatur gewählt.

Für die Multiplex- PCR wurde eine Annealing- Temperatur von $+55,5^{\circ}\text{C}$ ausgewählt, da alle drei Primer (Y, YE und *yopT*) bei dieser Temperatur ein deutliches Signal zeigten (Abbildung 1A – 1C). Während bei Y- und *yopT*- Primer die Annealing- Temperatur zwischen $+51,4^{\circ}\text{C}$ und $+55,5^{\circ}\text{C}$ schwankte, lag die optimale Temperatur für YE- Primer bei $55,5^{\circ}\text{C}$. Bei alle drei Primer war bei höheren Annealing- Temperaturen als $+60,8^{\circ}\text{C}$ kein Signal mehr zu detektieren. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu ARNOLD et al. (2001), die berichteten, dass die one- step- PCR mit *yopT*- Primer bei einer Annealing- Temperatur von $+43,0^{\circ}\text{C}$ ein deutliches Signal zeigte (Abbildung 1C).

5.1.2 Ergebnisse der Multiplex- PCR- Untersuchungen

Die PCR- Ergebnisse zeigten, dass 596 (79,8%) Isolate als *Yersinia*- negativ, 130 (17,4%) Isolate als *Y. enterocolitica* (*yopT*⁺) und 21 (2,8%) Isolate als *Y. enterocolitica* (*yopT*⁻) identifiziert werden konnten. Die meisten *Y. enterocolitica*- positive Stämme wurden in den Durchgänge B (2. Tag post infectionem) bis F (10. Tag post infectionem) nachgewiesen. Ab dem Durchgang G (12. Tag post infectionem) wurde keine *Yersinia* spp.- Stämme identifiziert. Diese Ergebnisse sind vermutlich auf das Vorgehen bei der Reinigung der DNS zurück zu führen. Wie von NAKAJIMA et al. (1994) und WREN et al. (1990) beschrieben, besitzt *Yersinia enterocolitica* eine hitzebeständige DNase, die die Ursache für die beobachtete Verminderung der PCR- Produkte sein kann. Daher wurden in den eigenen Untersuchungen die Proben mit der Proteinase K behandelt, um möglichen thermophilen DNase- Aktivität schon während der DNS-

Vorbereitung zu verhindern. Insgesamt standen 6 Primerpaare (*Y*, *YE*, *yopT*, *ail*, *virF*, *inv*) für die PCR zur Verfügung. Mittels Multiplex-PCR mit den Primerpaaren (*Y*, *YE* und *yopT*) wurden die Gattung, Spezies und Pathogenität (*yopT*-Gen) der *Yersinia* spp.-Stämme ermittelt. NILSSON et al. (1988) und NAKAJIMA et al. (1992) berichteten von einer erfolgreichen Multiplex-PCR mit den Primerpaaren (*inv*, *virF* und *ail*). LAMBERTZ et al. (2005) beschrieben, dass sie eine Multiplex-PCR Methode mit vier Primerpaare (*inv*, *virF*, *ail* und *rfbC*) erfolgreich durchführen konnten. Diese Beobachtungen konnten in eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Aufgrund des Auftretens von sog. Mismatches, d.h. unspezifischer Banden und falsch negativer Ergebnisse wurde auf die Multiplex-PCR-Untersuchung der Stämme mit den Primerpaaren *ail*, *virF* und *inv* in den eigenen Untersuchungen verzichtet.

130 Stämme wurden eindeutig als *Yersinia* spp. mit *yopT*-Gen identifiziert. Eine große Anzahl von 596 isolierten Stämmen waren *Yersinia* spp.-negativ. Diese Resultate sind als ein Hinweis auf die geringe Selektivitätsstärke der verwendeten Nährmedien für die Isolierung von verdächtigen *Yersinia* spp.-Stämmen sein. 21 der untersuchten Stämme wurden als *Yersinia* spp.-positiv aber ohne *yopT*-Gen identifiziert. Eine Vermutung für das Auftreten dieses Phänomens könnte das Vorkommen des pYV-Plasmids sein, das offenbar während der Isolation unter verschiedenen Stressfaktoren u. a. Temperatur-Änderung verloren gehen kann. CORNELIS et al. (1987), KAY et al. (1982) und HEESEMANN et al. (1983) konnten denselben Phänomen in ihren Untersuchungen feststellen. Einige Autoren berichteten in ihren Arbeit vom Auftreten sog. falsch negativer Yersinien, die mittels PCR erkannt wurden, obwohl die biochemischen Untersuchungen diese Stämme als *Yersinia*-positiv erkannten (JOHANNESSEN et al., 2000; LANTZ et al., 1999; ROSSEN et al., 1992). Die Autoren konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass die hohe Konzentration der zu isolierenden Stämme eine inhibitorische Wirkung auf der PCR-Reaktion ausüben kann. Diese Fehlerquelle konnte bei den eigenen Untersuchungen aufgrund der Übereinstimmung der biochemischen Ergebnisse mit den PCR-Ergebnisse ausgeschlossen werden. Ein interessanter Aspekt bei der Durchführung der Multiplex-PCR war die Abgrenzung des *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833)-Stammes von den übrigen *Yersinia* spp.-

Stämmen. NAKAJIMA et al. (1992), HOLMSTRÖM et al. (1995) und NISKANEN et al. (2003) zeigten in ihren Untersuchungen, dass der pathogene Stamm *Y. pseudotuberculosis* sowohl die Gene für die chromosomal- kodierten Virulenzfaktor wie z.B. *inv*- Gen als auch die Plasmid- kodierten Virulenzfaktor *virF*- Gen besitzt. Desweiteren besitzt *Y. pseudotuberculosis* die *yop*- Gene, die für die Kodierung verschiedenen Proteine zuständig sind. Aufgrund des fehlenden *yopT*- Gens bei *Y. pseudotuberculosis*, konnte dieser Stamm aber in den eigenen Untersuchungen durch die Anwendung des spezifischen *Y. enterocolitica*- Primer für die *yopT*- Gene ausgeschlossen werden.

5.2 Genotypisierung ausgewählter *Yersinia* spp.- Isolate mittels PFGE

insgesamt 130 *Yersinia* spp. (*yopT*⁺)- Isolate und 21 *Yersinia* spp. (*yopT*⁻)- Isolate wurden für die Feintypisierung mittels der PFGE- Methode ausgewählt. Als Referenzstamm wurde wie bei den PCR- Untersuchungen der Stamm *Y. enterocolitica* (DSM 13030, 4/O:3) benutzt. Zusätzlich wurden drei *Y. enterocolitica*- Stämme unterschiedlicher Bioserotypen (4/O:3 *yopT*- negativ; O:5,27; 1A/O:7,8) und *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833) mitgeführt, um die genotypische Unterschiede zwischen den Referenzstämmen sowie die Unterschiede innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* zu untersuchen. Vorher wurde die PFGE- Typisierung optimiert. Dabei standen zwei Aspekten für die Optimierung der Methode im Vordergrund: Zu einem musste für die Restriktion der chromosomalen DNS ein geeignetes Enzym ausgewählt werden und zum anderem musste eine optimale Puls- und Laufzeit ermittelt werden.

5.2.1 Optimierung des Restriktion- Schrittes

Für die Optimierung des Restriktionsschrittes wurde die chromosomalen DNS mit den Restriktionsenzymen *Xba* I, *Eco* RI und *Not* I geschnitten. Bei der Restriktion der chromosomalen DNS mit *Eco* RI entstanden sehr kleine Fragmente im Bereich von 4,4 – 48,5 Kb, die sehr dicht nebeneinander lagen. Die Feindifferenzierung der Fragmente und die Auswertung der Bandenmuster waren somit nicht möglich.

Desweiteren wurden die chromosomalen DNS mit der Endonuclease *Xba* I verdaut. Hierbei konnten die Fragmente im Bereich 18 – 194 detektiert werden. Aufgrund der teilweise schlechten Auftrennung der Fragmente wurde auf die Anwendung dieses Restriktionsenzymes verzichtet. Auch SAKEN et al. (1994) berichteten, dass bei der Restriktion der DNA mit dem Enzym *Xba* I sehr viele Fragmente in den selben Größenordnung entstehen, die die Auswertung der Bandenmuster erschweren. Durch den Vergleich der Bandenmuster der mit *Not* I und *Xba* I verdauten DNS- Isolate konnte festgestellt werden, dass das Enzym *Not* I aufgrund der höheren Anzahl der entstandenen Banden und deren Auftrennung besser geeignet war. FREDRIKSSON- AHOMAA et al. (1999) beschrieben, dass im Rahmen einer Pilotstudie 35 verschiedene Enzyme auf ihre Brauchbarkeit für die Typisierung von *Y. enterocolitica* geprüft wurden. Die besten Ergebnisse konnten durch die Enzyme *Not* I, *Apa* I und *Xho* I erzielt werden. Auch andere Autoren berichteten von einer erfolgreichen Typisierung durch die Anwendung des Restriktionsenzymes *Not* I (ITMAN et al., 1991; BUCHRIESER et al., 1994b; SAKEN et al., 1994; ASPLUND et al., 1998; NISKANEN et al., 2003). In den eigenen Untersuchungen wurde die Menge des Enzymes optimiert. Von den zur Restriktion eingesetzten Enzymmengen (5, 10, 15 und 20 Units) konnte mit einer Menge von 20 Units das beste Resultat erzielt werden. Bei dem Einsatz der Enzymkonzentrationen von verschiedenen Autoren (SAKEN et al., 1994; NAJDENSKI et al., 1994; ASPLUND et al., 1998; LAMBERTZ et al., 2005) wurde deutlich, dass die Menge nicht ausreichend für die Restriktion der chromosomalen DNS war. Folglich entstand eine Anhäufung der nicht verdauten DNS am Anfang des Gels.

5.2.2 Optimierung des Elektrophorese- Schrittes

In einem weiteren Schritt der Methoden- Optimierung wurde die Pulsfeldgelelektrophorese mit dem Restriktionsenzym *Not* I bei verschiedenen Gelkonzentrationen, Puls- und Laufzeiten durchgeführt, um eine optimale Trennung und Auflösung der Banden zu erzielen. Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen (0,8%, 1,0%, 1,1%, und 1,3%) des Agarose-Gels hergestellt um den Ablauf der Elektrophorese zu optimieren. NAJDENSKI

et al. (1994) berichteten, dass sie für ihre PFGE- Untersuchungen ein 0,8% Agarosegel mit einer Laufzeit von 65 Stunden verwendeten. Diese Angaben konnten in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden, denn mit 1,3% Agarose- Gel war die Trennung am schlechtesten, da die Fragmente zu dicht bis zur Mitte des Gels gelaufen waren und somit keine auswertbaren Ergebnisse erzielt werden konnten. Die eigenen Ergebnisse zeigten weiterhin, dass das 1,0 – 1,1% - Agarose Gel aufgrund stärkerer Auftrennung der Fragmente am besten geeignet war. Dies konnte durch den Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren bestätigt werden (ITMAN et al., 1991; BUCHRIESER et al., 1994a; SAKEN et al., 1994; ASPLUND et al., 1998; FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 1999; NISKANEN et al., 2003; LAMBERTZ et al., 2005). Außerdem wurden für die eigenen Untersuchungen zwei verschiedene Lauf- und Pulszeiten (18h / 1,5sec-50sec bzw. 20h / 1sec-18sec) für die Elektrophorese ausgewählt.

Die Abbildungen 4A und 4B zeigen, dass die Auflösung und die Trennung der Fragmente mit einer Laufzeit von 20 Stunden und einer Pulszeit von 1sec-18sec bei einer Gelkonzentration von 1,1% am stärksten war. Der Vergleich dieser Versuchsordnung mit der von FREDRIKSSON- AHOMAA et al. (1999) und NISKANEN et al. (2003) beschriebenen Methode bestätigte die Wahl dieser Zeit/Puls- Kombination. Im Gegensatz zu der von ITMAN et al. (1991) beschriebenen PFGE- Methode konnte bei der Durchführung der Elektrophorese mit der Lauf- und Pulszeit von 18h / 1,5sec-50sec keine auswertbare Ergebnisse erzielt werden. Hierbei waren die Auftrennung und Auflösung der Fragmente sehr gering, sodass eine Auswertung der Gele nicht möglich war. Daher wurde für weitere Untersuchungen einer Laufzeit von 20 Stunden und einer Pulszeit von 1sec-18sec bei 200V und +10°C angewendet.

5.2.3 Reproduzierbarkeit der PFGE- Methode

Um die Reproduzierbarkeit der PFGE- Methode zu testen wurden 10 Stämme, davon fünf Referenzstämme und fünf Feldstämme mehrmals an verschiedenen Tagen typisiert. Dabei zeigte sich, dass die Stämme jedes Mal die gleiche Fingerprints zeigten. Nur aufgrund der unterschiedlichen Dicken der gegossenen Gele gab es minimale Unterschiede zwischen den Gelen. So liefen

einige Fragmente bei manchen Gelen länger als andere. Ansonsten waren die Bandenmuster der Stämme auf jedem Gel gleich. Diese Ergebnisse zeigten, dass die PFGE- Methode gut reproduzierbar war. Die eigenen Untersuchungen zeigten eine Ähnlichkeit von mehr als 92% zwischen den Bandenmuster der Isolate innerhalb des Geles und ca. 90% zwischen den Gelen. Auch andere Autoren wie ITEMAN et al. (1996) und LUCIER et al. (1992) bestätigten in ihren Untersuchungen die Reproduzierbarkeit der PFGE- Methode mit isolierter chromosomaler DNS von *Yersinia* spp.- Stämmen. Hierbei konnten sie in ihrer Untersuchungen nach mehrmaligem Auftragen und Vergleichen der Gele eine Bandenmusterähnlichkeit von mehr als 90% zwischen den Gelen feststellen. Auch BORSCH et al. (1991), BUCHRIESER et al. (1993) und ROCOURT (1994) konnten bei der Typisierung von *L. monocytogenes* mittels PFGE- Methode ähnliche Befunde für die Reproduzierbarkeit der PFGE- Methode bestätigen.

5.2.4 PFGE- Typisierung der Referenzstämme

Die Ergebnisse der Feintypisierung von Referenzstämmen zeigten, dass es mittels PFGE- Methode möglich war, innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* die Bioserotypen voneinander zu unterscheiden (Abbildung 5). Hierbei konnte festgestellt werden, dass das Profil der Bandenmuster von *Y. enterocolitica* Stämmen des Bioserovars 4/O:3 sich zu 87% ähnelte. Auch BUCHRIESER et al. (1994a) und FREDRIKSSON- AHOMAA et al. (1999) zeigten in ihren Untersuchungen, dass Pulstypen desselben Bioserovars sehr ähnliche Bandenmuster aufweisen, was auf eine enge Verwandtschaft dieser Stämme schließen lässt. Darüber hinaus beschrieben FREDRIKSSON- AHOMAA et al. (1999) das Vorkommen verschiedener Pulstypen des Serotyps O:3, der aus Schweinezungen isoliert worden war. Es konnte 15 verschiedene Pulstypen festgestellt werden, die eine große Ähnlichkeit untereinander aufwiesen, wobei einige Klone vorherrschten. Auch NAJDENSKI et al. (1994), BUCHRIESER et al. (1994) und SAKEN et al. (1994) zeigten in ihrer Arbeit, dass die isolierten *Y. enterocolitica*- Stämmen mit dem Serotyp O:3 ein ähnliches PFGE- Profil aufwiesen. Außerdem zeigten NAJDENSKI et al. (1994, 1995) in ihren Untersuchungen, dass der Pulstyp viel mehr mit Biotyp als mit Serotyp

assoziiert. Bei dem visuellen Vergleich der Bandenmuster von untersuchten *Yersinia* spp.- Stämmen konnte ein Fragment in der Größenordnung von 40 – 45kb beobachtet werden, das auffallend nur bei plasmidtragenden Stämmen detektiert werden konnte. Dieses Fragment konnte auch bei anderen pathogenen Yersinien- Stämme (*Y. enterocolitica* O:5,27 und *Y. pseudotuberculosis* ATCC 29833) nachgewiesen werden. Der Vergleich der Ergebnisse mit denen aus der Literatur bestätigte die Annahme, dass dieses Fragment dem Virulenzplasmid pYV zu zuordnen ist.

BUCHRIESER et al. (1994) berichteten, dass sie bei der visuelle Betrachtung der Bandenmuster von pathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen und apathogenen Stämmen eine auffallenden Bande mit einer Größe von ca. 45kb identifizieren konnten, die bei apathogenen Stämmen fehlte. Auch FREDRIKSSON- AHOMAA et al. (1999) bestätigten in ihren Untersuchungen diesen Befund. NAJDENSKI et al. (1994) konnten auch in ihren Untersuchungen diesen Befund bestätigen. Hierbei wurde das Plasmid mit dem Enzym *Not* I verdaut und anschließend mit einer digoxigeninmarkierten pYV- Sonde (spezifisch für *yadA*- Gen) hybridisiert. Dabei konnten drei Fragmente detektiert werden, wobei das stärkere bei einer Größe von etwa 48kb ein Signal zeigte.

5.2.5 Ergebnisse der PFGE- Typisierungen

Alle *Yersinia* spp.- Stämme, die aus Proben stammten, die an verschiedenen Tagen nach der oralen Infektion der Masthähnchen isoliert wurden, wiesen eine enge genetische Verwandtschaft zum *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm (91,7 – 100%) auf und wurden aus diesem Grund als ein Fingerprint- Typ bezeichnet. Innerhalb der Serogruppe 4/O:3 konnte ein Ähnlichkeitsprofil von 85,3% festgestellt werden. BUCHRIESER et al. (1994) konnten in ihrer Arbeit feststellen, dass alle isolierte O:3 Stämme eine Ähnlichkeit von 86 – 99% aufwiesen. Die andere *Y. enterocolitica*- Serotypen (1A/O:7,8 und O:5,27) zeigten lediglich eine Ähnlichkeit von 69,3 – 74%. Interessant war, dass die beide pathogene *Y. enterocolitica*- Stämme (DSM 13030 und O:5,27) unterschiedliche Bandmuster zeigten, obwohl sie das Virulenzplasmid pYV mit sich tragen. Sie konnten trotz dieses Merkmals sehr gut voneinander

unterschieden werden und zeigten nur 74% Ähnlichkeit. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von SAKEN et al. (1994). Auch bei den pathogenen *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*- Referenzstämmen gab es, trotz des Vorhandenseins des Virulensplasmids pYV, eine Homologie von 65,2%, (Abbildung 11 im Anhang). TENOVER et al. (1995) beschrieben, dass genetisch unterschiedliche Isolate sich in mehr als sechs Fragmenten unterscheiden können. Diese Aussage konnte mit den vorliegenden Untersuchungen der Bandenmusterunterschiede zwischen *Y. pseudotuberculosis*- und *Y. enterocolitica*- Referenzstämmen bestätigt werden.

5.3 AFLP- Typisierung der ausgewählten *Yersinia* spp.- Isolate

Wie bei der PFGE- Untersuchungen wurden 151 *Yersinia* spp.- Isolate mittels AFLP- Methode genotypisiert. Als Referenzstamm wurde der *Y. enterocolitica* DSM 13030 (4/O:3)- Stamm benutzt. Außerdem wurden drei *Y. enterocolitica*- Stämme unterschiedlicher Bioserotypen (4/O:3 yopT- negativ; O:5,27; 1A/O:7,8) und *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833) zusätzlich mitgeführt, um die genotypische Unterschiede zwischen den Referenzstämmen und innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* zu untersuchen. Dazu sollte mit Hilfe dieser zusätzlichen Stämme die Reproduzierbarkeit der eingesetzten Methode überprüft werden.

5.3.1 Optimierung der Isolation chromosomaler DNS

Aufgrund der hohen Reinheit an chromosomalen DNS, die für den Einsatz der DNS in der AFLP- Methode erforderlich ist, musste zunächst die DNS- Isolationsschritt optimiert werden. Hierfür wurden zwei Isolationsmethoden (klassische- und kommerzielle Methode) getestet. Bei der Anwendung der klassischen DNS- Isolationsmethode (Phenol- Chloroform- Isoamylalkohol) konnte festgestellt werden, dass die Konzentration und Reinheit der isolierten DNS zu gering waren. (LEWIS, 1993). Der anfallende phenolhaltige Abfall stellte ein weiteres Problem dar. Da Phenol als toxisch und kanzerogen eingestuft ist, musste er gesondert entsorgt werden. Zudem war das "Ausschütteln" mit Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol insbesondere bei

einer größeren Probenanzahl sehr zeit- und arbeitsintensiv. Sehr zeitaufwendig war vor allem das Abnehmen des DNS- haltigen Überstandes.

Im Gegensatz zur klassischen Methode konnte es mit Hilfe einer DNS- Isolation- Kit, basierend auf Silica- Gel- Membran, sehr hohe DNS- Ausbeute (ca. 200 ng/µl) mit einer Reinheit von 1,8 erzielt werden. Für die AFLP- Untersuchungen wurde sowohl der Methode nach DESAI et al. (2001) für die AFLP von *Salmonella enterica* und der Methode nach DUIM et al. (1999) für *Campylobacter* spp. angewendet. Der Grund für den Test diese Protokolle lag daran, dass zum Zeitpunkt der eigenen Untersuchungen kein Protokoll bezüglich der AFLP- Untersuchungen von *Yersinien* bekannt war. Daher wurden beide Protokolle zunächst auf ihre Anwendbarkeit überprüft, wobei vor allem die Restriktions- und Elektrophorese- Schritte vor der eigentlichen Untersuchungen optimiert wurden.

5.3.2 Optimierung des Restriktionsschrittes

Für den Restriktionsschritt wurden die Restriktionsenzyme *Eco* RI und *Mse* I aus dem AFLP- Protokoll für *Salmonella enterica* (DESAI et al., 2001) sowie *Hind* III und *Hha* I aus dem AFLP- Protokoll für *Campylobacter* spp. (DUIM et al., 1999, 2001, 2004) verwendet. Die *Yersinia*- Stämme wurden zunächst mit jeweils einem Enzym (*Eco* RI, *Mse* I, *Hind* III oder *Hha* I) geschnitten und auf Agarose- Gel aufgetragen. Die Restriktion mit *Eco* RI bzw. *Mse* I ergab keine Ergebnisse. Die Kombination der beiden Enzyme mit andere Enzyme führte ebenfalls zu keinen Ergebnissen, da die Proben am Anfang des Agarose- Gels verblieben. Die Ursache könnte die schlecht verdaute DNS gewesen sein. Die Polyacrylamid- Gelelektrophorese zeigte ebenfalls keine Bandentrennung. Hingegen konnte die Restriktion der DNS- Proben mit *Hind* III und *Hha* I auf Agarose- Gel bestätigt werden. Hierbei zeigte die Kombination aus *Hind* III und *Hha* I das beste Resultat. Daher wurde für die weitere Untersuchungen die AFLP- Methode nach DUIM et al. (1999) für die Feintypisierung von *Yersinia* spp.- Stämmen modifiziert und etabliert, in dem die Konzentration der verwendeten Enzyme, die Ligation der spezifischen Adaptern und die PCR- Ansätze optimiert wurden.

5.3.3 Optimierung des Elektrophorese- Schrittes

DUIM et al. (1999, 2001) beschrieben, dass sie den Elektrophorese- Schritt an einem Sequenzier- Gerät mit einem 7,3% denaturierten Polyacrylamid- Sequenziergel durchgeführt hatten. Stattdessen erfolgte die Elektrophorese in der vorliegenden Arbeit mit einem horizontalen Elektrophorese- Gerät. Die Analyse von DNA- Fragmenten erfolgte elektrophoretisch in einem 12,5% Polyacrylamid- Gel. Das Sichtbarmachen der Banden auf dem Gel erfolgte mittels Silbernitratfärbung. Der Grund für die Anwendung dieser Methode lag an ihrem geringen zeitlichen und technischen Aufwand. Außerdem eignet sich dieser Methode für die Laboratorien, die für die Durchführung der Genotypisierung von Mikroorganismen kein Sequenziergerät zur Verfügung haben. GAULL (2002) und ALTER et al. (2002, 2003) bestätigten in ihren Untersuchungen die Anwendung dieser Methode.

Für die Polyacrylamid- Gelelektrophorese wurde das fertige Polyacrylamid- Gel (Excel Gel DNA, Fa. Amersham Bioscience) verwendet, da das Gel sofort einsetzbar und keine Rehydrierung im Gegensatz zur andere Polyacrylamid- Gele, wie Clean Gel DNA (Fa. Amersham Bioscience), nötig war (persönliche Mitteilung der Dr. T. Alter). Die Polyacrylamid- Gelelektrophorese wurde bei verschiedenen Laufzeiten durchgeführt, um eine optimale Trennung und Auflösung der Banden zu erzielen. Für die Durchführung der Elektrophorese wurden zwei verschiedene Laufzeiten (60min / 300V, 25mA und 9W) und (80min / 600V, 50mA und 30W) ausgewählt.

Die Ergebnisse der Optimierung zeigten, dass zu kurze Laufzeit von 60 min unter den oben genannten Bedingungen zu einer geringen Auftrennung und Auflösung von Fragmenten führt, so dass keine auswertbare Ergebnisse erzielt werden können. Hingegen waren die Auflösung und Trennung der Banden mit einer Laufzeit von 80 min. bei gegebenen Bedingungen deutlicher. Die Ergebnisse der Untersuchungen von GAULL (2002) und ALTER et al. (2002) bestätigten diesen Befund. Nach der Gelelektrophorese der behandelten *Yersinia* spp.- Stämme konnten ca. 45 – 50 Banden im Bereich von 35,0 – 570bp detektiert werden. Aufgrund von Hintergrundstörungen, die während der Silberfärbung der Gele auftraten, wurden für die Auswertung und den Vergleich

der Bandenmuster die Banden auf dem Bereich von 67,0 – 501bp begrenzt, da in diesem Bereich die Intensität der Banden am stärksten und die Hintergrundstörung am geringsten war (siehe Abbildungen 13A und 13B). GAULL (2002) bestätigte diesen Befund in ihren Untersuchungen. KUEHNI (2005) beschrieben in ihrer Arbeit, dass sie nach der Elektrophorese der *Yersinia* spp.- Stämmen 50 – 120 Banden im Bereich von 80 – 450 bp detektieren konnten. Der Grund für die hohe Bandenzahl lag vermutlich am Verzicht auf der präselektiven PCR. Dies führte dazu, dass sich die Anzahl der Banden erhöhte und demzufolge einen negativen Einfluss auf die Auswertung des Gels hatte.

5.3.4 Reproduzierbarkeit der AFLP- Methode

Für die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode wurden fünf Referenzstämme und fünf Feldstämme mehrmals an verschiedenen Tagen typisiert. Nach den visuellen Untersuchungen der Gele konnte festgestellt werden, dass die Stämme auf jedem Gel nahezu die gleichen Bandenmuster aufwiesen. Aus den minimalen Unterschieden zwischen den fertigen Gelen wurde deutlich, dass auf einigen Gelen die Fragmente etwas länger gelaufen waren. Trotz dieses Unterschieds war das Bandenprofil der Stämme auf jedem Gel gleich. Diese Ergebnisse zeigten, dass die AFLP- Methode sehr gut reproduzierbar war.

Die eigenen Untersuchungen zeigten eine Ähnlichkeit von mehr als 93% zwischen den Bandenmuster der Isolate innerhalb des Geles und 90% zwischen den Gelen. DUIM et al. (1999, 2004), ON et al. (2000), ALTER et al. (2002, 2003) und GAULL (2002) bestätigten in ihren Untersuchungen diesen Befund. Sie konnten eine Ähnlichkeit von 92% zwischen den Bandenmuster der Isolate feststellen. SVELKOU et al. (1999) beschrieben in ihrer Arbeit, dass die AFLP- Methode sehr gut reproduzierbar ist. Hierbei konnten sie eine Ähnlichkeit von 95 – 98,5% zwischen den Bandenmuster der Isolate feststellen. Auch KUEHNI (2005) und FEARNLEY et al. (2005) bestätigten in ihren Untersuchungen die Reproduzierbarkeit der AFLP- Methode mit isolierter chromosomaler DNS von *Yersinia* spp.- Stämmen durch mehrmaliges Auftragen und Vergleichen der Gele. Hierbei zeigten sie in ihrer Arbeit eine

Ähnlichkeit von 92,07 – 95,0% zwischen den Bandenmuster der Isolate innerhalb des Geles und 90% zwischen den Gelen.

5.3.5 AFLP- Typisierung der Referenzstämme

Die Ergebnisse der Genotypisierung von Referenzstämmen zeigten, dass es mittels AFLP- Methode möglich war, innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* die Bioserotypen voneinander zu unterscheiden (Abbildung 5). Hierbei zeigte die Typisierung der *Y. enterocolitica*- Referenzstämmen, dass innerhalb dieser Spezies das Verwandtschaftsverhältnis 62,1% betrug. Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Profil der Bandenmuster innerhalb des *Y. enterocolitica* Bioserovar 4/O:3 unterschiedlicher Herkunft eine Ähnlichkeit von 86,8% aufwies.

Auch FEARNLEY et al. (2005) und KUEHNI (2005) bestätigten in ihren Untersuchungen diesen Befund. Sie zeigten in ihren Untersuchungen, dass AFLP- Typen desselben Bioserovars sehr ähnliche Bandenmuster aufweisen, was auf eine enge Verwandtschaft dieser Stämme schließen lässt. Hierbei beschrieben FEARNLEY et al. (2005), dass die Ähnlichkeit der Bandenmuster zwischen den Human- Isolaten des *Y. enterocolitica* Bioserovars 4/O:3 und des *Y. enterocolitica* Bioserovars 4/O:3 tierischer Herkunft 84% betrug. Auch KUEHNI (2005) zeigten in ihrer Arbeit, dass die Ähnlichkeit der Bandenmuster zwischen *Y. enterocolitica* Bioserovar 4/O:3 unterschiedlicher Herkunft zwischen 83 – 87% lag. Die enge genetische Verwandtschaft zwischen den *Y. enterocolitica* Bioserovars 4/O:3 humaner und tierischer Herkunft bestätigte, dass das Schwein als Reservoir für pathogene *Y. enterocolitica* eine wichtige Rolle spielt (KUEHNI, 2005).

Desweiteren zeigten die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen, dass die Bandenmuster anderer *Y. enterocolitica* Bioserovare wie O:5,27 dem *Y. enterocolitica* Bioserovar 4/O:3 lediglich zu 70,4% ähnelt. Mit 62,1% war die Ähnlichkeit der Bandenmuster vom *Y. enterocolitica* Bioserovar 1A/O:7,8 zu dem von *Y. enterocolitica* Bioserovar 4/O:3 am geringsten. KUEHN (2005) bestätigten in ihren Untersuchungen diesen Befund.

5.3.6 Ergebnisse der AFLP- Typisierungen

Wie bei der PFGE- Typisierung wurden insgesamt 151 *Yersinia* spp.- Isolate für die Feintypisierung mittels AFLP ausgewählt. Die Isolate waren in 5 Durchgänge (Untersuchungstage nach der Infektion) unterteilt. Zusätzlich zum Stamm *Y. enterocolitica* DSM 13030 (4/O:3) als Kontrollstamm wurden drei *Y. enterocolitica*- Stämme unterschiedlicher Serotypen (4/O:3 yopT- negativ; O:5,27; 1A/O:7,8) und ein *Y. pseudotuberculosis*- Stamm (ATCC 29833) in jedem Durchgang bei der Typisierung der Isolate mitgeführt. Die Ergebnisse der AFLP- Typisierung zeigten, dass die *Yersinia* spp.- Stämme eine enge genetische Verwandtschaft von 90,1 – 99,8% zum *Y. enterocolitica* (DSM 13030, 4/O:3)- Stamm zeigten. Sie wurden daher als ein Genotyp bezeichnet. Innerhalb der Serogruppe 4/O:3 konnte ein Ähnlichkeitsprofil von 83,3% festgestellt werden. FEARNLEY et al. (2005) und KUEHNI (2005) konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die *Y. enterocolitica* Bioserovar 4/O:3 (unterschiedliche Herkunft) eine Ähnlichkeit von 84 – 87% zeigten. Die andere *Y. enterocolitica* Bioserovare (1A/O:7,8 und O:5,27) zeigten lediglich eine Ähnlichkeit von 59,6% bzw. 72,9%.

Interessant war, dass innerhalb der *Y. enterocolitica*- Gruppe das *Y. enterocolitica* Bioserovar 1A/O:7,8 eine geringere Ähnlichkeit (58,3 – 59,6%) zu den anderen *Y. enterocolitica*- Stämmen aufwies als die übrigen Stämme. KUEHNI (2005) zeigten, dass die Ähnlichkeit der isolierten *Y. enterocolitica* BV1A zu anderen *Y. enterocolitica* Stämmen nur 37% betrug. Auch der pathogene *Y. enterocolitica*- Stamm (O:5,27) zeigte eine geringe Ähnlichkeit (68 – 71,6%) zu dem *Y. enterocolitica* Stamm (4/O:3), obwohl beide Stämme das Virulenzplasmid besitzen. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster zwischen den pathogenen Stämmen *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* war mit 48,8 – 50,7% am geringsten, trotz des Vorhandensein von Virulenzplasmid pYV. Da die AFLP- Methode auf der Analyse der chromosomalen DNS basiert, ist es unwahrscheinlich, dass das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit des Virulenzplasmid pYV einen Einflussfaktor auf das Unterscheiden der Stämme bei der Cluster- Analyse spielen wird (FEARNLEY et al., 2005). Die Ergebnisse der AFLP- Typisierung konnten durch den Vergleich mit den Ergebnissen aus der Arbeit von FEARNLEY et al. (2005) und KUEHNI (2005) bestätigt werden.

5.4 Vergleich der beiden Typisierungsmethoden

Mit der AFLP- und PFGE- Methode wurden genetische Fingerabdrücke von Isolaten hergestellt, die jedoch in ihrer diskriminierenden Aussagekraft differieren. Beide Typisierungsmethoden basierten auf der Darstellung von Teilen (Fragmenten) des gesamten Genoms. Die PFGE- Typisierung basierte auf der Restriktion des Genoms mit einem Enzym (*Not* I), wobei 22 Banden im Bereich von 10,5 – 250kb entstehen (FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 1999), während bei AFLP- Methode das Genom mit zwei Enzymen (*Hind* III und *Hha* I) geschnitten wird. Hierbei konnten 45 Banden im Bereich von 70,0 – 520bp detektiert werden. Beim Vergleich der Bandenmuster wurde bei beiden Methoden der cut- off- Wert der Auswertungssoftware bei 90% festgelegt. Alle Isolate die eine Ähnlichkeit $\geq 90\%$ zeigten, wurden als genetisch eng miteinander verwandt bezeichnet (klonal). Die PFGE- und AFLP- Untersuchungen zeigten, dass der *Yersinia enterocolitica* DSM 13030 in allen Isolaten, die mittels PCR bestätigt wurden, wieder zu finden war. Außerdem konnte bei der Typisierung der Referenzstämme gezeigt werden, dass die beide Methoden eine gute Reproduzierbarkeit zeigten. Die Bandenmuster-Analyse der *Yersinia* spp.- Isolate zeigte, dass die Homologie der Stämme sowohl bei der PFGE- Methode als auch bei der AFLP- Methode über 90% lag. Der Vergleich der Ergebnisse mit der Arbeit anderer Autoren (NAJDENSKI et al., 1994; BUCHRIESER et al., 1994; FREDRIKSSON- AHOMAA et al., 1999; FEARNELY et al., 2005; KUEHNI, 2005) bestätigte diese Aussage.

Beim Vergleich der Bandenmustern beider Methoden miteinander konnte festgestellt werden, dass die Diskriminierungsstärke der AFLP- Methode höher als die der PFGE- Methode war. Dies konnte aus dem Vergleich der Dendrogramme ermittelt werden. Der Grund ist in der höheren Anzahl der Banden und der besseren Auftrennung der Fragmente auf Polyacrylamid- Gel zu suchen. Zusätzlich hat das Agarosegel, das für PFGE benutzt wird, ein niedrigeres Auflösungsvermögen gegenüber Polyacrylamid- Gel, das für AFLP- Analysen benutzt wird. Dieser Umstand kann ein Nachteil für den zuverlässigen Vergleich der Muster und der Computeranalyse sein. Am stärksten war der Unterschied zwischen den *Yersinia* spp.- Isolaten und *Y. pseudotuberculosis*

ATCC 29833. Die Bandenmuster- Analyse der PFGE- Methode ergab eine Homologie von 65,2% zwischen den Stämmen, die bei der AFLP- Methode bei lediglich 48,8% lag. Ein weiterer Vorteil der AFLP- Methode gegenüber der PFGE- Methode liegt darin, dass bei der AFLP die gesamte chromosomalen DNS berücksichtigt wird, sodass das Fehlen bzw. das Vorhandensein des Plasmids keinen großen Einfluss auf die Analyse der Bandenmuster ausübt. Im Gegensatz dazu hat das Vorkommen eines Plasmids einen großen Einfluss auf der Analyse der Bandenmuster bei der PFGE- Methode. Der Grund dafür liegt an dem bandenbasierten Dice- Koeffizient, der für den Vergleich der Bandenmuster angewendet wird. Hierbei werden die einzelnen Banden jedes Stammes miteinander verglichen und dementsprechend ein Cluster gebildet. Die geschilderten Vor- und Nachteile der beiden Methoden werden auch von FEARNELY et al. (2005) und FREDRIKSSON- AHOMAA et al. (2004) bestätigt.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Methoden lag an der Handhabung und dem zeitlichen Aufwand für die Untersuchung der Stämme. Die PFGE zeigte ein gutes Differenzierungspotential, war aber zeitaufwendig und für große Probenmengen ungeeignet. Die AFLP- Analyse war dagegen hoch diskriminierend, weniger zeitaufwendig als die PFGE und daher geeignet für die Bearbeitung von großen Probenmengen. Hierbei konnten die Stämme mittels AFLP- Methode innerhalb von zwei Tagen untersucht werden, was bei PFGE fünf Tage in Anspruch nahm. Dies konnte durch die Anwendung von kommerziellen DNA- Isolations- Kits für die hohe Reinheit und Ausbeute der DNS- Proben erklärt werden (SPEIJER et al., 1999; TYLER et al., 1997). Auch andere Autoren wie GAULL (2002) und Alter et al. (2002) bestätigten mit ihren Untersuchungen diesen Befund. Auch von der Handhabung war die AFLP die bessere Methode, da für die Isolation der chromosomalen DNS, Bakterienkolonien direkt aus der Blut- Platte entnommen und isoliert werden konnten. Bei PFGE- Methode hingegen mussten die Kolonien zunächst in BHI- Bouillon kultiviert und erst anschließend konnte als Ausgangsmaterial für die PFGE- Methode gewonnen werden. Auch bezüglich der Anwendbarkeit lieferte die AFLP- Methode bessere Resultate. Denn der gleiche Prozessablauf kann mit gleichen Restriktionsenzymen und Materialien grundsätzlich ebenso für

andere Bakterienarten wie *Campylobacter* spp., Enterokokken und Listerien benutzt werden. Allerdings muss die PFGE- Methode an jede Bakterienspezies speziell angepasst werden.

Obwohl sich die beide Methoden für die taxonomische und epidemiologische Fragestellungen eignen, zeigte der Vergleich beider Methoden, dass sich die AFLP- Methode aufgrund ihrer höheren Sensibilität, Diskriminierungsstärke, kürzerem zeitlichen Aufwand und der einfachen Handhabung eine geeignetere Methode für die Feintypisierung von *Yersinien* als die PFGE- Methode darstellte. Die Aussagekraft für epidemiologische Untersuchungen ist bei der AFLP- Typisierung wesentlich höher als beim PFGE- Typisierung (DE BOER et al., 2000). Auch andere Autoren beschrieben, dass die AFLP- Analyse häufiger in der Lage war identische PFGE- Muster zu differenzieren (HEIN et al., 2003; HÄNNINEN et al., 2001; DE BOER et al., 2000; LINDSTEDT et al., 2000). Der Vergleich der AFLP- Methode mit andere Typisierungs- und Subtypisierungsmethoden zur Differenzierung der *Y. enterocolitica* Stämme wie Ribotyping (LOBATO et al, 1998), REAP (ITMAN et al., 1996) und REAC (KAPPERUD et al., 1990) zeigt ein ähnliches Bild. Denn das Ribotyping führt in der Regel zu einer niedrigeren Diskriminierungsstärke aufgrund zu vieler bzw. zu niedrigen Bandenzahl. Für die Routineuntersuchungen erscheint das Ribotyping daher nicht geeignet.

Ein Nachteil der AFLP- Methode gegenüber der PFGE- Methode ist in den hohen Kosten und möglichen Kontaminationen, die während der PCR- Verfahren auftreten können, zu sehen. Ein weiterer Nachteil der AFLP- Methode liegt an den mangelnden Vergleichsmöglichkeiten von AFLP- Bandenmustern mit denen, die in anderen Laboren erstellt wurden. Hier hat die MLST gegenüber der AFLP den Vorteil bezüglich der Kompatibilität und der vereinheitlichten Nomenklatur, was einen Vergleich zwischen verschiedenen Studien ermöglicht (DUIM et al., 2003, SCHOULS et al., 2003). Denn in epidemiologischen Studien ist häufig auch die Kombination von zwei Genotypisierungsmethoden oder die Verbindung von Phäno- und Geno- Typisierung sinnvoll (ISHIHARA et al., 2006; HÄNNINEN et al., 2001; DE BOER et al., 2000; WASSENAAR, 2000). In Allgemeinen konnte festgestellt werden,

dass die AFLP- Typisierung der *Yersinia* spp.- Isolate hoch diskriminierend und weniger zeitaufwendig war als die PFGE und sich daher für die Bearbeitung von großen Probenmengen eignet. In der Literatur wird die AFLP- Typisierung für epidemiologische Studien von *Campylobacter* spp., gegenüber anderen Genotypisierungsmethoden wie der PFGE, dem FLA- Typing oder der Ribotyping, auch als aussagekräftigere, vorteilhaftere, sensitivere und diskriminierende Methode beschrieben (DUIM et al., 1999; KOKOTOVIC und ON, 1999; DE BOER et al., 2000; DUIM et al., 2000; LINDSTEDT et al., 2000; Alter et al., 2002; FEARNELY et al., 2005; KUEHNI, 2005). Die AFLP- Typisierung erscheint somit für die Darstellung der epidemiologischen Fragestellungen von *Y. enterocolitica* eine geeignetere Methode als die PFGE- Methode.

6 Schlussfolgerungen

6.1 Multiplex- PCR

Da das pYV- Plasmid während der *in vitro*- Vermehrung von Yersinien bei Temperaturen über +30°C leicht verloren gehen kann, eignet sich die Inkubation der Stämme bei +28°C. Für die Multiplex- PCR ist eine Annealing-Temperatur von +55,5°C zu wählen, da alle drei Primer (Y, YE und *yopT*) bei dieser Temperatur einen deutlichen Signal zeigen. Aufgrund des Auftretens von Mismatches, unspezifischer Banden und falsch negativer Ergebnisse wurde auf die Multiplex- PCR- Untersuchung der Stämme mit den Primerpaaren (*ail*, *virF* und *inv*) in dieser Arbeit verzichtet. Der Vergleich der biochemischen Ergebnisse mit den Resultaten aus der Multiplex- PCR zeigte eine 100%ige Übereinstimmung.

6.2 Typisierung der *Yersinia* spp.- Stämme mittels PFGE

Für die Restriktion der chromosomalen DNS wurde die Endonuclease *Not I* verwendet, mit der eine große und geeignete Anzahl von Fragmenten für die Bandenmuster- Analyse produziert wurde. Für eine optimale Auftrennung und Auflösung der Fragmente sorgte eine Laufzeit von 20 Stunden und eine Pulszeit von 1sec-18sec. Die PFGE- Methode zeigte unter diesen Bedingungen eine gute Reproduzierbarkeit. Mit Hilfe der PFGE- Methode war es möglich, innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* mehrere Bioserotypen voneinander zu unterscheiden. Es konnte mittels PFGE ein Fragment bei plasmidtragenden *Y. enterocolitica*- Stämmen in der Größenordnung von 40 – 45kb beobachtet werden, das auf das Vorhandensein des Virulenzplasmids pYV hindeutet. Alle *Yersinia* spp.- Stämme, die aus verschiedenen Versuchstagen isoliert wurden, wiesen eine enge genetische Verwandtschaft zum *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm (91,7 – 100%) auf. Innerhalb der Bioserogruppe 4/O:3 konnte ein Ähnlichkeitsprofil von 85,3% festgestellt werden.

6.3 Typisierung der *Yersinia* spp.- Stämme mittels AFLP

Die Isolation der chromosomalen DNS erfolgte mit Hilfe eines DNS- Isolation-Kits, basierend auf einer Silica- Gel- Membran. Dies ermöglichte eine hohe DNS- Ausbeute und hohe Reinheit. Für die Restriktion der chromosomalen DNS wurden die Endonucleasen *Hind* III und *Hha* I verwendet. Damit konnten 45 – 50 Fragmenten entstehen. Die optimale Elektrophorese erfolgte bei einer Laufzeit von 80min und 600V, 50mA und 30W. Die AFLP- Methode zeigte eine sehr gute Reproduzierbarkeit. Mittels AFLP- Typisierung der Referenzstämme konnten *Y. enterocolitica* aus verschiedenen Bioserotypen deutlich voneinander unterschieden werden. Hierbei wurde festgestellt, dass die Bandenmuster von Stämmen unterschiedlicher Herkunft innerhalb des *Y. enterocolitica*- Bioserovars 4/O:3 eine Ähnlichkeit von 86,8% zeigten. Die Ergebnisse der AFLP- Typisierung zeigten, dass die *Yersinia* spp.- Stämme eine enge genetische Verwandtschaft von 90,1 – 99,8% zum *Y. enterocolitica* (DSM 13030, 4/O:3)- Stamm zeigten.

6.4 Vergleich der beiden Typisierungsmethoden AFLP und PFGE

Der Vergleich beider Methoden miteinander zeigte, dass die Diskriminierungsstärke der AFLP- Methode aufgrund hoher Bandenzahl und besserer Bandenauftrennung der Fragmente viel stärker als die PFGE- Methode war. Außerdem zeigte die AFLP gegenüber PFGE- Methode eine bessere Handhabung und war für die Bearbeitung von großen Probenmengen geeignet. Auch der zeitliche Aufwand war bei AFLP- Methode geringer. Hier konnten die Stämme mittels AFLP- Methode innerhalb von zwei Tagen untersucht werden, während für die PFGE- Untersuchung fünf Tage benötigt wurden. Die AFLP- Methode war auch in punkto Anwendbarkeit die bessere Methode. Hierbei können prinzipiell die gleichen Prozessabläufe mit gleichen Restriktionsenzymen und Materialien auch auf anderen Bakterienarten wie *Campylobacter* spp., Enterokokken und Listerien übertragen werden. Der Nachteil der AFLP- Methode liegt jedoch in den vergleichsweise höheren Kosten und in den Gefahr von möglichen Kontaminationen, die während des PCR- Verfahrens auftreten können.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aus einem experimentellen Infektionsversuch von Mastgeflügel insgesamt 747 verdächtige *Yersinia* spp.-Stämme aus 15 Tierversuchsdurchgängen (A bis O) nicht nur biochemisch sondern auch mittels PCR-Verfahren spezifiziert. Hierbei wurde das Genus (Yersinien), die Spezies (*Y. enterocolitica*) und die Pathogenität (*yopT*-Gen) der Feldstämme mittels Multiplex-PCR-Verfahren ermittelt.

Die PCR-Ergebnisse zeigten, dass 596 (79,8%) Isolate als *Yersinia*-negativ, 130 (17,4%) Isolate als *Y. enterocolitica* positiv (mit *yopT*-Gen) und 21 (2,8%) Isolate als *Yersinia enterocolitica*-positiv ohne *yopT*-Gen anzusehen waren. Die meisten *Y. enterocolitica*-positiven Stämme wurden in den Versuchsdurchgängen B (2. Tag post infectionem) bis F (10. Tag post infectionem) gefunden. Ab dem Versuchsdurchgang G (12. Tag post infectionem) wurden keine *Yersinia* spp.-Stämme identifiziert. Insgesamt standen 6 Primerpaare (*Y*, *YE*, *yopT*, *ail*, *virF*, *inv*) für die PCR zur Verfügung. Mittels Multiplex-PCR mit den Primerpaaren (*Y*, *YE* und *yopT*) konnten die Gattung, Spezies und Pathogenität (*yopT*-Gen) der *Yersinia* spp.-Stämme ermittelt werden. 130 Stämme wurden eindeutig als *Yersinia* spp. (*yopT*⁺) identifiziert. Eine große Anzahl von 596 isolierten Stämmen waren *Yersinia* spp.-negativ. Diese Resultate geben einen Hinweis auf die geringe Selektivitätsstärke der verwendeten Medien zur Isolierung von *Y. enterocolitica*-Stämmen. 21 der untersuchten Stämme wurden als *Y. enterocolitica* (*yopT*⁻) identifiziert. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte das pYV-Plasmid sein, das während der Isolation unter verschiedenen Stressfaktoren u. a. Temperaturänderung verloren gehen kann.

Insgesamt wurden 130 *Yersinia* spp.-Isolate (*yopT*⁺) und 21 Isolate (*yopT*⁻) für die Feintypisierung mittels PFGE- und AFLP-Methode ausgewählt. Als Referenzstamm wurden wie bei der PCR-Methode die *Y. enterocolitica* DSM 13030 (4/O:3) benutzt. Zusätzlich wurden drei *Y. enterocolitica*-Stämme unterschiedlicher Bioserotypen (4/O:3 *yopT*-negativ; O:5,27; 1A/O:7,8) und *Y.*

pseudotuberculosis (ATCC 29833) mitgeführt um die genotypische Unterschiede zwischen den Referenzstämmen und innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* zu untersuchen. Im Rahmen der Optimierung der Typisierungsmethode wurde für die Restriktion der chromosomalen DNS als geeignete Enzyme *Hind* III und *Hha* I ausgewählt, sowie die Parameter der elektrophoretischen Auftrennung optimiert. Die Ergebnisse der PFGE- und AFLP- Typisierung von Referenzstämmen zeigten, dass es mittels beider Methoden möglich war, innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* die Bioserotypen voneinander zu unterscheiden. Hierbei konnte festgestellt werden, dass das Profil der Bandenmuster von *Y. enterocolitica*- Stämmen des Bioserovars 4/O:3 sich zu 83,3 bis 87% ähnelte. Alle *Yersinia* spp.- Stämme, die in verschiedenen Versuchstagen nach der Infektion isoliert wurden, wiesen eine enge genetische Verwandtschaft zum *Y. enterocolitica* (DSM 13030)- Stamm auf und wurden aus diesem Grund als ein Genotyp bezeichnet. Die Bandenmuster- Ähnlichkeit der *Yersinia* spp.- Stämme betrug bei der PFGE- Methode (91,7 – 100%) und bei AFLP- Methode (90,1 – 99,8%).

Die PFGE- und AFLP- Untersuchungen zeigten, dass der im Tierversuch eingesetzte *Yersinia enterocolitica* DSM 13030- Stamm in allen Isolaten, die mittels PCR bestätigt wurden, wieder zu finden war. Mit den beiden Methoden wurden genetische Fingerabdrücke der Isolate hergestellt, die sich in ihrer diskriminierenden Aussagekraft unterschieden. Beide Typisierungsmethoden basierten auf die Darstellung von Teilen (Fragmenten) des gesamten Genoms. Für den Vergleich der Bandenmuster wurden bei beiden Methoden die cut- off- Werte der Auswertungs- Software bei 90% festgelegt. Alle Isolate die eine Ähnlichkeit von $\geq 90\%$ zeigten, wurden als genetisch eng miteinander verwandt bezeichnet (klonal).

Der Vergleich der beiden Methoden miteinander zeigte, dass die AFLP- Methode aufgrund höherer Diskriminierungsstärke, ihrem geringen zeitlichen Aufwand, ihrer sehr guten Reproduzierbarkeit und besseren Handhabung eine hervorragende Methode für die Genotypisierung von *Yersinia* spp.- Stämmen darstellt.

8 Summary

In the context of the presented work from an experimental infection attempt of broiler chickens altogether 747 suspicious *Yersinia* spp. strains from 15 passages (A to O) were specified not only biochemically but also by PCR procedure. The Genus (*Yersinia*), the species (*Y. enterocolitica*) and the pathogenicity (*yopT* gene) of the field strains were identified using multiplex PCR procedure.

The PCR results showed that 596 (79.8%) isolates were *Yersinia*- negative, 130 (17.4%), isolates were *Y. enterocolitica* (*yopT*⁺) and 21 (2.8%) were *Yersinia enterocolitica* (*yopT*⁻). Most of the *Y. enterocolitica* positive strains were found in the passages B (2nd day post infection) to F (10th day post infection). Starting from the passage G (12th day post infection) no *Yersinia* spp. - strains were identified. Altogether 6 pairs of primers (*Y*, *YE*, *yopT*, *ail*, *virF*, *inv*) were available for the multiplex PCR. The use of multiplex PCR with the primer pairs *Y*, *YE* and *yopT* the genus, species and the pathogenicity (*yopT* gene) of the presumptive *Yersinia* spp. strains could be determined.

130 strains were unequivocal identified as *Yersinia* spp. with *yopT* gene. A large number of 596 isolated strains were *Yersinia* spp. negative. These results could be a reference to the small selectivity of the used media for the isolation of supposed *Yersinia* spp. strains. 21 examined strains were identified as *Yersinia* spp. (*yopT*⁻). An explanation for this phenomenon could be the pYV- plasmid, which can be lost due to changes of temperature among other things during the isolation under different stress factors.

Altogether 130 *Y. enterocolitica* isolates (*yopT*⁺) and 21 *Y. enterocolitica* isolates (*yopT*⁻) were selected for genotyping using PFGE and AFLP methods. As reference strains (as with the PCR method) *Y. enterocolitica* DSM 13030 (4/O: 3) were used. In addition, three *Y. enterocolitica* strains of different bioserotypes (4/O:3 *yopT* negative; O:5,27; 1A/O:7,8) and *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833) were included to examined the genotype differences between the reference strains and the species *Y. enterocolitica*.

In the context of the optimization of the classification method for the restriction of the chromosomal DNA suitable enzymes *Hind* III and *Hha* I were selected. Parameters for electrophoresis were optimized. The results of the PFGE and AFLP typing of reference strains showed that it was possible using both methods to differentiate bioserotypes within the species *Y. enterocolitica* from each other. On this occasion it could be registered that the profiles of band patterns of *Y. enterocolitica* bioserotypes 4/O:3 demonstrated 83.3 to 87% similarity. All *Yersinia* spp. strains, which were isolated at different days after the infection, revealed a close genetic relationship to *Y. enterocolitica* DSM 13030 and for this reason were characterized as one genotype. .

The band pattern similarity of the *Yersinia* spp. strains amounted to 91.7 - 100% using the PFGE method and 90.1 - 99.8% using AFLP. The PFGE and AFLP investigations showed that the *Y. enterocolitica* DSM 13030 - strain used in the bioassays was regainable. That was confirmed by using PCR. The two genotyping methods used differed in their discriminating power.

Both genotyping methods were based on the detection of parts (fragments) of the entire gene. During the comparison of the band patterns with both methods the Cut-off value of the analysis software was specified with 90%. All isolates which showed a similarity of >90%, were described as genetically closely related (clone).

The comparison of the two methods showed that the AFLP method, due to higher discrimination strength, their small temporal expenditure, their very good reproducibility and better handling proofed to be a very good method for the genotyping of *Yersinia* spp. strains.

9 Literaturverzeichnis

AARTS, H. J., VAN LITH, L. A., KEIJER, J. (1998)

High-resolution genotyping of Salmonella strains by AFLP-fingerprinting.

Lett. Appl. Microbiol. 26 (2), 131-135

ABER, R. C. (1990)

Transfusion- associated Yersinia enterocolitica.

Transfusion. **30**, 193- 195

ACHTMAN, M., ZURTH, K., MORELLI, G., TORREA, G., GUIYOULE, A., CARNIEL, E. (1999)

Yersinia pestis, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*.

Proc Natl Acad Sci USA **96**, 14043–14048

ACHTMAN, M. (2001)

A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology.

Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie und Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin, Deutschland, persönliche Mitteilung.

ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. (1998)

DNA-Technologie.

In: Simons, K. und Kurzchalia, T. (Hrsg., 2001), Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, 2. korrigierte Auflage, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 333-368

ALEKSIC S., BOCKEMÜHL J. (1987)

Diagnostic importance of H-Antigens in *Yersinia enterocolitica* and other *Yersinia* Species.

Contrib. Microbiol. Immunol. **9**, 279-284

ALEKSIC S., BOCKEMÜHL J. (1990)

Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen.

Infect. Immun. **18**, 178-185

ALEKSIC S., BOCKEMÜHL J. (1996)

Untersuchungen von *Yersinia*- Stämmen aus Deutschland, 1993-1994.

Bundesgesundheitsblatt. **3**, 94-97

Al-Hendy A., Toivanen P., Skurnik M. (1992)

Lipopolysaccharide O side chain of *Yersinia enterocolitica* O:3 is an essential virulence factor in an orally infected murine model.

Infect Immun. **60**, 870-75

ALTER T., FEHLHABER K. (2003)

Einsatz der AFLP-Analyse zur molekularbiologischen Feintypisierung von *Campylobacter jejuni*-Stämmen aus Putenbeständen.

Berl Münch Tierärztl Wochenschrift. **116**, 454-9

ANONYMUS (1994)

Microbiology-General guidance for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*.

International Organization for standardization, ISO 10273, genf, Schweiz

ANONYMUS (2000)

Robert Koch Institut

Stellungnahme des Arbeitskreises Blut: *Yersinia enterocolitica*

Internet: www.rki.de/GESUND/AKBLUT/STELL/ST05.HTM

ANONYMUS (2002a)

Electrophoresis protocol.

[www.electrophoresis.apbiotech.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/](http://www.electrophoresis.apbiotech.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/Elpho_PCR_Detection_and_Imaging)

[Elpho_PCR_Detection_and_Imaging](http://www.electrophoresis.apbiotech.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/Elpho_PCR_Applications%5C6+AFLP) und [www.electrophoresis.](http://www.electrophoresis.apbiotech.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/Elpho_PCR_Applications%5C6+AFLP)

[apbiotech.com/aptrix/upp00919.nsf/ Content/Elpho_PCR_](http://www.electrophoresis.apbiotech.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/Elpho_PCR_Applications%5C6+AFLP)

[Applications%5C6+AFLP](http://www.electrophoresis.apbiotech.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/Elpho_PCR_Applications%5C6+AFLP)

ANONYMUS (2002b)

Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten.

Epidemiol. Bull. Nr. **3**, Robert-Koch-Institut, [www.rki.de/INFEKT/](http://www.rki.de/INFEKT/EPIBULL/2002/03_02.PDF)

[EPIBULL/2002/03_02.PDF](http://www.rki.de/INFEKT/EPIBULL/2002/03_02.PDF), 22-23

ANONYMUS (2004)

AFLP[®] - Genetic Fingerprinting.

www.keygene.com/technologies/technologies_aflp.htm

ANONYMUS (2007)

Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten.

Epidemiol. Bull. Nr. **1**, Robert-Koch-Institut, [www.rki.de/INFEKT/](http://www.rki.de/INFEKT/EPIBULL/2007/01_07.PDF)

[EPIBULL/2007/01_07.PDF](http://www.rki.de/INFEKT/EPIBULL/2007/01_07.PDF), 6-7

ANTONISHYN, N. A., R. R. MCDONALD, E. L. CHAN, G. HORSMAN, C. E. WOODMANSEE, P. S. FALK AND C. G. MAYHALL (2000)

Evaluation of Fluorescence-Based Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis for Molecular Typing in Hospital Epidemiology: Comparison with Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing Strains of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*.

J. of clinical Microbiol. **38**, 4058-4065

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

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

Syst Appl Microbiol. **24**, 285-289

ASPLUND, K., JOHANSSON, T., SIITONEN, A. (1998)

Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments in the discrimination of *Yersinia enterocolitica* O:3.

Epidemiol. Infect. **121**, 579-586

AUSUBEL, F., R. BRENT, R. KINGSTON, D. MOORE, J. G. SEIDMANN, J. SMITH, K. STRUHL (1998)

Current Protocols in Molecular Biology.
John Wiley & Sons, New York, USA

BARRY, T., GANNON, F. (1991)

Direct genomic DNA amplification from autoclaved infectious microorganisms using PCR technology.

PCR Methods Appl. **1**, 75

BEE, A. (2000)

Typisierung von *Yersinia enterocolitica* mittels Pulsed Field Gel Electrophoresis.

Dissertation Med. vet., Basel, Schweiz

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

Biochemical, serological and phagotyping characteristics of 459 *Yersinia* strains isolated from a terrestrial ecosystem.

Curr. Microbiol. **1**, 353-7

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

Characterisation of *Yersinia enterocolitica* sensu stricto.

Curr. Microbiol. **4**, 201-206

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

Genus XIV. *Yersinia*

In: Krieg, N.R. (Hrsg.), Bergey's manual of systematic bacteriology
Williams & Wilkins, Baltimore, USA, **1**, 498- 506

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

Yersinia aldovae (formerly *Yersinia enterocolitica*-like group X2): a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from aquatic ecosystem.

Int J Syst Bacteriol. **34**, 1166-72

BERNAL, M., M. I. BAQUERO-MEZENCE, F. PROVOST, F. LAURENT, G. MARTINEZ-MACHIN, BOIRON, P. (1997)

A one-step *Candida albicans* DNA extraction method using "Chelex® 100 resin" suitable for DNA amplification (PCR).
J. Mycol. Med. **7**, 53-54

BERRES, M. E. (2002)

An introduction to AFLP and fAFLP.
http://ravel.zoology.wisc.edu/sgaap/AFLP_html/fAFLP_Introduction.htm

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

Assay of crystal violet binding for rapid identification of virulent plasmid bearing clones of *Yersinia enterocolitica*.
J. Clin. Microbiol. **25**, 1039-1042

BHADURI S, COTTRELL B. (1997)

Direct detection and isolation of plasmid-bearing virulent serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various foods.
Appl Environ Microbiol. **63**, 4952-5

BOLAND, A., SORY, M. P., IRIARTE, M., KERBOURCH, C., WATTIAU, P., CORNELIS, G. R. (1996)

Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus.
EMBO J. **15**, 5191-5201

BÖLIN, I., NORLANDER, L., WOLF-WATZ, H. (1982)

Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid.

Infect. Immun. **37**, 506-512

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

Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria.

Int. J. Food Microbiol. **30**, 9-25

BORST, M., MILLER, D. M. (1990)

DNA isolation and southern analysis: a clinician's view.

Am. J. Med. Sci. **299** (5), 356-360

BOTTONE, E. J. (1997)

Yersinia enterocolitica: The carisma continues.

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

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

Production of heat-stable, methanol-soluble enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*.

Infect. Immun., **25**, 532- 537

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

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

Curr Microbiol. **4**, 207-212

BROSCH, R., BUCHRIESER, C., ROCOURT, J. (1991)

Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by use of low-frequency- cleavage restriction endonucleases and pulsed- field-gel electrophoresis.

Res. Microbiol. **142**, 667-675

BUCHRIESER, C., BROSCH, R., CATIMEL, B., ROCOURT, J. (1993)

Pulsed- field gel electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* stains involved in outbreaks.

Can. J. Microbiol. **39**, 395-401

BUCHRIESER, C., BUCHRIESER, O., KRISTL, A., KASPAR, C.W. (1994a)

Clamped homogenous electric fields (CHEF) gel elektrophoresis of DNA restriction fragments for comparing genomic variations among strains of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia* spp.

Zbl. Bakt. **281**, 457-470

BUCHRIESER, C., WEAGANT, S.D., KASPAR, C.W. (1994b)

Molecular characterization of *Yersinia enterocolitica* by pulsed-field gel electrophoresis and hybridization of DNA Fragments to *ail* and pYV Probes.

Appl. Env. Microbiol. **60**, 4371-4379

BUFFONE, G. J., DARLINGTON, G. J. (1985)

Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol.

Clin. Chem. **31** (1), 164-165

CARNIEL, E. (1995)

Chromosomal virulence factors of *Yersinia*

Contr. Microbiol. Immunol., **13**, 218- 224

CHENG, L. W., SCHNEEWIND, O. (1999)

Yersinia enterocolitica type III secretion. On the role of SycE in targeting YopE into HeLa cells.

J. Biol. Chem. **274**, 22102-22108

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

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

Infect. Immun. **39**, 1, 469-472

CHINA, B., N'GUYEN, B. T., DE BRUYERE, M., CORNELIS, G. R. (1994)

Role of *YadA* in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes.

Infect Immun. **62**, 1275-1281

CIEBIN, B., WAN, J., JAMIESON, F. (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. 469-472

CORNELIS, G., LAROCHE, Y., BALLIGUND, G. (1987)

Yersinia enterocolitica as a primary model for bacterial invasiveness.

Inf. Dis. Rev. **9**, 64-87

CORNELIS, G.R., WOLF-WATZ, H. (1997)

The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells.

Mol. Microbiol. **23**, 861-867

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

The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome.

Microbiol Mol Biol Rev. **62**, 1315-52

COX, N. A., BAILEY, J. S. (1990)

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

Poultry Sci. **69**, 686-93

DE BOER, P., DUIM, B., RIGTER, A., VAN DER PLAS, J., JACOBS-REITSMA, W. F., WAGENAAR, J. A. (2000)

Computer- assisted analysis and epidemiological value of genotyping methods for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.

J. Clin. Microbiol. **38**, 1940-1946

DE KONING-WARD, T. F., WARD, A. C., ROBINS-BROWNE, R. M. (1994)

Characterisation of the urease-encoding gene complex of *Yersinia enterocolitica*.

Gene **45**, 25-32

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

Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*.

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

DE LAMBALLERIE, X., ZANDOTTI, C., VIGNOLI, C., BOLLET, C., DE MICCO, P. (1992)

A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex[®] 100" suitable for gene amplification.

Res. Microbiol. **143**, 785-790

DELOR, I., KAECKENBEECK, A., WAUTERS, G., CORNELIS, G. R. (1990)

Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic *Yersiniae*.

Infect. Immun. **58**, 9, 2983-2988

DE ROUVROIT, L., SLUITERS, C., CORNELIS, G. R. (1992)

Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*.

Mol Microbiol. **6**, 395-409

DESAI, M., LOGAN, J. M. J., FROST, J. A., STANLEY, J. (2001)

Genome sequence- based fluorescent amplified fragment length polymorphism of *Campylobacter jejuni*, its relationship to serotyping, and its implication for epidemiological analysis.

J. Clin. Microbiol. **39**, 3823-3829

DINGLE, K. E., COLLES, F. M., URE, R., WAGENAAR, J. A., DUIM, B., BOLTON, F. J., FOX, A. J., WARRING, D. R. A., MAIDEN, M. C. J. (2002)

Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basis for epidemiologic investigation.

Emerg. Infect. Dis. **8**, 949-955

DÖBBELING, U., BÖNI, R., HÄFFNER, A., DUMMER, R., BURG, G. (1997)

Method for simultaneous RNA and DNA isolation from biopsy material, culture cells, plants and bacteria.

BioTechniques **22** (1), 88-90

DUIM, B., WASSENAAR, T. M., RIGTER, A., WAGENAAR, J. (1999)

High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting.

Appl. Environ. Microbiol. **65**, 2369-2375

DUIM, B., VANDAMME, P. A. R., RIGTER, A., LAESENS, S., DIJKSTRA, J. R., WAGENAAR, J. A. (2001)

Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting.

Microbiology **147**, 2729-2737

DUIM, B., GODSCHALK, P. C. R., VAN DEN BRAAK, N., DINGLE, K. E., DIJKSTRA, J. R., LEYDE, E., VAN DER PLAS, J., COLLES, F. M., ENDTZ, H. P., WAGENAAR, J. A., MAIDEN, M. C. J., VAN BELKUM, A. (2003)

Molecular evidence for dissemination of unique *Campylobacter jejuni* clones in Curaçao, Netherlands Antilles.

J. Clin. Microbiol. **41**, 5593-5597

**DUIM, B., WAGENAAR, J. A., DIJKSTRA, J. R., GORIS, J., ENDTZ, H. P.,
VANDAMME, P. A. R. (2004)**

Identification of Distinct *Campylobacter lari* Genogroups by
Amplified Fragment Length Polymorphism and Protein
Electrophoretic Profiles.
Appl. Envir. Microbiol., 70, 18-24

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

Proteinase K from *Tritirachium album* Limber.
Eur. J. Biochem. **47**, 91-97

EISENSTEIN, B. I. (1990)

The polymerase chain reaction. A new method of using molecular
genetics for medical diagnosis.
New Engl. J. Med. **322**, 178-183

EL TAHIR, Y., SKURNIK, M. (2001)

YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin.
Int.J.Med.Microbiol. **291**, (3), 209-18

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

Application of fluorescent amplified length polymorphism for
comparison of human and animal isolates of *Yersinia*
enterocolitica.
Appl. Env. Microbiol. **71**, 4960–4965

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

Direct identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by polymerase chain reaction.
Transfusion. **32**, 850-854

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

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction.
Lancet. **337**, (8739), 496-497

FENWICK, S. G., WAUTERS, G., URSING, J., GWOZDZ, M. (1996)

Unusual *Yersinia enterocolitica* strains recovered from domestic animals and people in New Zealand.
FEMS Immunol. Med. Microbiol. **31**, 241-245

FILETICI, E., ANASTASIO, M. P., POURSHABAN, M., FANTASIA, M. (2000)

Genotypic and phenotypic characteristics of *Yersinia* spp. isolates from man.
Food Microbiol. **17**, 261-267

FREDERIKSEN, W. (1964)

A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (Bacterium enterocoliticum and Pasteurella X).
Scand. Congr. Pathol. Mikrobiol., Oslo, Proc. **14**, 103-104

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

Efficient subtyping of *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 with pulsed-field gel electrophoresis.
Lett. Appl. Microbiol. **29**: 308-312

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., BUCHER, M., STOLLE, A. (2000)

Prevalenz von *Yersinia enterocolitica* Bioserotype 4/O:3 in
Tonsillen bei Schlachtschweinen in der Region München.
41. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG,
Garmisch-Partenkirchen, Teil I Vorträge, 116-122

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

Correspondence of genotypes of sporadic *Yersinia enterocolitica*
bioserotype 4/O:3 strains from human and porcine sources.
Epidemiol. Infect. **127**: 37-47

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

High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on pig offal in
Southern Germany: a slaughtering technique problem.
System. Appl. Microbiol. **24**: 457-463

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

Transmission of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 to pets via
contaminated pork.
Lett. Appl. Microbiol. **127**: 375-378

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

Auswertung verschiedener Anreicherungsverfahren für den
Nachweis von *Yersinia enterocolitica* 4/O:3.
42. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene,
Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Ober-Mörlen,
449-452

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

Different *Yersinia enterocolitica* 4:O3 genotypes found in pig tonsils in southern Germany and Finland System.
Appl. Microbiol. **26**: 132-137

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

Different genotypes of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains widely distributed in butcher shops in the Munich area.
Int. J. Food Microbiol. **95**: 89-94

FROST, J. A. (2001)

Current epidemiological issues in human campylobacteriosis.
J. Appl. Microbiol. **90**, 85-95

FUKUSHIMA, H., GOMYODA, M., ALEKSIC, S., TSUBOKURA, M. (1993)

Differentiation of *Yersinia enterocolitica* serotype O:5, 27 strains by phenotypic and molecular techniques.
J. Clin. Microbiol. **31**, 1672–1674

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

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

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

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

GAULL F. (2002)

Vorkommen thermophiler *Campylobacter* spp. bei Schweinen im Betrieb und auf dem Schlachthof, auf Putenschlachtierkörpern und in Lebensmitteln tierischen Ursprungs – Typisierung der Isolate mit molekularbiologischen Fingerprintmethoden und Vergleich der Isolate untereinander und mit humanen Isolaten.
[Dissertation med. vet]. Leipzig, Univ. Leipzig

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

Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*.
Infect. Immun. **27**, 2, 682-685

GLICK, B. R., PASTERNAK, J. J. (1995)

Molekulare Biotechnologie.
Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg·Berlin·Oxford,
25-31 und 78-83

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

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

GROSS-BELLARD, M., OUDET, P., CHAMBOM, P. (1973)

Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells.
Eur. J. Biochem. **36**, 32-38

**HÄNNINEN, M. L., PERKO- MÄKELÄ, P., RAUTELIN, H., DUIM, B.,
WAGENAAR, J. A. (2001)**

Genomic relatedness within five common Finnish *Campylobacter jejuni* pulsed- field gel electrophoresis genotypes studied by amplified fragment length polymorphism analysis, ribotyping, and serotyping.

Appl. Environ. Microbiol. **67**, 1581-1586

HAHN, G. (1989)

Yersinia - Yersiniosen

In: Walther Heeschen (Hrsg.), Pathogene Mikroorganismen und deren Toxine in Lebensmitteln tierischer Herkunft.

Behr's Verlag, Hamburg.

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

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

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

HARTUNG, M. (2000)

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

In: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (Hrsg.): Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 1999, 133-136

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

Über Pseudotuberkulose beim Menschen.

Schweiz. Med. Wschr. **79**: 971-973

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

Comparative study of selective media for recovery of *Yersinia enterocolitica*

J. Clin. Microbiol. **16**, 615-621

HEESEMANN, J., LAUFS, R. (1983)

Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid.

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

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

Immunochemical analysis of plasmidencoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* grown in calcium-deficient media.

Infect. Immunol. **54**, 561-567

HESSEMAN, J., GRÜTER, L. (1987)

Genetic evidences that the outer membrane protein YOP1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagozytosis resistance to human epithelial cell.

FEMS Microbiol. Lett.: **40**, 37-41

HEESEMANN, J. (1990)

Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische Methoden

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

HEESEMANN, J. (1994)

Die Gattung *Yersinia*, Yersiniosen.

Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie (7. Auflage)

herausgegeben von Brandis H., Eggers H.J., Köhler W., Pulverer G. (Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York).

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

Diagnostik von Yersiniosen und Infektionen mit dem entero-hämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)
Internist, **36**, 102-105

HEESEMANN, J., HENSEL, M. (2000)

Infektionsmodelle, Yersinien, Salmonellen, Shigellen und Listerien.
In: Heesemann, J., Hacker, J. (Hrsg.): Molekulare Infektionsbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 220-222

HEIN, I., SCHNECK, C., KNÖGLER, M., FEIERL, G., PLESS, P., KÖFER, J., ACHMANN, R., ACHMANN, M. (2003)

Campylobacter jejuni isolated from poultry and humans in Styria Austria: epidemiology and ciprofloxacin resistance.
Epidemiol. Infect. **130**, 377-386

HENTZE, M. W., KULOZIK, A. E., BARTRAM, C .R. (1990)

Einführung in die medizinische Molekularbiologie.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New-York, 116

HIGUCHI, R. (1992)

4. Simple and rapid preparation of samples for PCR.
In: PCR Technology - Principles and applications for DNA amplification.
Freeman and Company, New York. 31-38

HÖFLER, G. (1994)

Nachweis bakterieller DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Verh. Dtsch. Ges. Path. **78**, 104-110

HOLMSTRÖM, A., ROSQVIST, R., WOLF-WATZ, H., FORSBERG, A. (1995)

Virulence Plasmid-Encoded YopK is Essential for *Yersinia pseudotuberculosis* to cause systematic infection in mice.

Infect. Immun. **63**, 2269-2276

IBRAHIM, A., LIESACK, W., STACHEBRANDT, E. (1992)

Polymerase chain reaction gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*.

J. Clin. Microbiol. **30**, 1942-7

IBRAHIM, A., GOEBE, L. B. M., LIESACK, W., GRIFFITHS, M., STACHEBRANDT E. (1993)

The phylogeny of the genus *Yersinia* based on 16S rDNA sequences.

FEMS Microbiol. Lett. **114**, 173-177

IBRAHIM, A., LIESACK, W., STEIGERWALT, A. G., BRENNER, D. J., STACHEBRANDT, E., ROBINS-BROWNE, R. M. (1997a)

A cluster of atypical *Yersinia* strains with a distinctive 16S rRNA signature.

FEMS Microbiol. Lett. **146**, 73-78

IBRAHIM, A., LIESACK, W., GRIFFITHS, M. W., ROBINS-BROWNE, R. M. (1997b)

Development of a highly specific assay for rapid identification of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* based on PCR amplification of the *Yersinia* heatstable enterotoxin gene (yst).
J. Clin. Microbiol. **35**, 1636-1638

IRIARTE, M., CORNELIS, G. R. (1998)

YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells.
Mol. Microbiol. **29**, 915-929

ISEBERG, R. R., LEONG, J. M. (1990)

Multiple B1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells.
Cell. **60**, 861-871

ISEBERG, R. R., FALKOW, S. (1985)

A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12.
Nature. **317**, 262-264

ISHIHARA, K., YAMAMOTO, T., SATAKE, S., TAKAYAMA, S., KUBOTA, S., NEGISHI, H., KOJIMA, A., ASAI, T., SAWADA, T., TAKAHASHI, T., TAMURA, Y. (2006)

Comparison of *Campylobacter* isolated from humans and food-producing animals in Japan.
J. Appl. Microbiol. **100**, 153-160

ITEMAN, I., BARIL, C., GIRON, I. S., CARNIEL, E. (1991)

Pulsed-field gel electrophoresis of the chromosome of pathogenic *Yersiniae*.

Contr. Microbiol. Immunol. **12**, 198-202

ITEMAN, I., GUIYOULE, A., CARNIEL, E. (1996)

Comparison of three molecular methods for typing and subtyping pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains.

J. Med. Microbiol. **45**, 48-56

JACOBS, J., JAMMER, D., VAN DEVEN, J., WAUTERS, M., VERMYLEN, C., VANDEPITTE, J. (1989)

Yersinia enterocolitica in donor blood. A case report and review

J. Clin. Microbiol., **27**, 1119-1121

JANSSEN, P., COOPMAN, R., HUYS, G., SWINGS, J., BLEEKER, M., VOS, P., ZABEAU, M., KERSTERS, K. (1996)

Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy.

Microbiology **142**, 1881-1889

JANSSON, P. E., LINDBERG, A. A., WOLLING, R. (1981)

Structural studies on the hexose region of core lipopolysaccharide from Enterobacteriaceae.

Eur J Biochem. **115**, 571-577

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

Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Norwegian pork products determined by a PCR method and a traditional culturing method.

Int. J. Food Microbiol. **54**, 75-80

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

Pyrazinamidase activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms.

J. Clin. Microbiol. **21**, 980-982

KAPPERUD, G., LANGE LAND, G. (1981)

Enterotoxin production at refrigeration temperature by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*- like bacteria

Curr. Microbiol. **5**, 119- 122

KAPPERUD, G. (1982)

Enterotoxin production at 4°, 22°, and 37 °C among *Yersinia enterocolitica*- like bacteria

Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B, **90**, 185- 189

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

Biochemical and serological characterization of *Yersinia enterocolitica*.

In: Bergan, T., Norris, J.R. (eds.), Methods in microbiology
Academic Press, London **15**, 295-344

KAPPERUD, G., NAMORK, E., SKURNIK, M., NESBAKKEN, T. (1987)

Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis.

Infect. Immun. **55**, 2247-2254

KAPPERUD, G., NESBAKKEN, T., ALEKSIC, S., MOLLARET, H. H. (1990)

Comparison of restriction endonuclease analysis and phenotypic typing methods for differentiation of *Yersinia enterocolitica* isolates.

J. Clin. Microbiol. **28**, 1125-1131

KAPPERUD, G. (1991)

Yersinia enterocolitica in food hygiene

Int. J. Food Microbiol. **12**, 53-66

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

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reaction, and colorimetric detection of amplified DNA.

Appl Environ Microbiol. **59**, 2938-2944

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

New virulence-associated plasmid in *Yersinia enterocolitica*

J. Clin. Microbiol. **15**, 1161-1163

KERBER, J. (1997)

Untersuchungen zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in den Luftwegen von Schweineschlachttierkörpern mit bekanntem sowie unbekanntem serologischen Status und Nachweis von Yersinien im daraus hergestellten Wurstbrät

[Dissertation med. vet.], Berlin, Freie Universität Berlin

KIEM, P., KALIF, A., SCHUPP, J., HILL, K., TRAVIS, S. E., RICHMOND, K., ADAIR, D. M., HUGH-JONES, M., KUSKE, C. R., JACKSON, P. (1997)

Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers.
J. Bacteriol. **179**, 818-824

KIRBY, K. S. (1957)

A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acids and proteins.
Biochemistry **66**, 495-504

KNAPP, W. (1983)

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

KNAPP, W. (1988a)

Die Gattung *Yersinia* - Yersiniosen. III. *Yersinia enterocolitica*
In: Brandis, H., Pulverer, J. (Hrsg.), Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 355- 358

KNAPP, W., THAL, E. (1988b)

Die biochemische Charakterisierung von *Yersinia enterocolitica* (syn. *Pasteurella X*) als Grundlage eines vereinfachten O-Antigenschemas
In: Bisping, W., Amtsberg G. (1988): Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionskrankheiten der Tiere.
Paul Parey Scientific Publishers, Berlin und Hamburg

KOELEMAN, J. G. M., STOOF, J., BIESMANS, D. J., SAVELKOUL, P. H. M., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E. (1998)

Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing *Acinetobacter haumannii*.

J. Clin. Microbiol. **36**, 2522-2529

KOKOTOVIC, B., ON, S. L. (1999)

High-resolution genomic fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by analysis of amplified fragment length polymorphisms.

FEMS Microbiol.Lett. **173**, 77-84

KOTETISHVILI, M., KREGER, A., WAUTERS, G., MORRIS, J. G. JR., SULAKVELIDZE, A., STINE, O. C. (2005)

Multilocus sequence typing for studying genetic relationship among *Yersinia* species.

J. Clin. Microbiol. **43**, 2674–2684

KOX, L. F. F., RHIENTHONG, D., MEDO MIRANDA, A., UDOMSANTISUK, N., ELLIS, K., VAN LEEUWEN, J., VAN HEUSDEN, S., KUIJPER, S., KOLK, A. H. J. (1994):

A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples.

J. Clin. Microbiol. **32** (3), 672-678

KUEHNI, K. (2005)

Genotypisierung von menschlichen und porzinen *Yersinia enterocolitica* Stämmen aus der Schweiz mit Amplified Fragment Length Polymorphism.

[Dissertation med. vet]. Bern, Univ. Bern, Schweiz

KWAGA, J. K., IVERSEN, J. O. (1992)

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

Can. J. Microbiol. **38**, 92-97

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

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

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

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

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

J. Clin. Microbiol. **19**, 660-663

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

Correlation of Autoagglutination and Virulence of *Yersinia*

J. Clin. Microbiol. **11**, 430-432

LAMBERTZ, S. T., LINDQVIST, R., BALLAGI-PORDANY, A., DANIELSSON-THAM, M. L. (2000)

A combined culture and PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food.

Int. J. Food Microbiol. **57**, 63–73

LAMBERTZ, S. T., DANIELSSON-THAM, M. L.(2005)

Identification and Characterization of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Isolates by PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis.

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

LANTZ, P. G., KNUTSSON, R., BLIXT, Y., ABU AL-SOUD, W., BORCH, E., RÅDSTRÖM, P. (1999)

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

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

LEAL, T. C. A., LEAL, N. C., DE ALMEIDA AMP (1999)

RAPD-PCR typing of *Yersinia enterocolitica* O:3 serotype strains isolated from pigs and humans.

Gen Mol Biol **22**, 315–319

LEE, V. T., ANDERSON, D. M., SCHNEEWIND, O. (1998)

Targeting of *Yersinia* Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE acrossbacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone.

Mol. Microbiol. **28**, 593-601

**LEE, L.A., GERBER, A.R., LONSWAY, M.S., SMITH, J.D., CARTER, G.P.,
NANCY, D.P., PARRISH, C.M., SIKES, R.K., FINTON, R.J., TAUXE, R.V.
(1990)**

Yersinia enterocolitica O:3 infections in infants and children,
associated with the household preparation of chitterlings
N. Engl. J. Med., **14**, 984- 987

LEE, V. T., SCHNEEWIND, O. (1999)

Type III machines of pathogenic yersiniae secrete virulence
factors into the extracellular milieu.
Mol. Microbiol. **31**, 1619-1629

LEWIS, R. J. (1993)

Hazardous Chemicals.
Van Nostran Reinhold, New York, USA, S. 1008

LI, H., BHADURI, S., MAGEE, W. E. (1998)

Maximizing plasmid stability and production of released proteins in
Yersinia enterocolitica.
Appl. Environ. Microbiol. **64**, 1812-1815

LINDE, H.- J., NEUBAUER, H., MEYER, H., ALEKSIC, S., LEHN, N. (1999)

Identification of *Yersinia* species by the Vitek GNI card.
J. Clin. Microbiol. **37**, 211-214

LINDSTEDT, B. A., HEIR, E., VARDUND, T., KAPPERUD G. (2000)

Fluorescent amplified-fragment length polymorphism genotyping
of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars and comparison
with pulsed-field gel electrophoresis typing.
J. Clin. Microbiol., **38**, 1623-1627

LOBATO, M. J., LANDERAS, E., GONZ'ALES-HEVIA, M. A., MENDOZA, M. C. (1998)

Genetic heterogeneity of clinical strains of *Yersinia enterocolitica* traced by ribotyping and relationships between ribotypes, serotypes, and biotypes.
J. Clin. Microbiol. **36**, 3297–3302

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

Yersinia spp. and numbers, with particular reference to *Y. enterocolitica* bio/serotypes, occurring on Irish meat and meat products, and the influence of alkali treatment on their isolation
Int. J. Food Microbiol. **33**, 257-274

MÄKI-IKOLA, O., HEESEMANN, J., TOIVANEN, A., GRANFORS, K. (1997)

High frequency of *Yersinia* antibodies in healthy populations in Finland and Germany.
Rheumatol. **16**, 227-229

MARMUR, J. (1961)

A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms.
J. Mol. Biol. **3**, 208-218

MARTIN, G. P., TIMMERS, E. (1997)

PCR and its modifications for the detection of infectious diseases.
In: Nucleic Acid Amplification Technologies.
Eaton Publishing, Natick, USA, 79-99

MASLOW, J.N., MULLIGAN, M.E., ARBEIT, R.D. (1993)

Molecular Epidemiology: Application of Contemporary Techniques to the Typing of Microorganisms.

Clinic. Inf. Dis. **17**, 153-164

MEHNERT, W. H., SCHÖNBERG, I., AMMON, A. (2001)

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

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, 11-13

MERCIER, B., GAUCHER, C., FEUGEAS, O., MAZURIER, C. (1990)

Direct PCR from whole blood, without DNA extraction.

Nucleic Acids Res. **18** (19), 5908

METZ, M., LINDE, H.-J., LEHN, N., EHRET, W. (1996)

Die Pulsfeld- Gelelektrophorese zur epidemiologischen Analyse pathogener Keime.

Biospektrum **5**, 53-54

MICHIELS, T., WATTIAU, P., BRASSEUR, R., RUYSSCHAERT, J. M., CORNELIS, G. (1990)

Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*.

Infect Immun. **58**, 2840-2849

MICHELIS, T., VANOOTEGHEM, J. C., LAMBERT-DE-ROUVROIT, C., CHINA, B., GUSTIN, A., BOUDRY, P., CORNELIS, G. R. (1991)

Analysis of *virC*, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*.

J. Bacteriol. **173**, 4994-5009

MIKULSKIS, A. V., DELOR, I., THI, V. H., CORNELIS, G. R. (1994)

Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin *yst* gene.

Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors.

Mol. Microbiol. **14**, 905-915

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

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

Infect. Immun. **56**, 1242-1248

MILLER, V. L., FARMER, J. J. 3RD, HILL, W. E., FALKOW, S. (1989)

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

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

MÜLLER, H.-J., BRUCHHAUS, I. (1997)

Problematik der Isolierung genomischer DNA.

Biospektrum **3**, 68-73

MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H. (1986)

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.

Cold Spring Herb. Symp. Quant. Biol. **51**, 263-273

NAIR, S., SCHREIBER, E., THONG, K.-L., PANG, T., ALTWEGG, M. (2000)

Genotypic characterization of *Salmonella typhi* by amplified fragment length polymorphism fingerprinting provides increased discrimination as compared to pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping.

J. Microbiol. Meth. 31, 35-43

NAJDENSKI, H., ITEMAN, I., CARNIEL, E. (1994)

Efficient subtyping of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by pulsedfield gel electrophoresis.

J. Clin. Microbiol. 32, 2913-2920

NAJDENSKI, H., ITEMAN, I., CARNIEL, E. (1995)

The Genome of *Yersinia enterocolitica* is the most stable of the three pathogenic Species.

Contr. Immunol. 13, 281-284

NAKAJIMA, H., INOUE, M., MORI, T., ITOH, K. I., ARAKAWA, E., WATANABE, H. (1992)

Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method.

J. Clin. Microbiol. 30, 2484-2486

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

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

Microbiol. Immunol. 38, 153-156

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

Die *Yersinia enterocolitica*- Infektion beim landwirtschaftlichen
Nutztier
Mh. Vet. Med., **41**, 23-26

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

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

NESBAKKEN, T. (1992)

Epidemiological and food hygienic aspects of *Yersinia*
enterocolitica with special reference to the pig as a suspected
source of infection.
[Dissertation Med. Vet.], Oslo, Norwegen.

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

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

**NEUBAUER, H., REISCHL, U., KÖSTLER, J., ALEKSIC, S., FINKE, E.-J.,
MEYER, H. (1999)**

Variations in the 16S rRNA gene sequence of *Yersinia*
enterocolitica isolates influence the specificity of molecular
identification systems.
Zbl. Bakteriologie **286**, 329-337

NEUBAUER, H., ALEKSIC, S., HENSEL, A., FINKE, E.-J., MEYER, H. (2000a)

Yersinia enterocolitica 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups.

Int. J. Med. Microbiol. **290**, 61-64

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

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

Sys. Appl. Microbiol. **23**, 58-62

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

Die Diagnostik von *Yersinia enterocolitica*- Infektionen: Eine Übersicht über klassische Nachweistechiken und neue molekularbiologische Methoden.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **114**, 1-7

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

Yersinia enterocolitica- Infektionen: 1 Bedeutung bei Tieren

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **114**, 8-12

NEWTON, C. R., GRAHAM, A. (1997)

In: PCR.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 19-46.

NILÉHN, B. (1969)

Studies on *Yersinia enterocolitica*: Growth on various solid media at 37 °C and 25 °C.

Acta Path. Microbiol. Scand. **77**, 685-697

NISKANEN, T., WALDENSTRÖM, J., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., OLSEN, B., KORKEALA, H. (2003)

virF-Positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* Found in Migratory Birds in Sweden.
Appl. Envir. Microbiol. **69**, 4670–4675

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

Detection of *Yersinia enterocolitica* in food by PCR amplification.
Lett. Appl. Microbiol. **26**, 140-141

NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS (1996)

Yersinia enterocolitica – Detection in foods.
Nordic committee on food analysis, **117**, 3rd edition

ODINOT, P. T., MEIS, J. F. G. M., VAN DEN HURK, P. J. J. C., HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A. A., MELCHERS, W. J. G. (1995)

PCR-based characterisation of *Yersinia enterocolitica*: comparison with biotyping and serotyping.
Epidemiol. Infect. **115**, 269-277

ÖLSCHLÄGER, T., HACKER, J. (2000)

Proteinsekretionssysteme.
In: Heesemann, J., Hacker, J. (Hrsg.): Molekulare Infektionsbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 91-95.

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

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

Schweiz. Arch. Tierheilk. **141** (11), 509-515

OLIVE, D. M., BEAN, P. (1999)

Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms.

J. Clin. Microbiol. **37**, 1661-1669

ON, S. L., HARRINGTON, C. S. (2000)

Identification of taxonomic and epidemiological relationships among *Campylobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles.

FEMS Microbiol. Lett. **193**, 161-169

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

Sources of sporadic *Yersinia enterocolitica* infections in Norway: a prospective casecontrol study.

Epidemiol. Infect., **112**, 133-141

PAERREGAARD, A., ESPERSEN, F., JENSEN, O.M., SKURNIK, M. (1991)

Interaction between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vehicles.

Infect. Immun. **59**, 253- 260

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

Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*.
Infect. Immunol. **19**, 908-911

PEDERSON, K. J., CARLSON, S., PIERSON, D. E. (1997)

The ClpP protein, a subunit of the Clp protease, modulates *ail* gene expression in *Yersinia enterocolitica*.
Mol. Microbiol. **26**, 99-107

PEPE, J.C., MILLER, V.L. (1993)

Yersinia enterocolitica invasion: a primary role in the initiation of infection.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **90**, 6473-7477

PICHARDT, K. (1989)

Lebensmittelmikrobiologie - Grundlagen für die Praxis.
Springer Verlag, Berlin

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

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

PIERSON, D. E., FALKOW, S. (1993)

The *ail* gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing.
Infect. Immunol. **61**, 1846-1852.

PORTNOY, D. A., MOSELEY, S. L., FALKOW, S. (1981)

Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis.

Infect. Immun. **31**, 775-782

PORTNOY, D. A., MARTINEZ, R. J. (1985)

Role of a plasmid in the pathogenicity of *Yersinia* species.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. **118**, 29-51

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

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

J. Clin. Microbiol. **18**, 486-490

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

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

J. Clin. Microbiol., **22**, 105- 110

RADZIEJEWSKA-LEBRECHT, J., SHASHKOV, A. S., STROOBANT, V., WARTENBERG, K., WARTH, C., MAYER, H. (1994)

The inner core region of *Yersinia Enterocolitica* Ye75R (0:3) lipopolysaccharide.

Eur. J. Biochem. **221**, 343-351

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

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

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

ROBERT KOCH- INSTITUT (2002)

Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten.
Epidemiol. Bull. Nr. **3**, Robert-Koch-Institut, www.rki.de/INFEKT/EPIBULL/2002/03_02.PDF, 22-23

ROCOURT, J. (1994)

Listeria monocytogenes: The state of the science.
Dairy Food Environ. Sanit. **14**, 70-82

ROLFS, A., SCHULLER, I., FINCKH, U., WEBER-ROLFS, I. (1992)

1. PCR Principles and Reaction Components.
In: PCR: Clinical Diagnostics and Research.
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, S. 1-7

ROSQVIST, R., MAGNUSSON, K. E., WOLF-WATZ, H. (1994)

Target cell contact triggers expression and polarized transfer of
Yersinia YopE cytotoxin into mammalian cells.
EMBOL J. **13**, 964-972

ROSSEN, L., NORSKOV, P., HOLMSTROM, K., RASMUSSEN, O. F. (1992)

Inhibition of PCR by components of food samples, microbial
diagnostic assays and DNA-extraction solutions.
Int. J. Food Microbiol. **17**, 37-45

RUCKDESCHEL, K., ROGGENKAMP, A., SCHUBERT, S., HEESEMANN, J. (1996)

Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors
to evasion of microbicidal action of neutrophils.
Infect. Immun. **64**, 724-733

RYCHLIK, W. (1995)

Selection of primers for polymerase chain reaction.
Mol. Biotechnol. **3**, 129-134

SAMADI, A.R., WACHSMUTH, K., HUQ, M.I., MAHBUB, M., AGBONLAHOR, D.E. (1982)

An attempt to detect *Yersinia enterocolitica* infection in Dacca, Bangladesh.
Trop. Geograph. Med. **34**, 151-154

SAKEN, E., ROGGENKAMP, A., ALEKSIC, S., HEESEMANN, J. (1994)

Characterisation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroups by pulsed-field gel electrophoresis of genomic *NotI* restriction fragments.
J. Med. Microbiol. **41**, 329–338

SANTURDE, G., DA SILVA, N., VILLARE, R., TABARÉS, E., SOLANA, A., BAUTISTA, J. M., CASTRO, J. M. (1996)

Rapid and high sensitivity test for the direct detection of bovine herpesvirus – 1 genome in clinical samples.
Vet. Microbiol. **49**, 81-92

SAVELKOUL, P. H., AARTS, H. J., DE HAAS, J., DIJKSHOORN, L., DUIM, B., OTSEN, M., RADEMAKER, J. L., SCHOULS, L., LENSTRA, J. A. (1999)

Amplified fragment length polymorphism analysis: the state of an art.
J. Clin. Microbiol. **37**, 3083-3091

SCHIEMANN, D.A. (1979)

Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*.
Can. J. Microbiol. **25**, 1298-1304

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

Relationship of HeLa cell infectivity to biochemical, serological and virulence characteristics of *Yersinia enterocolitica*.
Infect. Immunol. **35** (2), 497-506

SCHIEMANN, D.A. (1983)

Alkalotolerance of *Yersinia enterocolitica* as a basis for selective isolation from food enrichments.
Appl. Environ. Microbiol. **46**, 22- 27

SCHIEMANN, D. A., SWANZ, P. J. (1985)

Epithelial cell association and hydrophobicity of *Yersinia enterocolitica* and related species.
J. Med. Microbiol. **19** (3), 309-315

SCHIEMANN, D.A. (1989)

Yersinia enterocolitica and *Yersinia pseudotuberculosis*
In: Foodborne Bacterial Pathogens, Doyle M.P. (ed.)
Marcel Dekker, New York

SCHIEMANN, D.A., WAUTERS, G. (1992)

Yersinia.
In: Vanderzant, C., Splitstoesser, D.F. (Hrsg.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, American Public Health Association, Washington, USA, 3rd ed., S. 433- 450

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

An unidentified microorganism resembling *B. liegnieri* and *Past. Pseudotuberculosis* and pathogenic for man.

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

SCHMITZ, F.-J., GEISEL, R., RING, A., WAGNER, S., HEINZ, H.P. (1995)

Molekulare Epidemiologie bei nosokomialen Infektionen-Vergleich verschiedener Typisierungsverfahren.

Clin. Lab. **41**, 991-1001

SCHOCHETMAN, G., OU, C., JONES, W. K. (1988)

Polymerase chain reaction.

J. Infect. Dis. **158** (6), 1154-1157

SCHOULS, L.M., REULEN, S., DUIM, B., WAGENAAR, J. A., WILLEMS, R. J. L., DINGLE, K. E., COLLES, F. M., VAN EMBDEN, J. D. A. (2003)

Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination.

J. Clin. Microbiol. **41**, 15-26

SCHWARTZ, D. C., CANTOR, C. R. (1984)

Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis.

Cell **37**, 67-75

SEELIGER, P.R., SCHRÖTER, G. (1990)

Medizinische Mikrobiologie: Labordiagnostik und Klinik
Verlag Urban & Schwarzenberg, München, 2. Aufl.

SELBITZ, H.-J. (1992)

Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie
Gustav Fischer Verlag Jena

SHAYEGANI, M., MAUPIN, P. S., WARING, A. (1995)

Prevalence and molecular typing of two pathogenic serogroups of
Yersinia enterocolitica in New York State.
Contrib. Microbiol. Immunol. **13**, 33–38

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

Colonization in the tonsils of swine by *Yersinia enterocolitica*.
Contrib. Microbiol. Immunol. **12**, 63 – 67

**SKURNIK, M., NURMI, T., GRANFORS, K., KOSKELO, M., TIILIKAINEN, A.
S. (1983)**

Plasmid associated antibody production against *Yersinia*
enterocolitica in man.
Scand. J. Infect. Dis. **15**, 173-177

SKURNIK, M., BÖLIN, I., HEIKKINEN, H., PIHA, S., WOLF-WATZ, H. (1984)

Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp.
J. Bacteriol., **158**, 1033- 1036

SKURNIK, M., TOIVANEN, P. (1992)

LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* gene of
Yersinia enterocolitica and *Yersinia pseudotuberculosis*.
J. Bacteriol. **174**, 2047-2051

SKURNIK, M., MIKKOLA, P., TOIVANEN, P., TERTTI, R. (1996a)

Passive immunisation with monoclonal antibodies specific for lipopolysaccharide (LPD) O- side chain protects mice against intravenous *Yersinia enterocolitica* serotyp O:3 infection.

APMIS **104**, 598- 602

SKURNIK, M., ZHANG, L. (1996b)

Molecular genetics and biochemistry of *Yersinia* lipopolysaccharide.

APMIS **104**, 849- 872

SKURNIK, M., VENHO, R., BENGOCHEA, J. A., MORIYON, I. (1999)

The lipopolysaccharide outer core of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is required for virulence and plays a role in outer membrane integrity.

Mol. Microbiol. **31**, 1443-1462

SKWARK M., NAWROTEK P., FUROWICZ A. J. (2004)

Comparison of selected *Enterobacteriaceae* strains using the PCR-RFLP method.

Mewet. Lublin. Poland **60**, 721-723

SORY, M.-P., CORNELIS, G. R. (1994)

Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into THelLa cells.

Mol. Microbiol. **14**, 583 – 594

SPEIJER, H., SAVELKOUL, P. H. M., BONTEN, M. J., STOBBERINGH, E. E., TJHIE, J. H. T. (1999)

Application of Different Genotyping Methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a Setting of Endemicity in an Intensive Care Unit.
J. C. Microbiol. 37, 3654-3661

SWAMINATHAN, B., BARRETT, T. J., HUNTER, S. B., TAUXE, R. V. (2001)

PulseNet The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States
Emerg. Infect. Dis. 7, 382-384

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

Yersinia enterocolitica infections and pork: the missing link.
Lancet 1: 1129-1132

TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P. A., MURRAY, B. E., PERSING, D. H., SWAMINATHAN, B. (1995)

Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.
Journal of Clinical Microbiol. 33, 2233-2239

THIBODEAU, V., FROST, E. H., CHÉNIER, S., QUESSAY, S. (1999)

Presence of *Yersinia enterocolitica* in tissues of orally inoculated pigs and the tonsils and faeces of pigs at slaughter.
Can. J. Vet. Res. 63, 96-100

TREBESIOUS, K., HARMSSEN, D., RAKIN, A., SCHMELZ, J., HEESEMANN, J. (1998)

Development of rRNA-targeted PCR and *in situ* hybridisation with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species.

J. Clin. Microbiol. **36**, 2557-2564

TYLER, K. D., WANG, G., TYLER, S. D., JOHNSON, W. M. (1997)

Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens.

J. Clin. Microbiol. **35**, 339–346

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

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

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

VESIKARI, T., NURMI, T., MAKI, M., SKURNIK, M., SUNDQVIST, C., GRANFORS, K., GRONROOS, P. (1981)

Plasmids in *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and O:9: correlation with epithelial cell adherence in vitro.

Infect. Immunol. **33**, 570-576

VIRDI, J., SACHDEVA, P. (2005)

Molecular heterogeneity in *Yersinia enterocolitica* and “*Y. enterocolitica*-like” species – Implications for epidemiology, typing and taxonomy.

FEMS Immunol Med Microbiol **45**, 1–10

VISSER, L. G., HIEMSTRA, P. S., VAN DEN BARSELAAR, M. T., BALLIEUX, P. A., VAN FURTH, R. (1996)

Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes.

Infect. Immunol. **64**, 1653-1658

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DER LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. UND ZABEAU, M. (1995)

AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.

Nucleic Acids Res. **23**, 4407-4414

WALLACE, D. M. (1987):

Large- and small-scale phenol extractions.

Methods Enzymol. **15**, 33-41

WALSH, P. S., METZGER, D. A., HIGUCHI, R. (1991)

Chelex®100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material.

BioTechniques **10** (4), 506-513

WASSENAAR, T. M., NEWELL, D. G. (2000)

Genotyping of *Campylobacter* spp.

Appl. Environ. Microbiol. **66**, 1-9

WASSENAAR, T. M., ON, S. L. W., MEINERSMANN, R. (2000)

Genotyping and the consequences of genetic instability.

In: Nachamkin, I. und Blaser, M. J. (Hrsg.): *Campylobacter*.

Am. Society for Microbiol., Washington, D. C., **2nd edition**, 369-380

WAUTERS, G. (1981)

Yersinia enterocolitica.

In: Bottone E.J.

CRC Press Inc., Boca Raton, Florida

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

Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*

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

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

New enrichment method for isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* Serogroup O:3 from Pork

Appl. Environ. Microbiol., **54**, 851- 854

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

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

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

WINTER, P., DRIESEL, A.J. (1988)

Auftrennung von DNS-Molekülen in Chromosomengröße durch Gelelektrophorese in alternierenden elektrischen Feldern.

Biotech Forum **5**, 108-114

WREN, B. T., TABAQCHALI, S. (1990)

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

Lancet **336**, 693

**ZHANG, L., RADZIEJEWSA-LEBRECHT, J., KRAJEWSA-PIETRASI, D.,
TOIVANEN, P., SURNI, M. (1997)**

Molecular and chemical characterization of the lipopolysaccharide
O-antigen and its role in the virulence of *Yersinia enterocolitica*
serotype O:8.

Mol Microbiol. **29**, 69-76

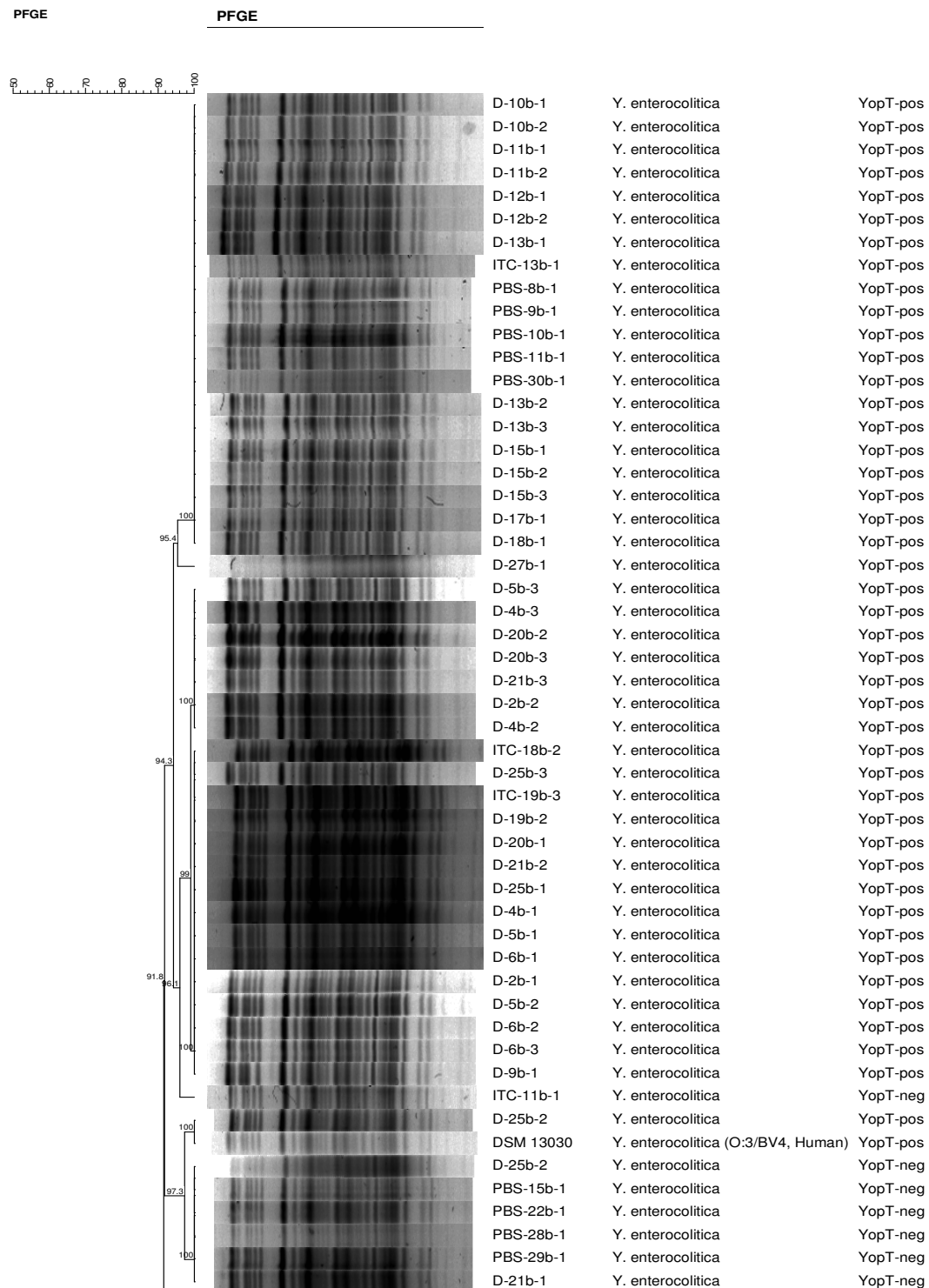
**ZINK, D. L., FEELEY, J. C., WELLS, J. G., VANDERZANT, C., VICKERY, J.
C., ROOF, W. D., O'DONOVAN, G. A. (1980)**

Plasmid-mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica*.

Nature **283**, 5743, 224-226

10 Anhang

Abbildung 6: Dendrogramm zur PFGE- Typisierung der *Yersinia* spp.- Isolate aus Durchgang B (2. Tag post Infectionem)



Fortsetzung auf nächster Seite

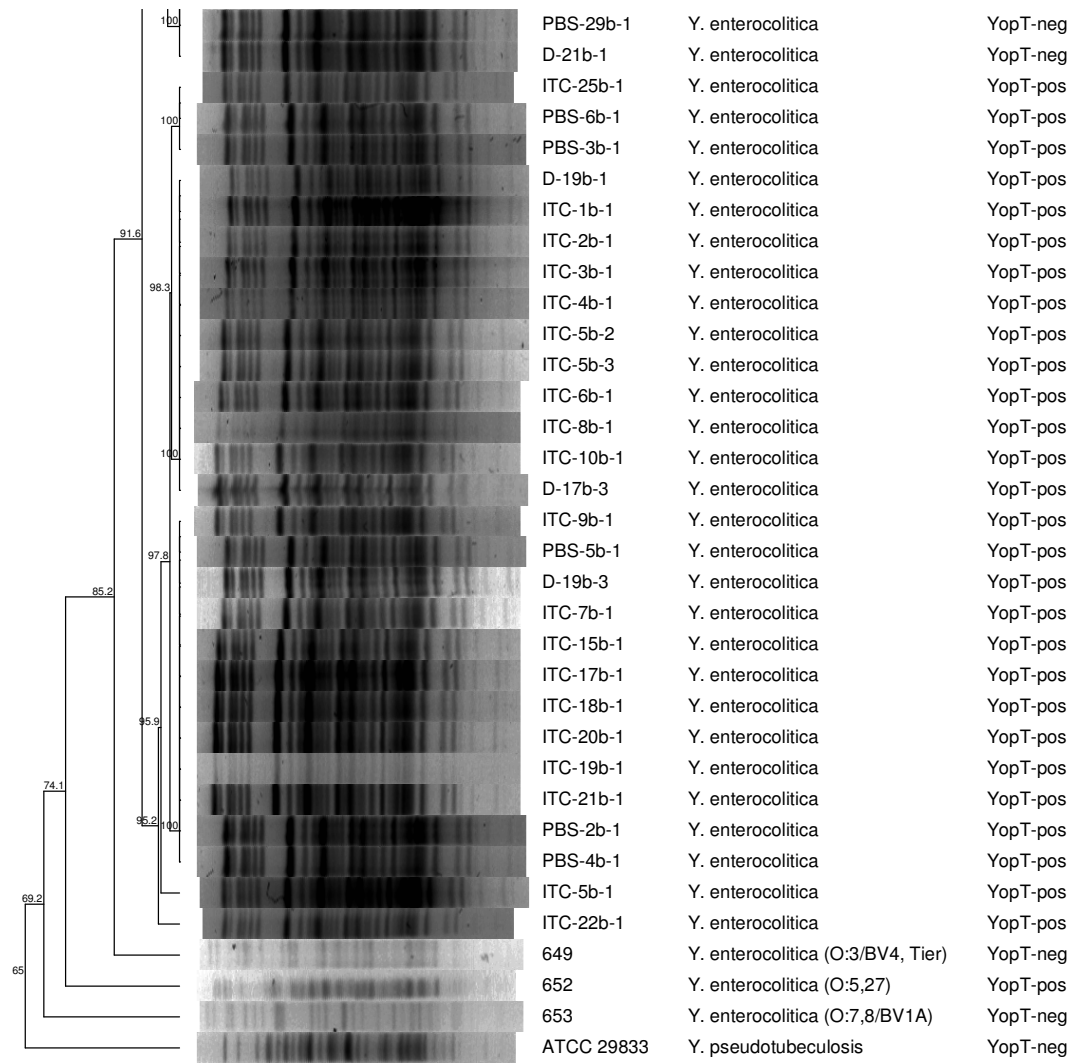


Abbildung 7: Dendrogramm zur PFGE- Typisierung der *Yersinia* spp.- Isolate aus Durchgang C (4. Tag post Infectionem)

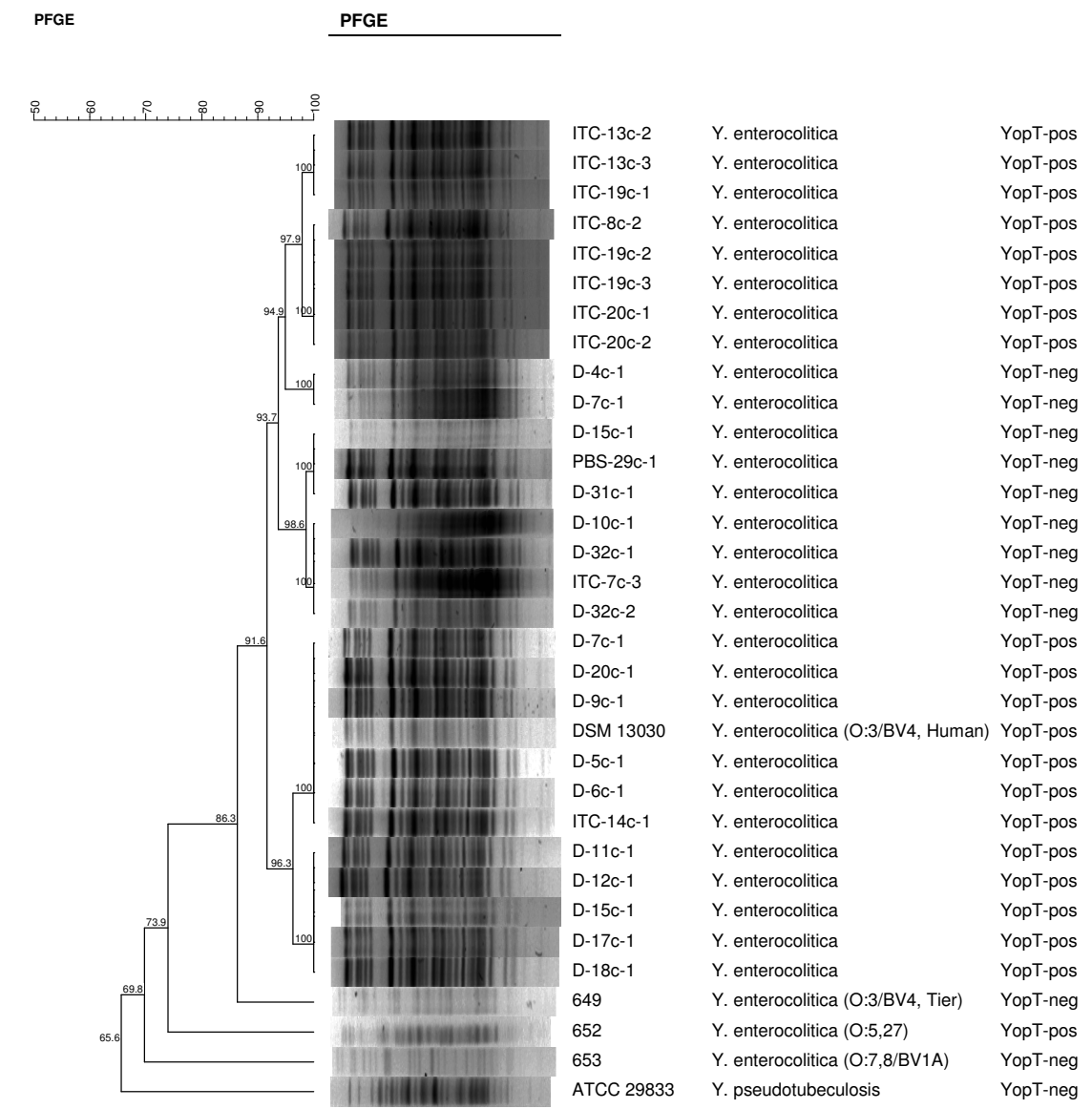


Abbildung 8: Dendrogramm zur PFGE- Typisierung der *Yersinia* spp.- Isolate aus Durchgang D (6. Tag post Infectionem)

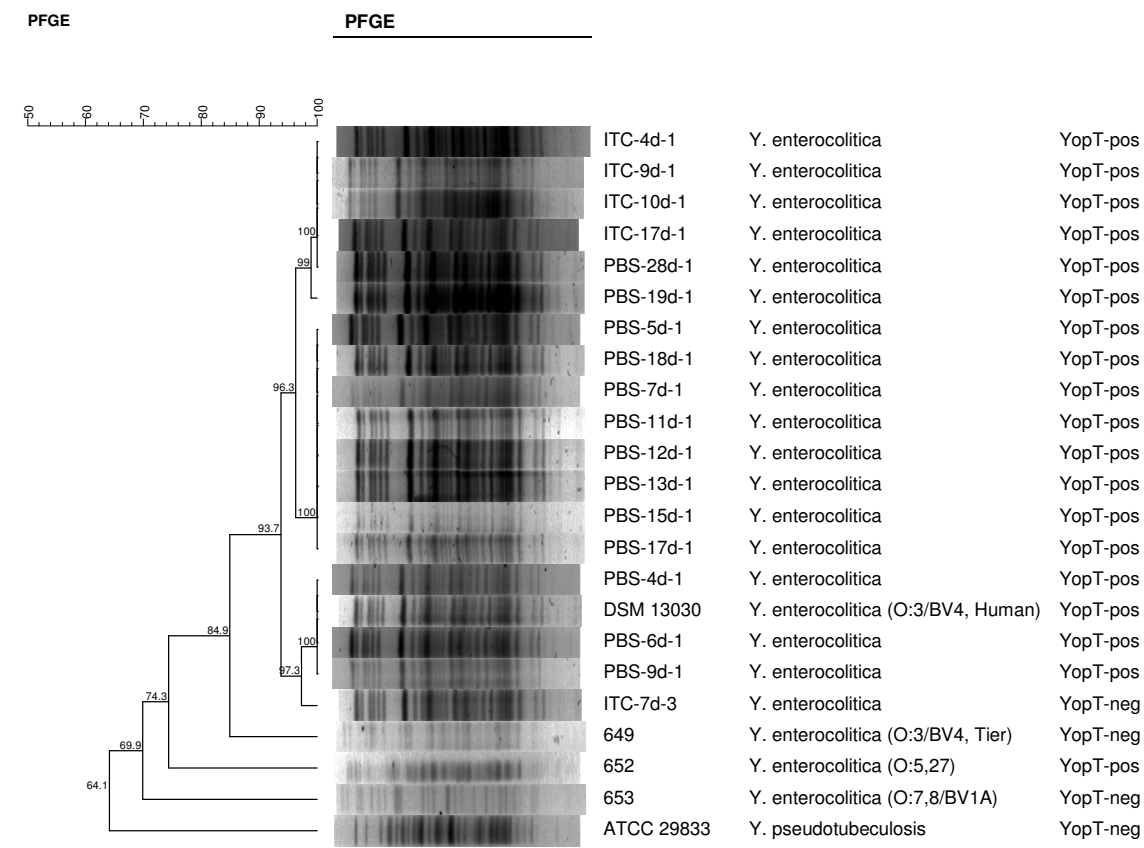


Abbildung 9: Dendrogramm zur PFGE- Typisierung der *Yersinia* spp.- Isolate aus Durchgang E (8. Tag post Infectionem)

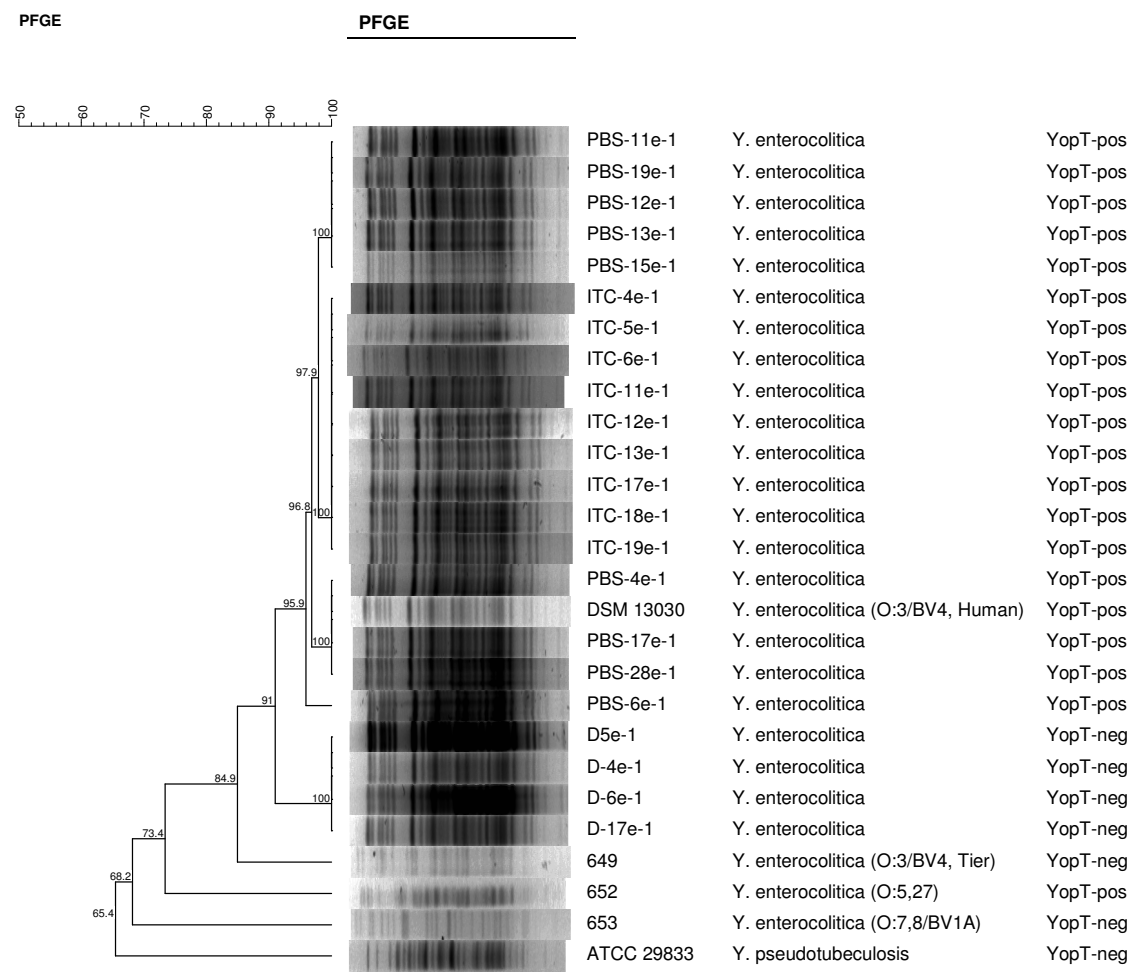


Abbildung 10: Dendrogramm zur PFGE- Typisierung der *Yersinia* spp.- Isolate aus Durchgang F (12. Tag post Infectionem)

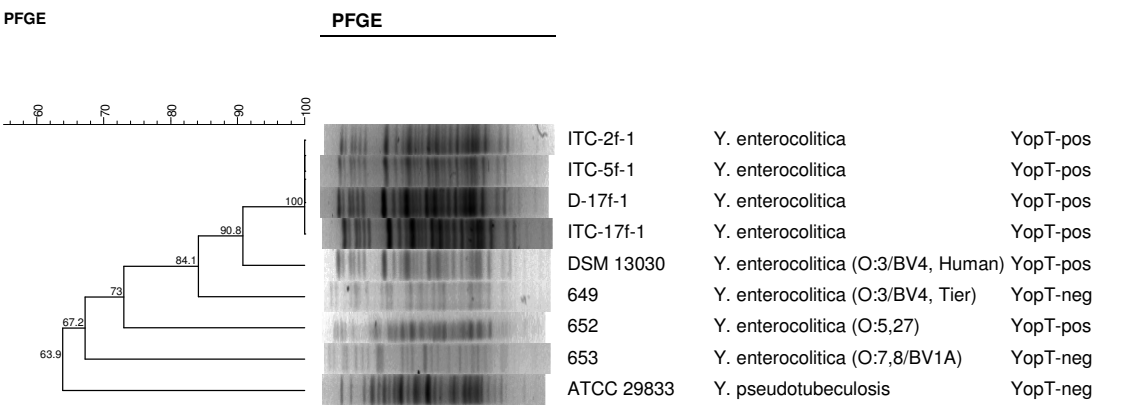
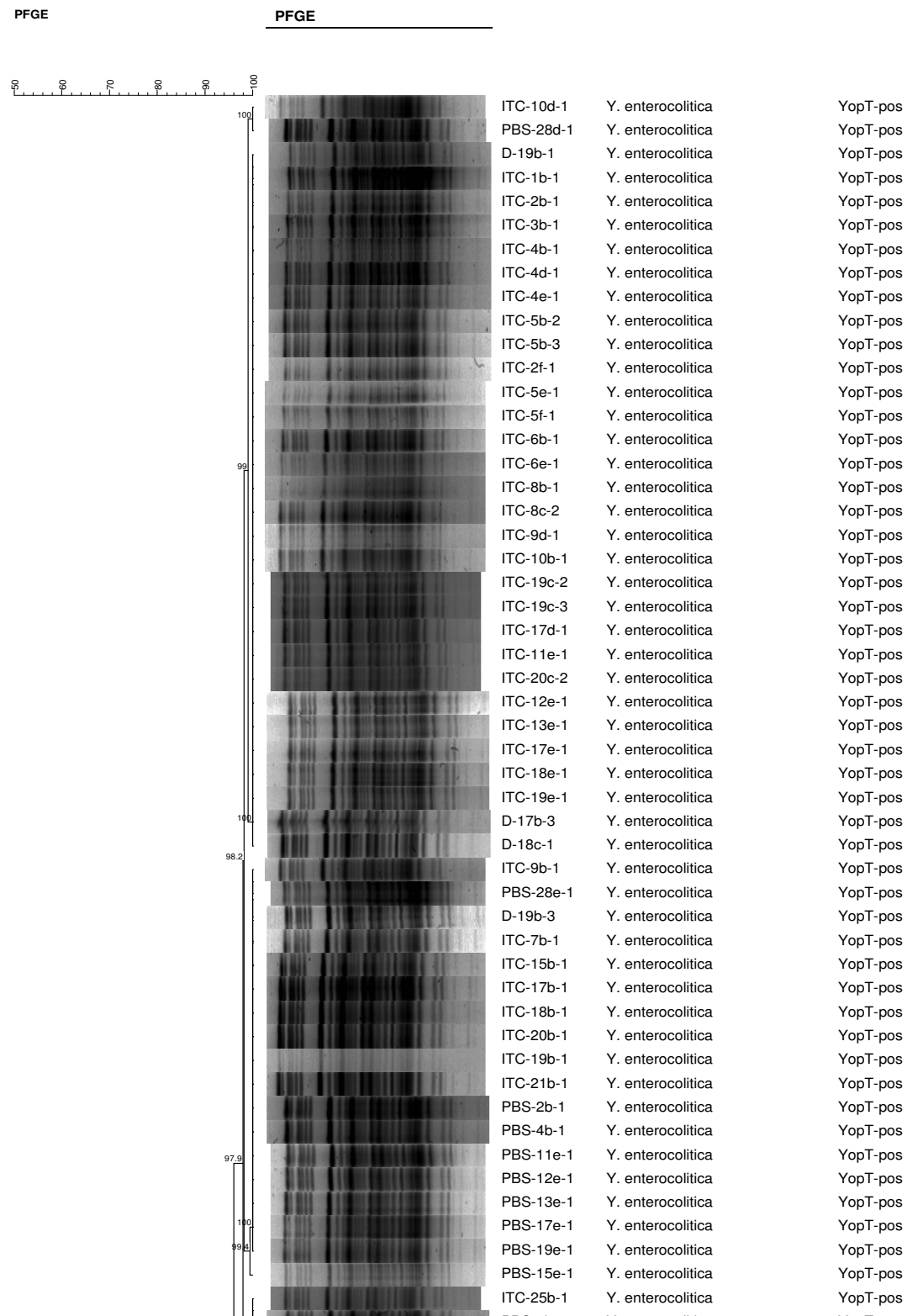
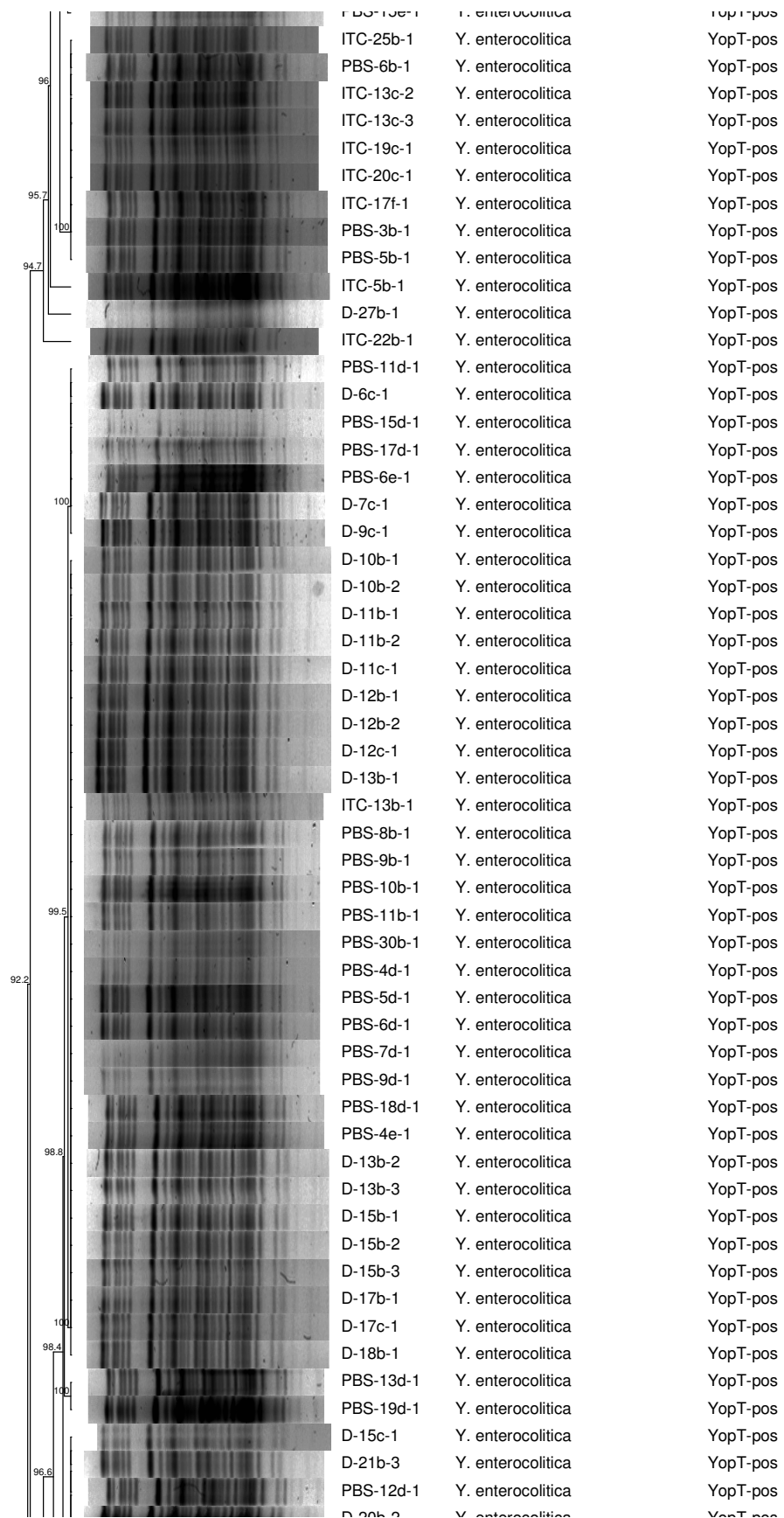


Abbildung 11: Dendrogramm zur PFGE- Typisierung der *Yersinia* spp.- Isolate aus Alle Durchgänge

Fortsetzung auf nächster Seite



Fortsetzung auf nächster Seite

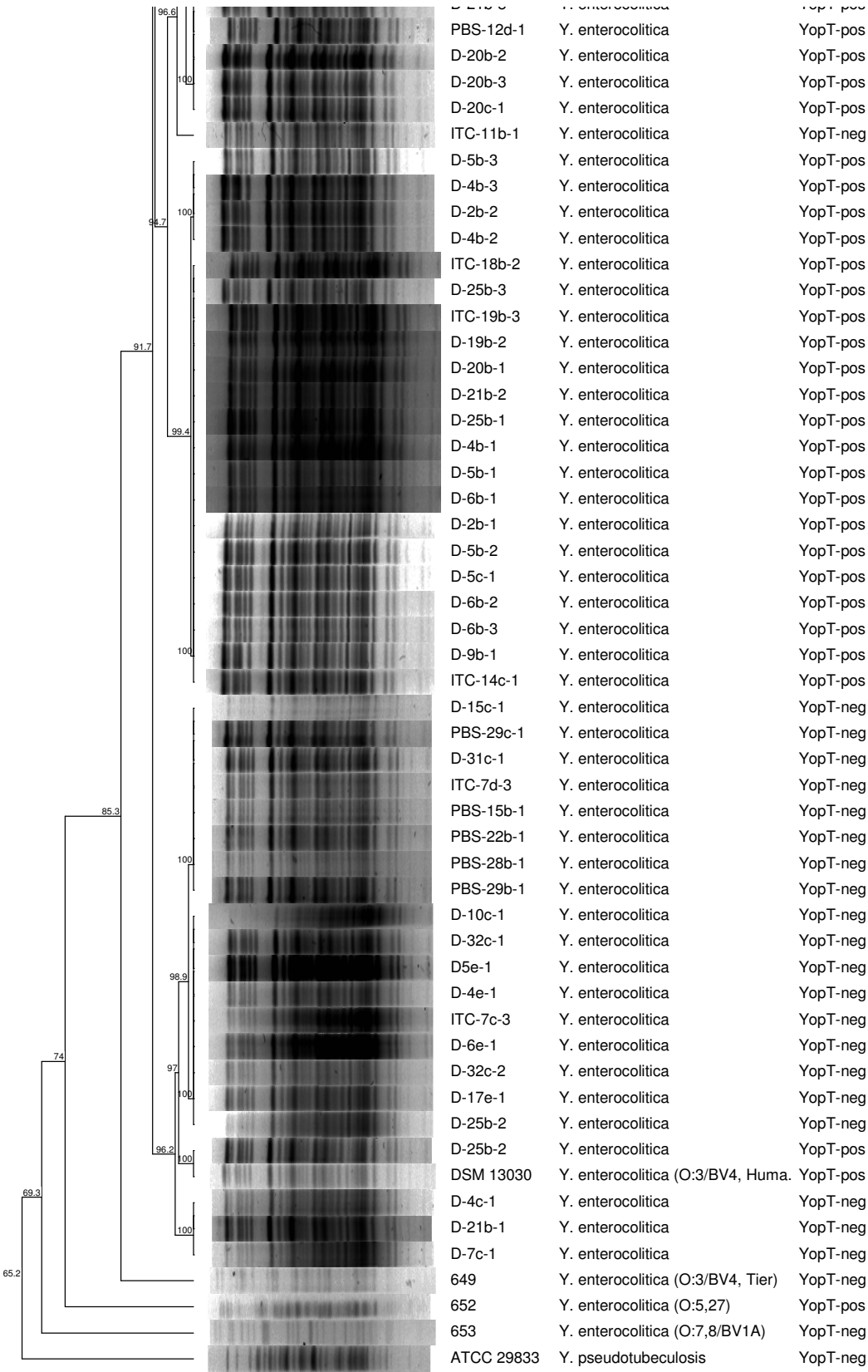
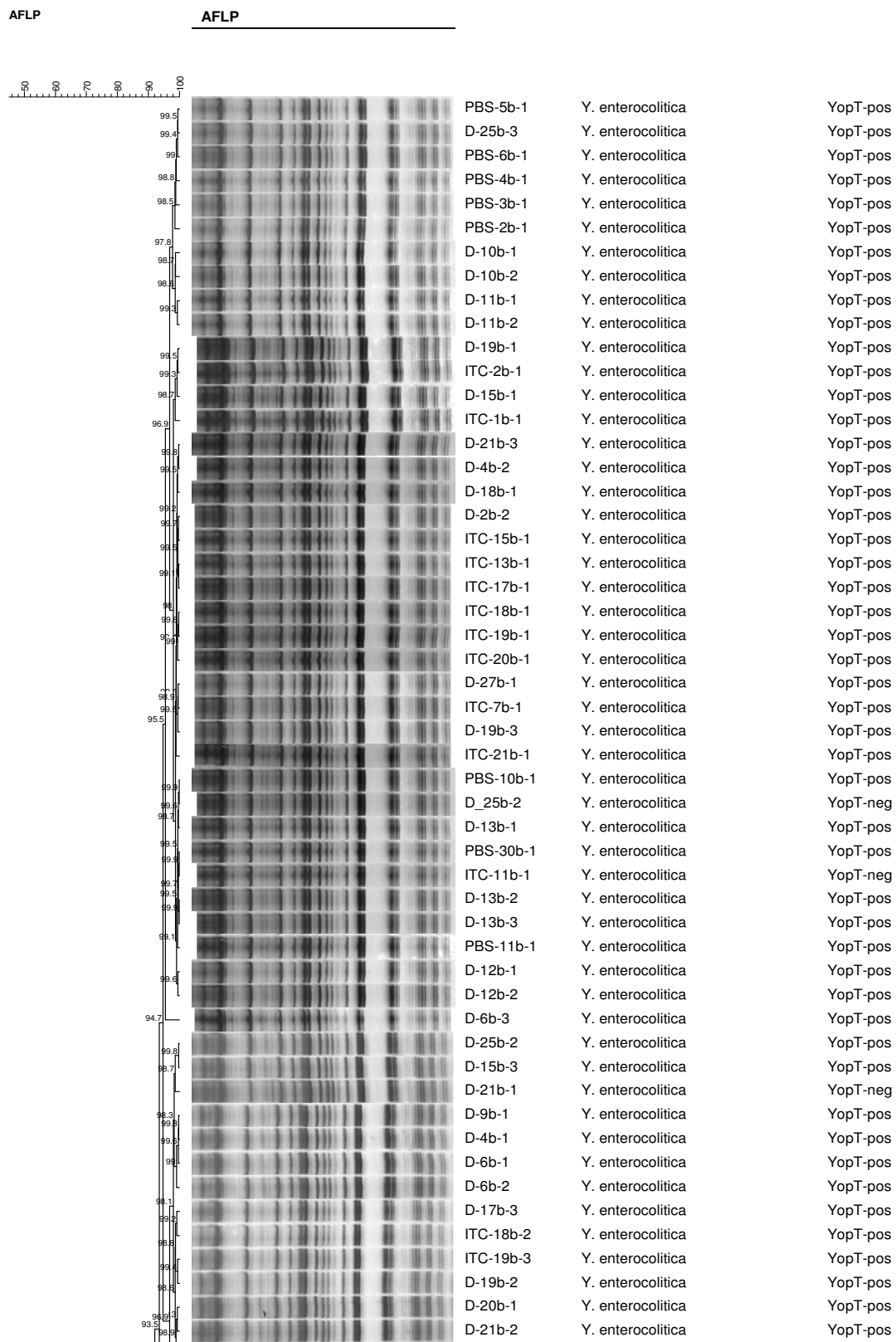
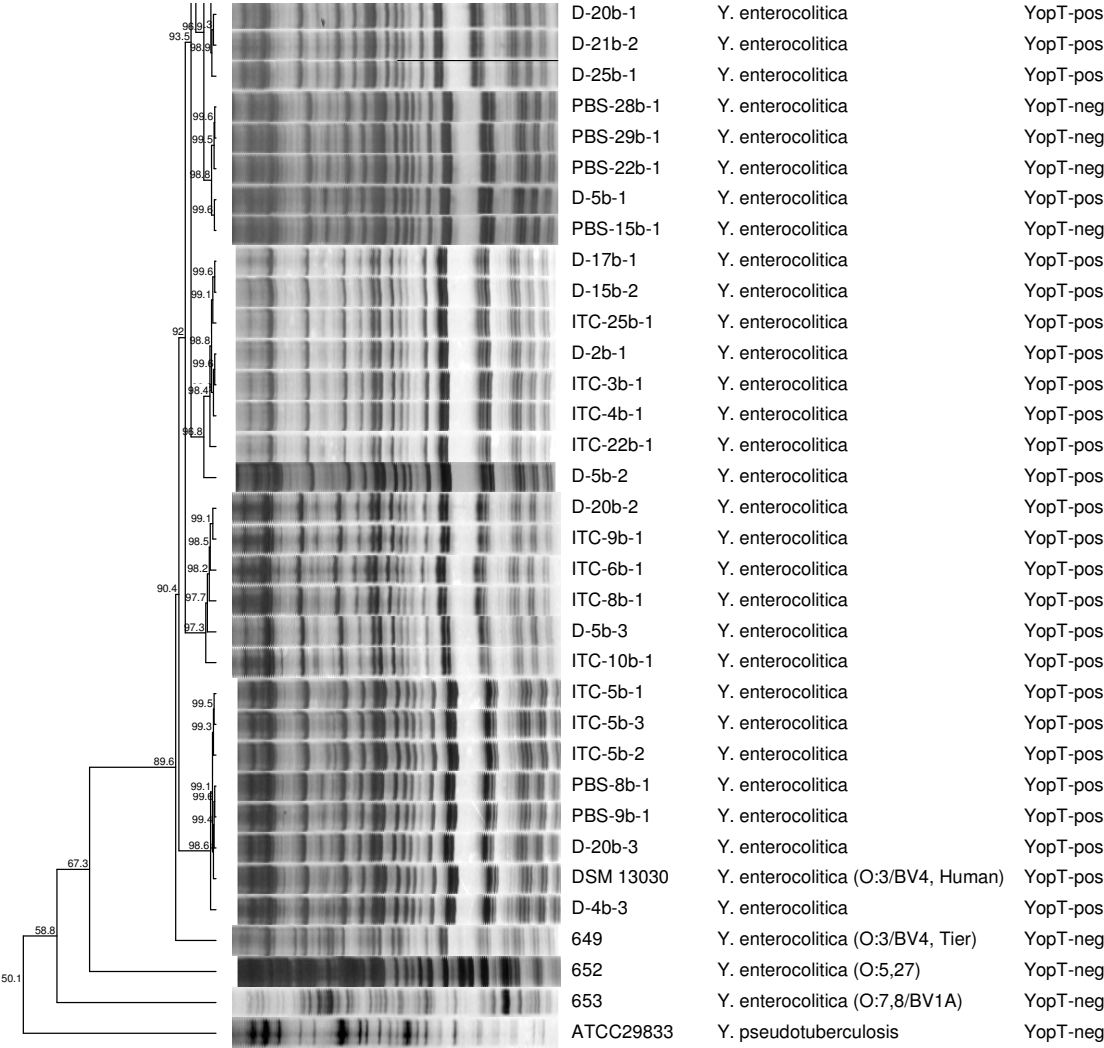


Abbildung 15: Dendrogramm zur AFLP- Typisierung der *Yersinia* spp.- Isolate aus Durchgang B (2. Tag post Infectionem)



Fortsetzung auf nächster Seite



AFLP

AFLP

Strain	Y. enterocolitica	YopT-pos
D-6c-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
ITC-14c-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
ITC-20c-2	Y. enterocolitica	YopT-pos
D-17c-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
DSM 13030	Y. enterocolitica (O:3/BV4, Human)	YopT-pos
ITC-20c-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
ITC-19c-3	Y. enterocolitica	YopT-pos
D-31c-1	Y. enterocolitica	YopT-neg
D-9c-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
D-5c-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
D-31c-2	Y. enterocolitica	YopT-neg
D-4c-1	Y. enterocolitica	YopT-neg
ITC-19c-2	Y. enterocolitica	YopT-pos
ITC-19c-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
D-20c-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
D-18c-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
D-15c-1	Y. enterocolitica	YopT-neg
ITC-13c-2	Y. enterocolitica	YopT-pos
PBS-29c-1	Y. enterocolitica	YopT-neg
D-7c-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
ITC-7c-3	Y. enterocolitica	YopT-neg
ITC-8c-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
ITC-13c-3	Y. enterocolitica	YopT-pos
D-32c-1	Y. enterocolitica	YopT-neg
D-10c-1	Y. enterocolitica	YopT-neg
D-32c-2	Y. enterocolitica	YopT-neg
D-15c-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
D-9c-1	Y. enterocolitica	YopT-neg
D-12c-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
649	Y. enterocolitica (O:3/BV4, Tier)	YopT-neg
652	Y. enterocolitica (O:5,27)	YopT-neg
653	Y. enterocolitica (O:7,8/BV1A)	YopT-neg
ATCC29833	Y. pseudotuberculosis	YopT-neg

Abbildung 17: Dendrogramm zur AFLP- Typisierung der *Yersinia* spp.- Isolate aus Durchgang D (6. Tag post Infectionem)

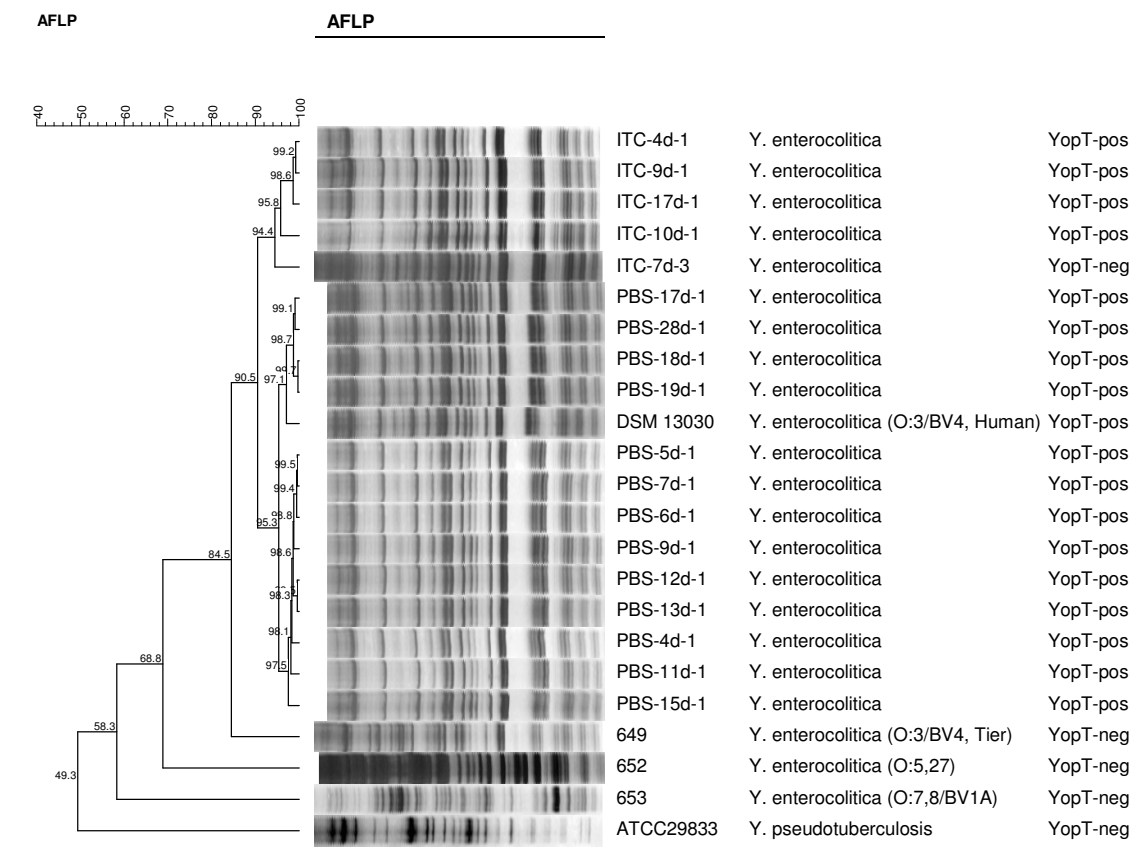


Abbildung 18: Dendrogramm zur AFLP- Typisierung der *Yersinia* spp.- Isolate aus Durchgang E (8. Tag post Infectionem)

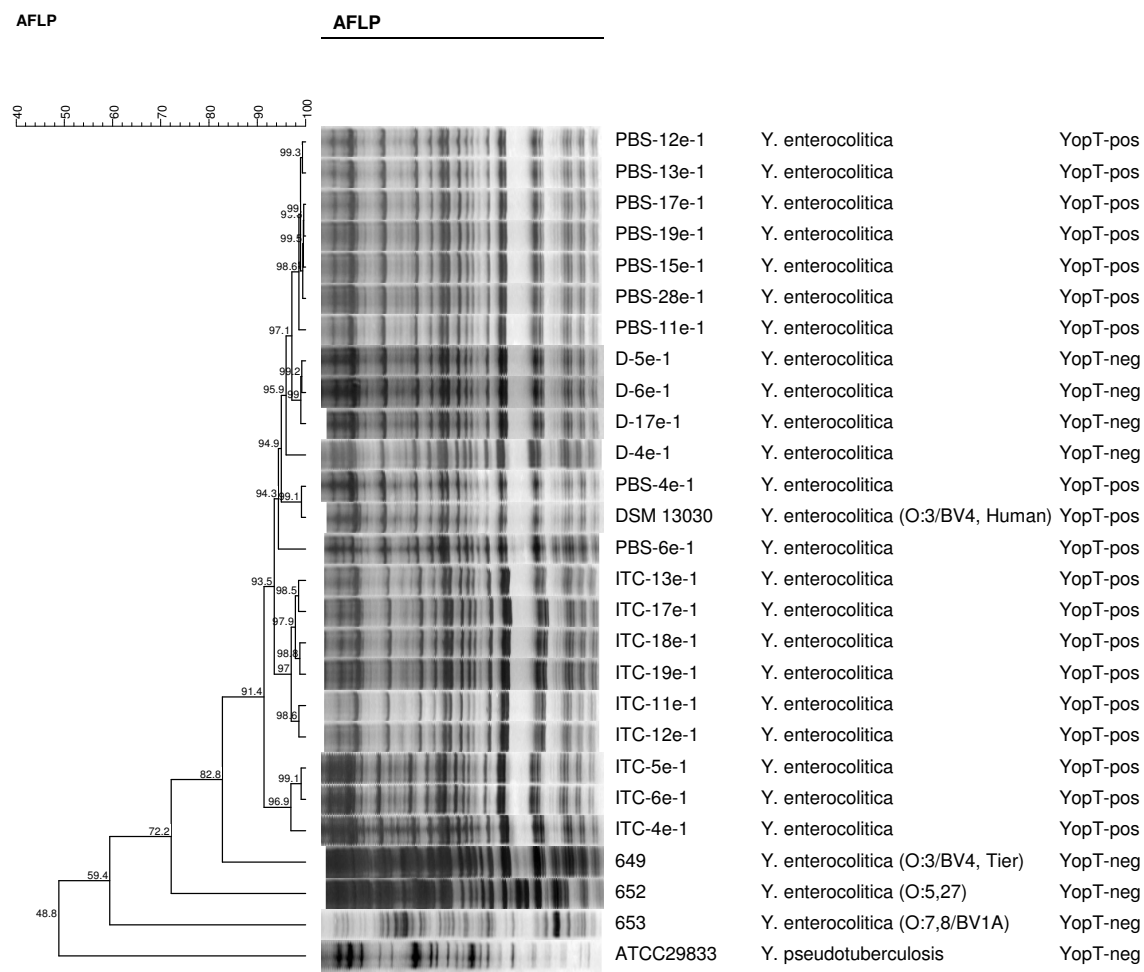


Abbildung 19: Dendrogramm zur AFLP- Typisierung der *Yersinia* spp.- Isolate aus Durchgang F (10. Tag post Infectionem)

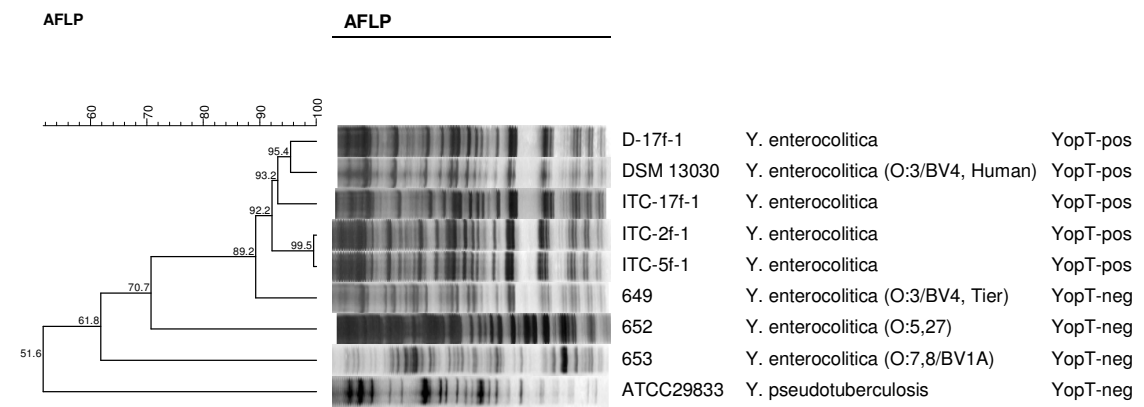
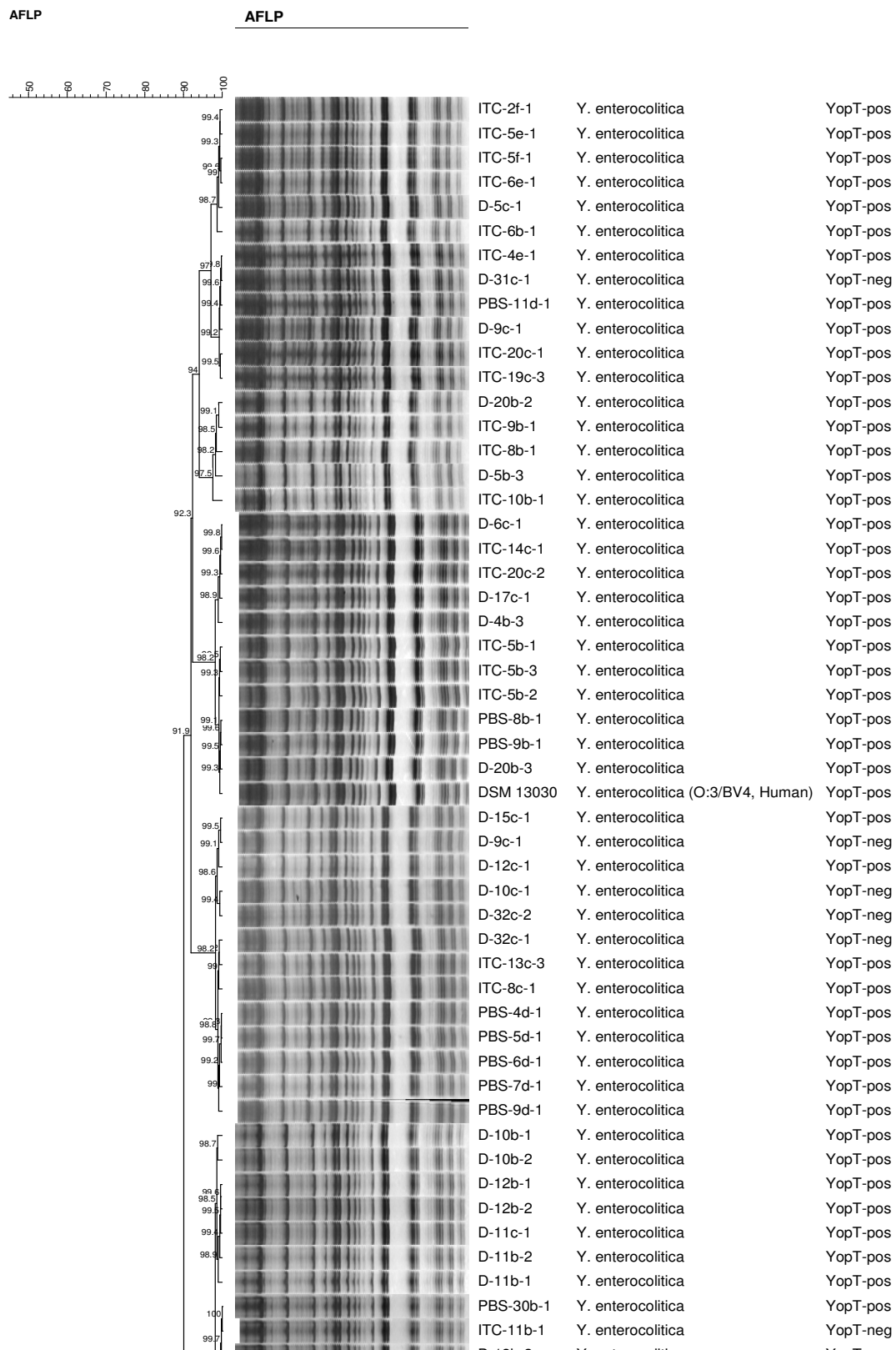


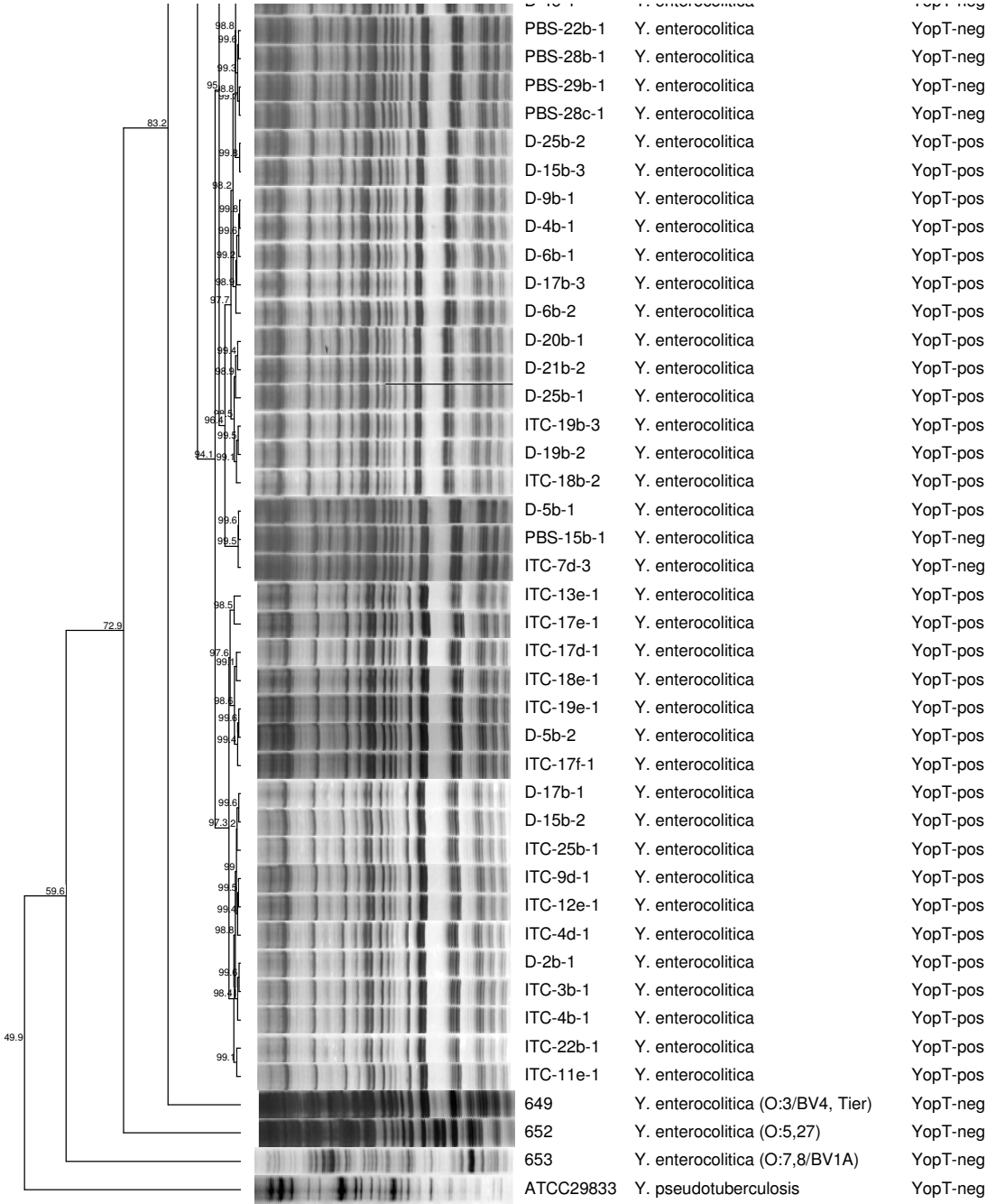
Abbildung 20: Dendrogramm zur AFLP- Typisierung der *Yersinia* spp.- Isolate aus alle Durchgänge



Fortsetzung auf nächster Seite

100		PBS-30b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		ITC-11b-1	Y. enterocolitica	YopT-neg
100		D-13b-2	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.5		D-13b-3	Y. enterocolitica	YopT-pos
100		PBS-10b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.5		D_25b-2	Y. enterocolitica	YopT-neg
98.2		D-13b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.2		D-17e-1	Y. enterocolitica	YopT-neg
100		PBS-11b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.8		D-5e-1	Y. enterocolitica	YopT-neg
99.8		D-4b-2	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.8		D-21b-3	Y. enterocolitica	YopT-pos
98.8		D-18b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.1		D-17f-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.4		D-19b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.4		ITC-2b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
98.7		D-15b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
97.2		ITC-18b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.5		ITC-19b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.3		D-6e-1	Y. enterocolitica	YopT-neg
99.1		ITC-20b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.1		ITC-21b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.1		D-2b-2	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.2		ITC-15b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.2		ITC-13b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.2		ITC-17b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
97.2		D-27b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.6		ITC-7b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.5		D-19b-3	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.5		ITC-1b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-28d-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-11e-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-12e-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-13e-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-17e-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-19e-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-15e-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-12d-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-13d-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-15d-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-28e-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-17d-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-18d-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-19d-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-17d-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-5b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		D-25b-3	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-6b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-4b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-3b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		PBS-2b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		D-6b-3	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		D-21b-1	Y. enterocolitica	YopT-pos
99.7		D-4e-1	Y. enterocolitica	YopT-neg
99.7		PBS-22b-1	Y. enterocolitica	YopT-neg
99.7		PBS-22b-1	Y. enterocolitica	YopT-neg

Fortsetzung auf nächster Seite



Danksagung

Meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dipl.- Ing. Dr. U. Stahl** danke ich besonders für die Betreuung meiner Arbeit von Seiten der TU- Berlin sowie seiner Hilfe bei der Anmeldung, Hinweise und Ratschläge zum Verfassen meiner Arbeit und Übernahme des Berichts.

Mein herzlichster Dank gilt **Herrn P.D. Dr. Dipl.-Chem. L. Ellerbroek** für die Überlassung des Themas, seine ständige Gesprächsbereitschaft und immer gewährte Unterstützung beim Anfertigen der Arbeit- und nicht zuletzt für die Möglichkeit, diese Arbeit an das Bundesinstitut für Risikobewertung Berlin anzufertigen.

Herrn Dr. T. Alter danke ich für seine fachlich kompetente Hilfe bei der Erstellung der Arbeit, unzählige Anregungen, interessante Diskussionen und ganz besonders für seine große Motivationsfähigkeit.

Frau C. Fester und **Frau C. Dittmar- Gabor** danke ich herzlich für ihre ständige Hilfsbereitschaft im Labor.

Meinen **Eltern** und meiner **Familie** danke ich dafür, dass sie mich während der Fertigstellung dieser Arbeit immer unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt **meiner Frau Leila** und **meiner Tochter Amitis** für ihr Verständnis, ihre Geduld und Liebe während der Erstellung dieser Arbeit. Und ich muss sagen, sie haben eine schwere Zeit durchgemacht.

An dieser Stelle möchte ich allen, die mich direkt oder indirekt bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, herzlich danken, auch wenn sie in dieser Danksagung nicht namentlich erwähnt wurden.

Lebenslauf

Name, Vorname: Toutounian- Mashhad, Kaveh

Geboren am: 24.12.1968

Geburtsort: Hamburg

Eltern: Haidi Bordbarkhou, Ahmad Toutounian- Mashhad

Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Nationalität: iranisch

Schulbildung: 1982-1986 Gymnasium, Iran / Teheran

Studium: 1987-1990 Berufsausbildung zum Krankenpfleger
an der medizinische Fakultät Kashan,
Iran

1992-1993 Studienkolleg an der TU- Berlin

1993-2003 Studium der Biotechnologie an der TU-
Berlin

03/2003 Abschluss als Dipl.-Ing. Biotechnologe

Berufliche Tätigkeit: 05-08/2000 Freier Mitarbeiter in der FU- Berlin,
Institut für angewandte Genetik

02-09/2001 Freier Mitarbeiter in der FU- Berlin,
Institut für Neurobiologie

10/2002-06/2003 Freier Mitarbeiter in der Firma
Phytobacter Production AG

Seit Juni 2004 Doktorarbeit am Bundesinstitut für
Risikobewertung (BfR)

08/2005-12/2006 Wissenschaftlicher Angestellter im
Bundesinstitut für Risikobewertung(BfR)

Seit 05/2007 Wissenschaftlicher Angestellter in der
Stiftung Tierärztliche Hochschule
Hannover (TiHo- Hannover)

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen von irgendwelchen Teilen der vorliegenden Dissertation sind von mir wie folgt vorgenommen worden:

Posterpräsentationen:

K. Toutounian, K. Mac, A. Hensel and L. Ellerbroek (2005): Application of molecularbiological fingerprinting methods for the risk assessment of persistent Infections considering *Yersinia enterocolitica*. COST Action 920, WG4 Meeting „Foodborne Zoonosis: a Coordinated Food Chain Approach“, Graz, Austria.

K. Toutounian, K. Mac, A. Hensel und L. Ellerbroek (2006): Evaluation and comparison of two different DNA-Fingerprinting Methods for Genotypic chracterization of isolated *Yersinia* spp. strains from broilers. 47. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG in Garmisch- Partenkirchen.

K. Mac, **K. Toutounian**, M. Falk, A. Hensel and L. Ellerbroek (2004): Practicability of a scheme for isolation and simultaneous detection of *Yersinia* spp. from broiler. 2nd session of WG1 in COST 920, Wien, Austria.

K. Mac, **K. Toutounian**, A. Hensel and L. Ellerbroek (2005): PCR application for simultaneous isolation and detection of *Yersinia enterocolitica* in broilers. 46. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittel- Hygiene der DVG in Garmisch- Partenkirchen.

M. Falk, K. Mac, **K. Toutounian**, T. Arnold, A. Hensel und L. Ellerbroek (2004): Zum kulturellen Nachweis von *Yersinia* spp. in Geflügel. 45. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG in Garmisch-Partenkirchen.

M. Falk, K. Mac, **K. Toutounian**, A. Hensel und L. Ellerbroek (2005): Oral infection of broilers with *Yersinia enterocolitica* DSM 13030: Preliminary microbiological results. Med-Vet-Net 2005 Conference, Winchester, England.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und allein unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Hilfen erarbeitet und verfasst habe.
- dass ich weder früher noch gleichzeitig ein Promotionsverfahren durchgeführt oder angemeldet habe.
- dass mir die Promotionsordnung der TU Berlin zur Doktorin oder zum Doktor der Ingenieurwissenschaften in der Fassung vom 15. Dezember 1996, mit den Ergänzungen vom 26. Januar 2000 und 29. November 2000 bekannt ist.

Kaveh Toutounian-Mashhad

Berlin, den 14.05.2007