

Aus dem Institut für
Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

**Ein Beitrag zur Epidemiologie und Verbreitung von
pathogenen *Yersinia enterocolitica* 4/O:3
in Münchener Metzgereien**

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

von
Christiane Ulrike Koch
aus Geislingen an der Steige

München 2003

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Referent: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c. H.-G. Liebich

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

Meinen Eltern

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
ADH	Arginindihydrolase
Aes	Äsculin
<i>ail</i> -Gen	attachment-invasive-locus-Gen
AMY	Amygdalin
ap	apathogen
ARA	Arabinose
BT	Biotyp
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CASO	Casein-Sojamehl-Pepton
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
CIT	Citrat
cm	Zentimeter
CRMOX	Kongorot-Magnesium-Oxalat
d	Tag
DCL	Deoxycholol-Citrat-Lactose
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	et alli
etc.	et cetera
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FIHV	Fleischhygiene-Verordnung
g	Gramm
GEL	Gelatinase
ggf.	gegebenenfalls
GLU	Glucose
h	Stunde
H-Antigene	Geißel-Antigene
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
Ig	Immunglobuline
IND	Indol

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

INO	Inosit
<i>inv</i> -Gen	Invasin-Gen
ISO	International Organization for Standardization
ITC	Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat
kb	Kilobase
kd	kilo-Dalton
KIA	Kligler-Iron-Agar
LDC	Lysindecaboxylase
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MAN	Mannit
MEL	Melibiose
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOX	Magnesium-Oxalat
MRB	modifizierte Rappaport-Bouillon
n	absolute Zahl
N	Normal
NCFA	Nordic Committee On Food Analysis
NIT	Nitrat
NO ₃	Nitrat
NO ₂	Nitrit
O-Antigene	Oberflächenantigene
ODC	Ornithindecaboxylase
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-β-D-Galaktopyranosid
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
Pyr	Pyrazinamidase
pYV	plasmid for <i>Yersinia</i> virulence (Virulenzplasmid)
QS	Qualität und Sicherheit
RHA	Rhamnose
s	Sekunde

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SAC	Saccharose
Sal	Salicin
s.o.	siehe oben
SOR	Sorbit
SSA-Agar	Salmonella-Shigella-Agar
SSDC-Agar	Salmonella-Shigella-Desoxycholate-Calcium-Chlorate-Agar
s.u.	siehe unten
TDA	Tryptophandesaminase
Tre	Trehalose
TSA	Trypton-Soja-Agar
TSB	Tryptone-Soja-Bouillon
Tw	Tween-Esterase
u.a.	unter anderem
u.ä.	und ähnliches
Urea	Harnstoff
URE	Urease
v.a.	vor allem
VP	Voges-Proskauer
WHO	World Health Organization
XLD	Xylose-Lysin-Deoxycholat
Xyl	Xylose
Y.	<i>Yersinia</i>
Yad	<i>Yersinia</i> adhesin
Y. e.	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Y. f.	<i>Yersinia frederiksenii</i>
Y. i.	<i>Yersinia intermedia</i>
Y. k.	<i>Yersinia kristensenii</i>
Y. r.	<i>Yersinia rohdei</i>
Yop	<i>Yersinia</i> outer membrane protein
Yst-Gen	heat-stable enterotoxine (hitzestabiles Enterotoxin)
VYE	virulent <i>Yersinia enterocolitica</i>
z.B.	zum Beispiel

EINLEITUNG	1
LITERATUR.....	2
1 <i>Yersinia enterocolitica</i>	2
1.1 Historie	2
1.2 Systematik.....	3
1.3 Biotyp	6
1.4 Serotyp	7
1.5 Pathogenität	9
1.5.1 Plasmid-kodierte Pathogenität.....	9
1.5.2 Chromosomal-kodierte Pathogenität	10
2 Nachweismethoden für <i>Yersinia enterocolitica</i>	12
2.1 Anreicherungsverfahren	12
2.2 KOH-Behandlung	13
2.3 Isolierung auf festen Nährmedien.....	13
2.4 Biochemische und serologische Identifizierung von <i>Y. enterocolitica</i>	15
2.5 Pathogenitätstests	16
2.6 Serologische Nachweisverfahren	17
2.7 Standardisierte Nachweisverfahren.....	17
2.8 Moderne Nachweisverfahren.....	20
2.8.1 PCR.....	20
2.8.2 DNA-Hybridisierung.....	20
3 Lebensmittelhygienische Bedeutung von <i>Yersinia enterocolitica</i>	21
3.1 Vorkommen von <i>Y. enterocolitica</i> in Lebensmitteln	21
3.1.1 Vorkommen in Fleisch und Fleischerzeugnissen	21
3.1.2 Vorkommen in Wasser	22
3.1.3 Vorkommen in Milch und Milchprodukten.....	22
3.1.4 Vorkommen in Fischen und Fischprodukten	23
3.2 Übertragungswege	23

4	Bedeutung von <i>Yersinia enterocolitica</i> für Mensch und Tier.....	25
4.1	Geographische Verbreitung.....	25
4.2	<i>Y. enterocolitica</i> beim Tier.....	25
4.3	<i>Y. enterocolitica</i> speziell beim Schwein.....	27
4.4	<i>Y. enterocolitica</i> – Infektionen beim Menschen.....	27
4.4.1	Gastrointestinaler Verlauf.....	28
4.4.2	Extraintestinaler Verlauf.....	28
4.5	Volkswirtschaftliche Schäden.....	29
5	Maßnahmen zur Bekämpfung von Yersinien.....	31
5.1	Staatliche Maßnahmen.....	31
5.2	Freiwillige Maßnahmen am Beispiel des Systems der QS - Qualität und Sicherheit GmbH.....	32
5.3	Mögliche Maßnahmen im Rahmen der Fleischgewinnung und -verarbeitung.....	33
5.3.1	Kritische Bereiche der Schweineschlachtung.....	33
5.3.2	Maßnahmen bei der Fleischverarbeitung.....	36
5.3.2.1	Verfahren der Haltbarmachung im Überblick.....	36
5.3.2.2	Physikalische Methoden.....	37
5.3.2.3	Chemische Methoden.....	40
5.3.3	Anwendung von GMP und HACCP in registrierten Betrieben.....	41
5.3.3.1	Grundlagen.....	41
5.3.3.2	Gute-Herstellungs-Praxis – GHP.....	42
5.3.3.3	Hazard Analysis and Critical Control Point – HACCP.....	42
5.4	Innerbetriebliche Kontrollsysteme.....	45
5.4.1	Voraussagende Mikrobiologie – Predictive Microbiology.....	45
	EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....	47
6	Material.....	47
6.1	Probenmaterial.....	47
6.2	Arbeitsmaterial.....	53

7	Methodik	54
7.1	Isolierung von <i>Y. enterocolitica</i>	56
7.2	Identifizierung von <i>Y. enterocolitica</i>	58
7.2.1	Urea-Test	59
7.2.2	API 20E	59
7.3	Lagerung der identifizierten <i>Yersinia</i> -Kulturen	60
7.4	Weitere Untersuchungen	60
7.4.1	Biotypisierung	61
7.4.2	Serotypisierung	62
7.4.3	Pathogenitätsnachweis	63
	ERGEBNISSE	64
8	Vorkommen von <i>Y. enterocolitica</i> in den untersuchten Betrieben	64
8.1	Nachweis von Yersinien in der Gesamtheit der Proben	64
8.2	Nachweis von pathogenen <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 in gekühlten und ungekühlten Räumen	66
8.3	Nachweis von pathogenen <i>Y. enterocolitica</i> in den Einzelbetrieben	67
8.4	Nachweis von pathogenen <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 in tierischem Probenmaterial	67
8.5	Vergleich des Nachweises von pathogenen <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 in rohem Fleisch und Schlachtnebenprodukten	68
8.6	Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 in den Umgebungsproben	69
8.7	Ergebnis der Negativkontrollen	70
9	Ergebnisse der verwendeten Testverfahren	71
9.1	Ergebnisse der verschiedenen Isolierungsverfahren	71
9.2	Ergebnisse des Testsystems API 20E	73
9.3	Ergebnisse der Biotypisierung	73
9.4	Ergebnisse der Untersuchung auf Pathogenität	74
9.5	Ergebnisse der Serotypisierung	75

DISKUSSION.....	76
10 Prävalenz.....	76
10.1 <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 in der Gesamtheit der Proben	76
10.2 Pathogene <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 in gekühlten und ungekühlten Räumen.	78
10.3 <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 in den Einzelbetrieben.....	78
10.4 <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 in tierischem Probenmaterial.....	79
10.5 <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 in den Umgebungsproben	80
11 Eignung der angewandten Methoden und Testverfahren	81
11.1 Beurteilung der verschiedenen Isolierungsverfahren	81
11.2 Beurteilung des API 20E, der Bio- und Serotypisierung und der Untersuchung auf Pathogenität	82
12 Vorschläge zur Risikominimierung.....	83
ZUSAMMENFASSUNG	85
SUMMARY	87
ANHANG	89
13 Medien zur Anreicherung, Isolierung und Identifizierung von <i>Y. enterocolitica</i>	89
13.1 Flüssige Medien	89
13.2 Feste Medien.....	92
13.3 Aufbewahrungsmedium.....	95
14 Testsysteme und Reagenzien	96
15 Geräte und Hilfsmittel	97
16 Ergebnisse der untersuchte Wischtupferproben mit positivem Ergebnis bezüglich <i>Yersinia</i> -Species.....	101
17 Angaben zu den einzelnen Betrieben.....	103
LITERATURVERZEICHNIS	104
TABELLENVERZEICHNIS	127
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	129

EINLEITUNG

Den Bakterien *Yersinia (Y.) enterocolitica* wird in den letzten Jahren vermehrt Bedeutung beigemessen. Gastrointestinale Infektionen durch diesen Erreger stehen derzeit nach Salmonellen und *Campylobacter* spp. an dritter Stelle der meldepflichtigen Lebensmittelinfektionen. Die Dunkelziffer dürfte vermutlich, wie bei den Salmonellen, wesentlich höher liegen. Je nach Alter und Konstitution der erkrankten Person nimmt die Erkrankung einen unterschiedlichen Verlauf. Kinder und Jugendliche, aber auch Senioren und immungeschwächte Personen, leiden an starken Durchfällen. In diesem Zusammenhang sei bei den Jugendlichen auch die Pseudoappendizitis genannt. Beim Auftreten einer Septikämie kann eine Infektion sogar mit dem Tod enden. Bei ansonsten gesunden Erwachsenen tritt meist nur milde Durchfallssymptomatik auf. Von Bedeutung bei dieser Personengruppe sind vor allem eventuelle Spätfolgen, wie sie beispielsweise in Form einer reaktiven Arthritis oder dem Erythema nodosum, zu beobachten sind.

Die Übertragungswege scheinen derzeit noch nicht ausreichend aufgeklärt, die Infektionsquelle bleibt zumeist unerkant. Das Schwein wird als Reservoir für *Y. enterocolitica* 4/O:3 immer wieder an erster Stelle genannt. Dabei zeigten Untersuchungen an Schlachthöfen, dass zu den Kontaminationsquellen stets Tonsillen, Zungen und der Kot der geschlachteten Tiere zählten. Über den Verbreitungsweg von pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 von Schlachthöfen in Metzgereien, welche die letzte Kontrollstelle vor der Abgabe an den Verbraucher darstellen, ist wenig bekannt. Eine weitere Problematik stellen die häufig unsensitiven Nachweismethoden dar, die den Nachweis des Erregers erschweren.

Mit dieser Arbeit sollte die Verbreitung pathogener *Y. enterocolitica* 4/O:3 in den verschiedenen Arbeitsbereichen von Metzgereien untersucht werden. Zielsetzung hierbei war es, zu eruieren, ob Kontaminationsgefahren bestehen, wo diese liegen sowie Lösungsvorschläge zur Verminderung derselben zu unterbreiten. Des Weiteren sollte durch die Anwendung verschiedener kultureller Nachweismethoden die Verfahrenskombination ermittelt werden, welche die höchste Nachweisrate erbringt.

LITERATUR

1 *Yersinia enterocolitica*

1.1 Historie

Die Gattung *Yersinia* ist nach Alexandre Jean Emil Yersin (1863 – 1943) benannt, einem in der Schweiz geborenen und in Paris ausgebildeten Mediziner und Bakteriologen. Die meiste Zeit seines Lebens verbrachte er in Südostasien. Als Angehöriger des französischen Medizin-Korps für Forschungsarbeiten nach Hongkong abgeordnet (NAKTIN und BEAVIS 1999), entdeckte er 1894 den Erreger der Pest, *Yersinia (Y.) pestis* (MOLLARET und BROSSOLLET 1987; ROLLE und MAYR 1993).

Die erste Erwähnung in der Literatur fand der später als *Yersinia enterocolitica* bezeichnete Erreger im Jahre 1934 durch MCLIVER und PIKE. Sie beschrieben unter dem Namen *Flavobacterium pseudomallei* einen kleinen, gramnegativen, kokkoiden Erreger, den sie aus zwei Facialabszessen eines Landwirtes isoliert hatten (BOTTONE 1997). Fünf Jahre später, 1939, beschrieben SCHLEIFSTEIN und COLEMAN fünf Patienten, von denen ein bewegliches, gramnegatives Stäbchen mit bipolarer Anfärbarkeit isoliert worden war. Die klinischen Erscheinungen wurden als Enterocolitis und Weichteilinfektion beschrieben (NAKTIN und BEAVIS 1999).

Die zunächst bestehende Unsicherheit in der Systematik wurde auch in der Nomenklatur deutlich: Das Bakterium erhielt zunächst verschiedene Bezeichnungen, einschließlich *Bacterium enterocolitica* und *Pasteurella X*, die Gattung *Yersinia* wurde 1944 schließlich von VAN LOGHEM vorgeschlagen. Mitte der 60-iger Jahre wurde *Pasteurella X* als *Yersinia* klassifiziert, als FREDERIKSEN den Namen *Yersinia enterocolitica* vorschlug (NAKTIN und BEAVIS 1999).

1.2 Systematik

Yersinien besitzen die typischen Eigenschaften der Familie *Enterobacteriaceae*.

Sie sind gram-negative, oxidase-negative, peritrich begeißelte, kapsellose Stäbchen, mit einer durchschnittlichen Länge von 1 bis 3 µm und einer Breite von 0,5 bis 0,8 µm. Geißeln werden bei Temperaturen unter +30°C ausgebildet (COVER und ABER 1989; SCHIEMANN 1989; ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990; HEESEMANN 1994; BOCKEMÜHL 1999). Das Wachstum ist aerob oder fakultativ anaerob bei Temperaturen zwischen 0°C (psychrotolerant) und +45°C, optimal bei ca. +30°C. An die Nährböden werden keine besonderen Ansprüche gestellt (DEDIE et al. 1993).

Zum Genus *Yersinia* gehören derzeit 11 verschiedene Species:

- *Yersinia pestis*
- *Yersinia pseudotuberculosis*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Yersinia frederiksenii*
- *Yersinia intermedia*
- *Yersinia kristensenii*
- *Yersinia rohdei*
- *Yersinia aldovae*
- *Yersinia mollaretii*
- *Yersinia bercovieri*
- *Yersinia ruckeri*

Klinisch besitzen drei Species für Mensch und Tier (Nr. 1-3) und eine Species (Nr. 4) speziell für Fische Bedeutung:

1. *Yersinia pestis*
2. *Yersinia pseudotuberculosis*
3. *Yersinia enterocolitica*
4. *Yersinia ruckeri*

Diese Vertreter sind pathogen und somit als Krankheitserreger anzusehen (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990).

1. Yersinia pestis:

Pest der Tiere:

Die Pest stellt eine unter Nagern verbreitete Zoonose dar. Die Krankheit verläuft bei diesen Tieren septikämisch und endet häufig tödlich. Die Weiterverbreitung erfolgt durch infizierte Flöhe. Tiere, die die Krankheit überleben, bilden das Reservoir für den Erreger (ROLLE und MAYR 1993).

Pest des Menschen:

Bis zum Mittelalter war die Pest in Asien, Afrika und Europa weit verbreitet. Unter der Bezeichnung „Schwarzer Tod“ forderte sie unzählige Todesopfer. Bis heute gibt es endemische Herde in Teilen Asiens, Afrikas, Süd- und Nordamerikas. Die Übertragung erfolgt meist vom Tier auf den Mensch (Reservoir v.a. Ratten, Überträger: Rattenfloh). Beim Menschen werden zwei Verlaufsformen unterschieden: Die Beulenpest und die Lungenpest. Die sich bei der Beulenpest entwickelnden Beulen heilen entweder ab, brechen nach außen auf oder enden in einer Septikämie. Diese kann schon nach Stunden tödlich enden. Breitet sich der Erreger über die Blutbahn aus, besteht die Gefahr einer Lungenpest (Letalität 100%), die, aufgrund der Tröpfcheninfektion und der damit verbundenen hohen Kontagiosität, besondere Bedeutung hat (ROLLE und MAYR 1993).

2. Yersinia pseudotuberculosis:

Pseudotuberculose (Rodentiose):

Die Pseudotuberculose ist eine Infektionskrankheit, die vorwiegend einen subakuten bis chronischen Verlauf nimmt. Sie kommt bei kleinen Nagern vor, aber auch bei Vögeln, anderen Haus- und Zootieren. Die klinisch unauffällige Krankheit kann nach einigen Wochen tödlich enden. Die Erkrankung ist weltweit verbreitet und auch in Europa vertreten (ROLLE und MAYR 1993).

Pseudotuberculose des Menschen:

Die Inkubationszeit bei einer Infektion mit *Y. pseudotuberculosis* ist unbekannt. Neben Fieber, Übelkeit und Erbrechen, kommt es zu Schmerzen im rechten Unterbauch. Klinisch ist die Pseudoappendizitis (Bauchschmerzen und Fieber) das häufigste Krankheitsbild. Die septisch-typhöse Form tritt selten auf, ist jedoch immer lebensbedrohlich. Die Letalität liegt bei ca. 50 % (DEDIE et al.1993).

3. Yersinia enterocolitica:

Eine Infektion mit *Y. enterocolitica* führt primär zu wässrigen, unter Umständen auch zu wässrig-blutigen Durchfällen mit kolikartigen Bauchschmerzen. Die Erkrankung tritt bei allen Altersgruppen auf, bevorzugt aber bei Kindern und Jugendlichen (FEHLHABER und JANETSCHKE 1992; DEDIE et al. 1993).

In Kapitel 4.2 bis 4.4 wird genauer auf die Symptomatik bei Mensch und Tier eingegangen.

4. Yersinia ruckeri:

Y. ruckeri oder ERM-Bakterium (Enteric Redmouth Bacterium) ist ein fischpathogener Krankheitserreger. Im Jahre 1950 wurde er aus Regenbogenforellen isoliert. Die Infektion wird vermutlich über das Wasser übertragen. Ein besonderes Problem sind asymptomatische Träger, die eine Bestandsgefährdung darstellen. Nach Krankheitsausbruch kommt es zu langsam zunehmenden Verlusten von Regenbogenforellen. Damit verbunden sind hochgradige Kongestion und tiefsitzende Hämorrhagien im Kopfbereich. Eine Erosion des Unterkiefers, die als Folge ein rotes hämorrhagisches Ulcus hat, kann vorliegen. Des Weiteren treten Nekrosen der Darmschleimhaut auf (ROBERTS 1985).

1.3 Biotyp

Die Gruppe der *Y. enterocolitica*-Bakterien lässt sich anhand zahlreicher biochemischer Reaktionen in verschiedene Biotypen einteilen (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). In **Tabelle 1** ist das Biotypisierungsschema nach WAUTERS et al. (1987) dargestellt. Zurzeit werden die Biotypen 1-5 unterschieden. Der Biotyp 1 wird in den apathogenen Typ 1A und den pathogenen Typ 1B eingeteilt (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990).

Tab. 1: Biotypisierung von *Y. enterocolitica*-Stämmen (nach WAUTERS et al. 1987)

Test	Biotyp 1A	Biotyp 1B	Biotyp 2	Biotyp 3	Biotyp 4	Biotyp 5
Lipase (Tween-Esterase)	+	+	-	-	-	-
Äskulin	+	-	-	-	-	-
Salicin	+	-	-	-	-	-
Indol	+	+	(+)	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	-	v
Trehalose	+	+	+	+	+	-
Pyrazinamidase	+	-	-	-	-	-
β-Glucuronidase	+	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	(+)
Prolinpeptidase	v	-	-	-	-	-

Inkubation bei 28°C, 48 h

(+): schwach positive Reaktion

+: positive Reaktion

v: variabel

-: negative Reaktion

Die für den Menschen pathogenen *Y. enterocolitica*-Stämme, gehören in Europa zu den Biotypen 2, 3 oder 4, in den USA zu dem Biotyp 1B (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990).

1.4 Serotyp

Die Einteilung der *Yersinia* spp. in Serotypen erfolgt durch verschiedene Antigene. Hierbei erlangten vor allem die O-Antigene (Oberflächenantigene) und die H-Antigene (Geißelantigene) diagnostische Bedeutung. Die O-Antigene werden dabei mit Zahlen, die H-Antigene mit Buchstaben bezeichnet (SCHIEMANN 1989). Die O-Gruppen sind auf derzeit 60 erweitert worden. Dabei entfallen 28 Serogruppen auf *Y. enterocolitica*, zwölf auf *Y. frederiksenii*, elf auf *Y. intermedia* und neun auf *Y. kristensenii* (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). In Europa zählen zu den Erregern der enteralen Yersiniosen die Serogruppen O:3, O:9 und O:5,27 (ALEKSIC et al. 1988), in den USA die Serogruppen O:4,32, O:8, O:13, O:18, O:20 und O:21 (ALEKSIC 1995).

Während bestimmte O-Antigene bei verschiedenen Species vorkommen können, sind H-Antigene speciesspezifisch (ALEKSIC 1995) und können aus diesem Grunde zur direkten Identifizierung der *Yersinia*-Arten herangezogen werden (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Unter den O-Antigenen sind bestimmte O-Gruppen in Kombination mit verschiedenen H-Antigenen von diagnostischer Bedeutung, da sie auf unterschiedlichen Kontinenten als Krankheitserreger bei Mensch und Tier auftreten (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1987, 1990). Bis heute konnten mindestens 18 H-Faktoren bei *Y. enterocolitica*, elf bei *Y. frederiksenii*, sechs bei *Y. intermedia* und neun bei *Y. kristensenii* abgegrenzt werden. Durch die Kombination der 44 H-Antigenfaktoren mit den 60 O-Serogruppen kann man mindestens 214 Serotypen unterscheiden (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990).

Tabelle 2 (S. 8) gibt einen Überblick über die verschiedenen Antigenkombinationen, die zugehörigen Biotypen, die Herkunft und das Vorkommen humanpathogener *Y. enterocolitica*-Stämme.

Tab. 2: O- und H-Antigene, Biotypzugehörigkeit, Herkunft und geographische Verbreitung humanpathogener *Y. enterocolitica*-Stämme (nach ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990)

O-Antigene	H-Antigene	Biotyp	Herkunft	Vorkommen
1, 2, 3	a, b, c	3	Chinchilla	Europa, USA
2, 3	b, c	5	Hase, Ziege, Kaninchen, Affe	Europa
3	a, b, c a, b, c, v a, c	4	Mensch, Schwein Hund, Katze, Ratte	Europa, Südafrika Kanada, Japan, USA Südamerika, Australien
	c	4	Mensch, Schwein, Hühnerfleisch	Deutschland, Norwegen
4, 32	b, e, f, i	1B	Mensch, Lebensmittel	USA
5, 27	a, b, c	2 oder 3	Mensch, Hund, Affe, Wildtiere, Milch	Deutschland, Niederlande
	b, c	2 oder 3	Milchprodukte, Oberflächenwasser	USA, Kanada, Japan, Australien
8	b, e, f, i b, e, f, i, v	1B	Mensch, Schwein Milch, Milchprodukte, Trinkwasser	USA Kanada, (Italien), (Niederlande)
9	a, b a, b, c a, b, c, v a, c	2 selten 3	Mensch, Schwein Hund, Katze Ratte	Europa Japan
13	a, b, i	1B	Mensch, Affe, Milch	USA
18	b, e, f, i	1B	Mensch	USA
20	b, e, f, i	1B	Mensch, Hund, Ratte	USA
21	b, e, f, i	1B	Mensch	USA

Zur Bestimmung des Serotyps sind zwischenzeitlich kommerzielle Testsets erhältlich, die auf einer Agglutinationsreaktion basieren.

1.5 Pathogenität

Bei den Yersinien lassen sich plasmid- und chromosomal-kodierte Pathogenitätsfaktoren unterscheiden (HEESEMAN 1990). **Tabelle 3** (S. 11) fasst diese Faktoren zusammen.

1.5.1 Plasmid-kodierte Pathogenität

Die für den Menschen pathogenen Yersinien (Biotyp 1B-5) tragen alle ein ca. 70 Kilobasen großes Virulenzplasmid (DEDIE et al. 1993; KWAGA und IVERSEN 1993; HEESEMAN 1990). Dieses Virulenzplasmid (pYV) kodiert für die Produktion löslicher Polypeptide, die als „Yersinia outer proteins“ bzw. als Yops bezeichnet werden. Die Aufgaben dieser Polypeptide sind u.a. Phagozytoseresistenz, Serumresistenz und zytotoxische Funktionen (DEDIE et al. 1993; HEESEMAN 1990). Die Produktion der Yops wird durch eine 20 kb umfassende Region des pYV reguliert und umfasst vier Loci, die mit Vir A, Vir B, Vir C und Vir F bezeichnet werden. Vir F scheint hierbei der Schlüsselaktivator für die Yop Gene zu sein. Die Yops sind nicht an die Membran gebunden, sondern können in das Kulturmedium abgegeben werden (KWAGA und IVERSEN 1993).

Neben den oben genannten sezernierten Proteinen wurden auch zwei plasmid-kodierte äußere Membranproteine identifiziert. Das eine, ein fibrilläres Protein mit einer Größe von ca. 200 kd, wird als „Yersinia adhesin A“ oder Yad A bezeichnet. Es bildet dimere und tetramere Fibrillen und ist als wichtiger Pathogenitätsfaktor anzusehen. Seine Ausschaltung führt zur Reduktion der Virulenz im Mausmodell, zum Verlust der Phagozytoseresistenz und zum Verlust der Überlebensfähigkeit im Serum (HEESEMAN 1990). Das zweite plasmid-kodierte Membranprotein ist ein 20 kd großes Lipoprotein. Seine pathogene Bedeutung ist jedoch nicht nachgewiesen (HEESEMAN 1990). Alle oben aufgeführten Polypeptide werden nur bei +37°C im calciumfreien Milieu gebildet (BOTTONI 1997; DEDIE et al. 1993; HEESEMAN 1990).

1.5.2 Chromosomal-kodierte Pathogenität

Als ein chromosomal determinierter Faktor wurde u.a. das Invasin identifiziert. Dabei handelt es sich um ein ca. 100 kd großes äußeres Membranprotein, welches von allen enteropathogenen Yersinien exprimiert wird. Das *inv*-Gen konnte zwar auch bei nichtpathogenen *Y. enterocolitica*-Stämmen nachgewiesen werden, allerdings handelte es sich hier um ein nicht funktionstüchtiges Gen. Das Invasin bindet spezifisch an Integrin, ein Zelladhäsionsprotein, wodurch ein phagozytischer Prozess induziert wird. Die pathogenetische Bedeutung des Invasins wird jedoch aus zwei Gründen angezweifelt: zum einen findet eine signifikante Transkription nur bei Temperaturen unter +30°C statt, zum anderen führt eine Ausschaltung des *inv*-Gens nicht zur Verminderung der Virulenz. Als ein Gen, das ebenfalls für Zelladhärenz und Invasivität kodiert, wurde das *ail* (attachment-invasive-locus)-Gen, beschrieben. Dieses Gen konnte bei pathogenen *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden und wird bei +37°C transkribiert (HEESEMAN 1990).

Das *yst*-Gen kodiert für ein hitzestabiles Enterotoxin (GRANT 1998; HEESEMAN 1990). Ähnlich dem *inv*-Gen handelt es sich um eine temperaturabhängige Expression (HEESEMAN 1990). Die Rolle des Toxins bei der Pathogenität wurde schnell in Frage gestellt, da es nur bei Temperaturen unter +30°C exprimiert wird – also nicht im Darmlumen (COVER et al. 1989) – und sowohl bei pathogenen als auch bei apathogenen Stämmen gefunden wurde (DEDIE et al. 1993; SCHIEMANN 1989). Ein ebenfalls chromosomal-kodierter Faktor ist das Eisenaufnahmesystem der Yersinien. Bei Fyu A handelt es sich um einen membranständigen Rezeptor für die Aufnahme von Eisen (DEDIE et al. 1993; HEESEMAN 1990). Ferner ist die Lipopolysaccharidstruktur (LPS-Struktur) der Yersinien chromosomal determiniert (HEESEMAN 1990). Die LPS spielen eine wichtige Rolle bei der reaktiven Arthritis – die Antikörper-Antwort ist meistens gegen die LPS gerichtet (DI GENARO 2000) – außerdem können sie, abhängig von der Temperatur, ihre Struktur verändern (BOTTONE 1997). Der Urea-Gen-Komplex ist ebenfalls chromosomal-kodiert (GRANT 1998). *Y. enterocolitica* gehört zu den ureasepositiven Bakterien. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von Harnstoff zu Ammoniak und Carbamat. Durch eine weitere Reaktion entsteht nochmals ein Molekül Ammoniak und Carbonsäure. Durch die Alkalisierung des Magensaftes wird den Yersinien die Magenpassage erleichtert. Des Weiter-

ren spielt die Urease auch eine Rolle bei der reaktiven Arthritis (DE KONING-WARD et al. 1994).

Tab. 3: Plasmid- und chromosomal-kodierte Pathogenitätsfaktoren in Abhängigkeit von der Temperatur (nach BOTTONE 1997)

Lokalisation	Eigenschaft	Expression bei	
		+ 37 °C	+ 24 °C
Chromosom	Struktur der Lipopolysaccharide (Kolonieform)	kurzkettig (rauh)	langkettig (glatt)
	Zellmorphologie	pleomorph	kokkoid
	Phagozytenbindung	schwach	stark
	Geißeln	nein	ja
	Invasin (<i>inv</i>)	gering	stark
	attachment invasion locus (<i>ail</i>)	stark	gering
	Enterotoxin	nein	ja
	Yersiniabactin	ja	nein
Plasmid	Membranproteine	ja	nein
	Hydrophobizität der Zelloberflächen	ja	nein
	Kalziumabhängigkeit des Wachstums	ja	nein
	Autoagglutination	ja	nein
	Phagozytoseresistenz	ja	nein
	Makrophagenresistenz	gut	schlecht
	Resistenz gegen Serumbakterizide	ja	nein

2 Nachweismethoden für *Yersinia enterocolitica*

Bei dem Nachweis von Yersinien wird in der Literatur meist eine Kombination verschiedener Verfahren empfohlen (ALDOVA et al. 1990). Welche Methode bzw. welche Kombination von Methoden angewandt wird, ist abhängig vom vorliegenden Probenmaterial und dem Grad der Kontamination (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Eine amtliche Methode nach § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) gibt es für den Yersinien-Nachweis nicht. Im Folgenden sollen Nachweisverfahren besprochen werden, die von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben oder empfohlen wurden (BOCKEMÜHL 1999).

2.1 Anreicherungsverfahren

Einen Überblick über die verschiedenen Anreicherungsmedien gibt **Tabelle 4** (S. 13). Eine Form der Anreicherung ist die Kälteanreicherung. Bei ihr hat man sich die psychrotrophe Natur von *Y. enterocolitica* zu Nutze gemacht (SCHIEMANN 1989). Sie erfolgt meist in 0,15 molarer phosphatgepufferter Kochsalzlösung über eine Dauer von 14 oder mehr Tagen bei +4°C (SCHIEMANN 1989; ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990; DEDIE et al. 1993). Das Prinzip beruht darauf, dass durch die niedrigen Temperaturen das Wachstum der Begleitflora verlangsamt wird, nicht aber das der Yersinien. Anwendung findet diese Methode beispielsweise beim Nachweis des Erregers aus dem Stuhl von Rekonvaleszenten oder symptomlosen Trägern, da durch die Kälteanreicherung die Isolationshäufigkeit von pathogenen Serovaren zunimmt (SCHIEMANN 1989).

Als die erfolgreichsten selektiven Anreicherungsbouillons werden das modifizierte Rappaport-Medium (MRB) (NCFA 1996) und das Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Medium (ITC) (ISO/DIS 10273 1994) beschrieben. Sie zeigen die höchste Selektivität für die Serovare 0:3 und 0:9 und können bei stark kontaminiertem Untersuchungsmaterial verwendet werden (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Die Überlegenheit von MRB und ITC gegenüber der Kälteanreicherung ergibt sich aus den darin enthaltenen selektiven Substanzen (WAUTERS et al. 1988).

Tab. 4: Zusammenstellung verschiedener Anreicherungsmedien

Anreicherungsmedien	Quelle
Trypton-Soja-Bouillon	SCHIEMANN 1989
Modifiziertes Rappaport-Medium	SCHIEMANN 1989 WAUTERS 1988 ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990 DEDIE et al. 1993 WEBER 1982
Galle-Oxalat-Sorbose-Bouillon	SCHIEMANN 1989 SCHIEMANN 1982
Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat	ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990 DEDIE et al. 1993 WAUTERS et al. 1988
Hirn-Herz-Bouillon	GRANT et al. 1998 FUKUSHIMA 1986

2.2 KOH-Behandlung

Die von AULISIO et al. (1980) publizierte Alkalibehandlung der Anreicherungskultur wirkt ebenfalls hemmend auf die Begleitflora. Hierbei werden 0,5 ml der inkubierten Anreicherungskultur mit 0,25-0,5%iger Kalilauge gemischt und nach 20 Sekunden auf festen Selektivnährböden ausgestrichen. SCHIEMANN (1989) bezeichnete jedoch die hieraus gewonnenen Ergebnisse zum Teil als ent-, zum Teil als ermutigend.

2.3 Isolierung auf festen Nährmedien

Die ersten Nährböden für die Isolierung von *Y. enterocolitica* waren von den bereits bekannten *Enterobacteriaceae*-Agars abgeleitet (SCHIEMANN 1989). Dabei handelte es sich zum Beispiel um Salmonella-Shigella-Agar (SSA), MacConkey (SCHIEMANN 1980; ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990; DEDIE et al. 1993; HEESEMANN 1994), Deoxycholat-Citrat-Lactose (DCL) (SCHIEMANN 1989; BOCKEMÜHL 1999) und Xylose-Lysin-Deoxycholat (XLD) (SCHIEMANN 1989). **Tabelle 5** (S. 15) soll einen Überblick über die verschiedenen Selektivnährmedien geben. Im Laufe der Yersinien-Forschung ver-

suchte man, diese bereits existierenden Agars zu modifizieren, das heißt, ihnen Selektivität für Yersinien zu verleihen. Daneben wurden einige wenige speziell für die Isolierung von *Y. enterocolitica* entwickelt. Hierzu gehört auch der Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN)-Agar. Dieser hat sich als die beste Alternative bei dem Nachweis von Yersinien aus Stuhl- und aus Lebensmittelproben erwiesen. Aufgrund der enthaltenen Antibiotika ist er selektiv, liefert ein gutes Koloniewachstum innerhalb von 18-24 Stunden bei +32°C und die darauf wachsenden Kolonien zeigen ein typisches Wachstum (SCHIEMANN 1989). Die pathogenen Isolate sind < 1 mm groß, besitzen ein rotes Zentrum und einen klaren farblosen Rand, das sog. „Kuhauge“ oder „bulleye“ (BOCKEMÜHL 1999; SCHIEMANN 1989). FUKUSHIMA et al. (1987a) entwickelten den Virulent-Yersinia enterocolitica-Agar (VYE). Zusätzlich zu Cefsulodin und Irgasan enthält dieser Agar Josamycin, Oleandomycin und Äsculin. Nach einer Bebrütungsdauer von 1-2 Tagen bei +32°C zeigen pathogene Stämme ein Wachstum von roten Kolonien, die apathogenen Stämme wachsen aufgrund der Äsculinhydrolyse als dunkle Kolonien.

Tab. 5: Verschiedene Selektivnährmedien, deren Bebrütungstemperatur und -dauer

Medien	Temperatur	Zeit	Quelle
Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar	32°C	24 h	SCHIEMANN 1989
Cellobiose-Arginin-Lysin-Agar	25°C	40 h	DUDLEA und SHOTTS 1979
Desoxyribonuclease-Agar mit Sorbit und Tween 80	25°C	48 h	LEE 1977
Natriumdesoxycholat-Citrat-Mannit-Agar	25°C	48 h	SAARI und JANSEN 1979
MacConkey-Agar mit Tween 80	25°C	48 h	LEE 1977
SSDC-Agar	25-29°C	48 h	WAUTERS 1973
VYE-Agar	32°C	24 h	FUKUSHIMA 1987a
Wismut-Sulfit-Agar	25°C	3-5 d	HANNA et al. 1977
"Y" Medium	29°C	48 h	SOLTESZ et al. 1980

2.4 Biochemische und serologische Identifizierung von *Y. enterocolitica*

Für eine weitere Identifizierung von *Y. enterocolitica* werden in der Literatur Kligler-Eisen-Agar (KIA) (SCHIEMANN 1989; ALEKSIC und BOCKMÜHL 1990; DEDIE et al. 1993) und Christensen's Urea-Agar beschrieben (SCHIEMANN 1989). Mittels Kligler-Agar, bei dem es sich um einen Eisen-II haltigen Nährboden handelt, werden verdächtige Kolonien auf Harnstoff-Hydrolyse (positiv), Beweglichkeit bei +22 bis +28°C (positiv) und +37°C (negativ) vorgeprüft und im Anschluss daran weiter differenziert (DEDIE et al. 1993). Mittels Christensen's Urea Agar wird die Hydrolyse von Harnstoff beurteilt, wobei es zu einem Farbumschlag aufgrund des enthaltenen Indikators kommt (BAUMGART 1993). Zwischenzeitlich existieren auch spezielle Testsysteme für *Y. enterocolitica*. Dazu gehören unter anderem API 20E, API Rapid 32 DIE und Micronaut (NEUBAUER 2000). Eine positive Identifikationsrate von 93% kann mit dem API 20E erreicht werden, wenn bei +28°C anstatt bei +37°C inkubiert wird (ARCHER et al. 1987).

2.5 Pathogenitätstests

Wie bereits erwähnt beruht die Pathogenität von *Y. enterocolitica* entweder auf chromosomal- oder auf plasmid-kodierten Faktoren (HEESEMAN 1990). Zu den plasmidabhängigen Faktoren gehören u.a. das calciumabhängige Wachstum bei +37°C, die Kongorot-Bindungsfähigkeit bei +37°C (SCHIEMANN 1989), die Serumresistenz (DEDIE et al. 1993) und die Autoagglutination (SCHIEMANN 1989; DEDIE et al. 1993). Die zwei zuerst genannten Eigenschaften können mittels Kongorot-Magnesium-Oxalat (CRMox)-Agar überprüft werden. Dieser enthält Kongorot, Magnesium und Oxalat und wird 48 h bei +37°C inkubiert. Liegt ein plasmidtragender Stamm vor, wird Kongorot aufgenommen, was eine dunkelorange-rote Färbung der Kolonien bewirkt. Da aber kein bzw. sehr wenig Calcium vorhanden ist, wachsen nur sehr kleine Kolonien. Die von den plasmidpositiven Stämmen produzierten Outer-Membrane-Proteine vermitteln die Fähigkeit zur Autoagglutination (SCHIEMANN 1989). Um diese zu bestimmen, werden die zu untersuchenden Yersinien-Stämme in einer Bouillon nach Clark und Lubs (HALLMANN 1953) inkubiert. Eine negative Reaktion wird durch eine gleichmäßige Trübung angezeigt, eine positive Reaktion durch eine Verklumpung des Niederschlags und dessen Absenkung auf den Boden. Die Serumresistenz kann z.B. mit Hilfe von Pferdeserum getestet werden. Dazu wird das zu untersuchende Material auf eine Dextrose-Platte übertragen und anschließend Pferdeserum aufgetragen. Zur Kontrolle wird der Test auch mit inaktiviertem Serum durchgeführt. Ein ungestörtes Wachstum im Bereich des nicht inaktivierten Serums zeigt einen serumresistenten Stamm an (KERBER 1997).

Die Untersuchungen auf die chromosomal-kodierten Pathogenitätsfaktoren werden zum Teil durch die im Rahmen der Biotypisierung durchgeführten Untersuchungen abgedeckt. In der Literatur wird der Nachweis mittels Salicin-Fermentation, Äsculin-Hydrolyse und Pyrazinamidase-Aktivität als schnelle und einfache Methode angegeben (CHIESA et al. 1993). Bei pathogenen Isolaten fällt der Pyrazinamidasenachweis negativ aus, Äsculin kann nicht hydrolysiert werden und bei +25°C findet keine Salicin-Fermentation statt (BOTTONI 1997).

2.6 Serologische Nachweisverfahren

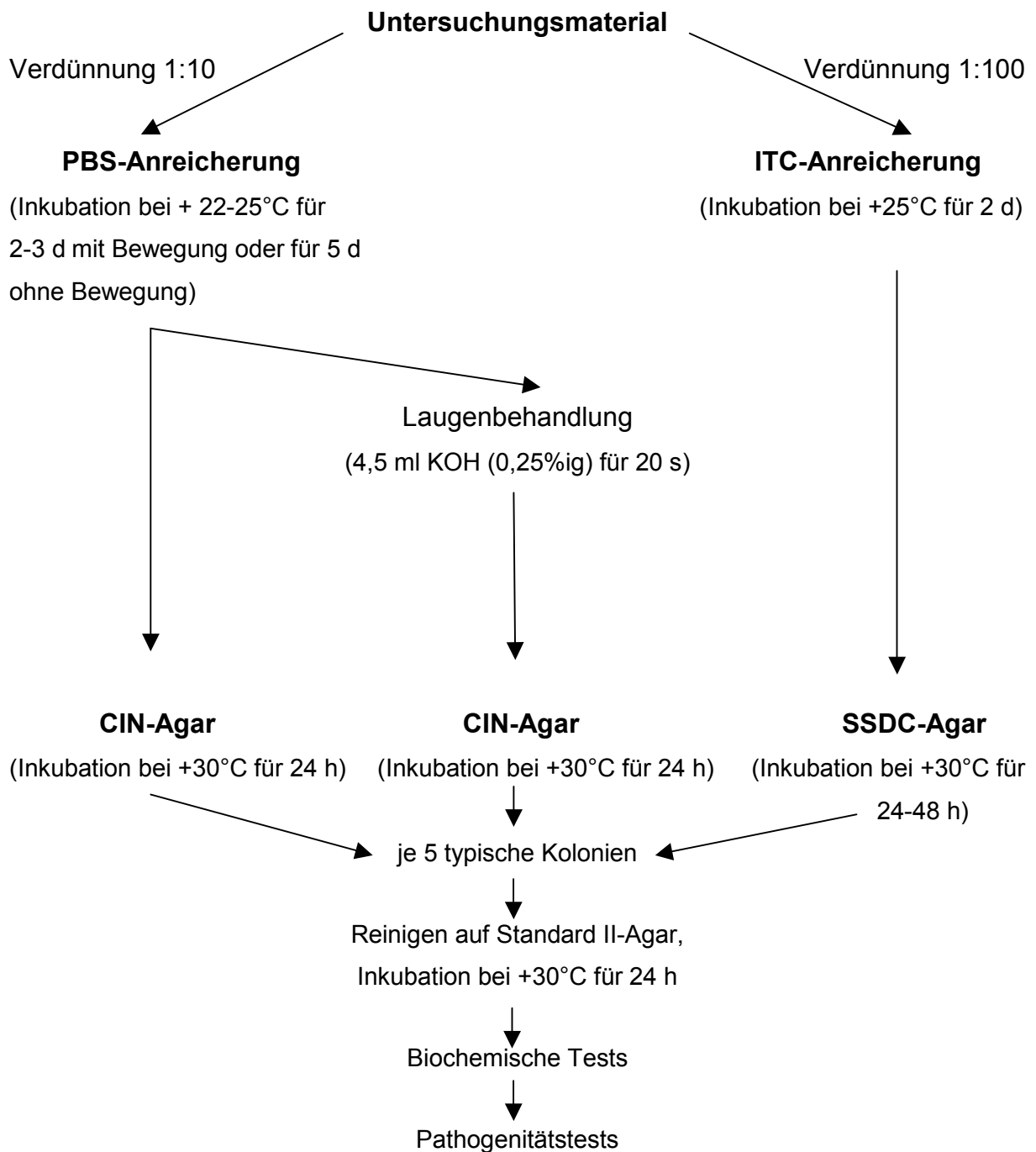
Antikörper gegen Antigene von *Y. enterocolitica* treten ca. sieben Tage nach einer Erkrankung auf. Dabei werden häufig die Antigene O:3, O:5,27, O:9 und O:8 nachgewiesen (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Zu deren Nachweis hat sich die Langsamagglutination (Widal-Reaktion) als brauchbar erwiesen (KRAUSS 1997, DEDIE et al. 1993, HEESEMANN und KARCH 1995). Für die wichtigsten europäischen pathogenen O-Antigene existieren Agglutinationsseren (NEUBAUER 2001c). Zunehmend wird für die serologische Diagnostik aber auch der ELISA und der Immunoblot verwendet (KRAUSS 1997; DEDIE et al. 1993; HEESEMANN und KARCH 1995). Dabei wird der Immunoblot als ein der Widal-Reaktion in der Sensitivität und Spezifität überlegener Test beschrieben (NEUBAUER 2001c).

2.7 Standardisierte Nachweisverfahren

Der Versuch, einen normierten Untersuchungsgang zur Isolierung von pathogenen *Y. enterocolitica*-Stämmen für Nahrungs- und Futtermittel zu etablieren, führte zu dem Internationalen Standard ISO 10273. In **Abbildung 1** (S. 18) und **Tabelle 6** (S. 19) ist das Vorgehen nach der ISO 10273-Methode dargestellt.

Eine weitere Referenzmethode ist die Methode des Nordic Committee On Food Analysis (des Nordischen Komitees für Lebensmitteluntersuchung – NCFA). Der Untersuchungsgang wurde speziell für pathogene *Y. enterocolitica*, die in Europa vorkommen, entwickelt. Das Prinzip des NCFA ist eine Kombination von selektiver Anreicherung, Kälteanreicherung und Subkultivierung auf Selektivagar (NCFA 1996). Der Unterschied zur ISO 10273 besteht in dem selektiven Anreicherungsmedium: Während bei der ISO-Methode Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat (ITC) verwendet wird, wird hier modifizierte Rappaport Bouillon (MRB) genutzt. Zusätzlich beinhaltet die ISO-Methode keine Kälteanreicherung.

Abb. 1: Internationales Standardverfahren (ISO 10273) zum Nachweis pathogener *Y. enterocolitica*



PBS: Phosphate-Bile-Sorbitol Buffer

ITC: Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat

CIN: Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin

SSDC: Salmonella-Shigella-Desoxycholate-Calcium-Chlorate-Agar

Tab. 6: Reaktionsergebnisse diagnostischer Tests von pathogenen *Y. enterocolitica* gemäß ISO 10273

Testsystem	Reaktion	Ergebnis
Biochemische Verdachtstests	Urease	+
	Tryptophandesaminase	-
	Glukose	+
	Gasbildung aus Glukose	-
	Laktose	-
	Hydrogensulfit	-
	Oxidase	-
Biochemische Bestätigungstests	Lysindecaboxylase	-
	Ornithindecaboxylase	+
	Saccharose	-
	Rhamnose	-
	Citrat	-
Pathogenitätstests	Salicin	-
	Äskulin	-
	Pyrazinamidase	-
	kalziumabhängiges Wachstum bei +37 °C	+

Wie anhand des Untersuchungsschemata leicht ersichtlich ist, ist die Durchführung aufgrund der zahlreichen Einzeltests sehr arbeits- und zeitaufwendig. Sie stellt aber eine wertvolle Methodensammlung dar (NEUBAUER 2001c).

2.8 Moderne Nachweisverfahren

2.8.1 PCR

Basierend auf der Polymerasekettenreaktion (PCR), ist die Detektion von spezifischen Genen verschiedener Virulenzfaktoren möglich. Dabei kann es sich sowohl um plasmid-kodierte Gene, als auch um chromosomal-kodierte Gene handeln (NEUBAUER et al. 2001c). Mit dieser Methode können selbst kleinste Mengen DNA nachgewiesen werden, was zu einer höheren Empfindlichkeit führt. FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999) zeigten beispielsweise, dass bei Untersuchungen von Hackfleisch mit PCR die Prävalenz von *yad A*-positiven *Y. enterocolitica* deutlich höher war als bei Untersuchungen mit kulturellen Methoden.

2.8.2 DNA-Hybridisierung

Mit der Methode der Nukleinsäure-Hybridisierung können pathogene *Y. enterocolitica* direkt, ohne vorherige Anreicherung oder Anzucht in Reinkulturen, identifiziert werden. Für die Durchführung wird ein Filter auf einen herkömmlichen selektiven Nährboden aufgelegt und die Bakterien angezchtet. Durch eine gezielte chemische Behandlung wird die DNA aus dem Zellkern freigesetzt und im Anschluss die *Y. enterocolitica*-Sonde aufgebracht. Bei der folgenden Hybridisierung bindet die DNA-Sonde an ihr komplementäres Gegenstück (HILL 1983).

3 Lebensmittelhygienische Bedeutung von *Yersinia enterocolitica*

3.1 Vorkommen von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln

3.1.1 Vorkommen in Fleisch und Fleischerzeugnissen

Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen des Menschen werden in einem wesentlichen Umfang durch Fleisch und Fleischerzeugnisse verursacht, wobei Schweinefleisch sehr häufig in das Kontaminationsgeschehen involviert ist. Besondere Gefahr geht dabei vom Verzehr von rohen Produkten wie Hackfleisch, aber auch von anderen Rohfleischerzeugnissen aus (HARTUNG 1996).

Rohe Schweinefleischprodukte sind umfassend auf das Vorhandensein von *Y. enterocolitica* untersucht worden (DOYLE et al. 1981; DE BOER und NOUWS 1991; DE BOER 1995; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999, 2001d). Die Nachweisrate pathogener *Y. enterocolitica* in rohem Schweinefleisch war dabei, mit Ausnahme von Schweinezungen und -innereien, gering (DOYLE et al. 1981; BÜLTE et al. 1991; DE BOER 1995; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999, 2001d), die Prävalenz von *Y. enterocolitica* des Bioserotyps 4/O:3 in Hackfleisch, für welches Kopffleisch und Tonsillen verwendet wurden, war jedoch hoch (TAUXE et al. 1987). Rind- und Hammelfleisch sowie Geflügelprodukte wurden ebenfalls auf *Y. enterocolitica* untersucht (DE BOER 1994, 1995; KARIB und SEEGER 1994; KHARE et al. 1996; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001d). In diesen Studien konnten nur apathogene Stämme nachgewiesen. FUKUSHIMA et al. (1997) berichteten über pathogene *Y. enterocolitica* in Rind- und Geflügelfleisch. Als wahrscheinliche Ursache hierfür ist die Kreuzkontamination durch Schweinefleisch anzusehen, da pathogene *Y. enterocolitica* nur sehr selten bei Rind und Geflügel nachgewiesen werden konnten (FUKUSHIMA et al. 1997).

KHALAFALLA et al. (1995) untersuchten Fleischfertiggerichte auf das Vorkommen von *Y. enterocolitica* und kamen zu dem Ergebnis, dass häufig eine Rekontamination der Gerichte, zum Beispiel durch andere rohe Lebensmittel, durch Mitarbeiter in Lebensmittelbetrieben, durch falsche Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen als Ursache anzusehen ist.

Bei Untersuchungen von frischer Rohwurst durch KLEEMANN und BERGANN (1994), konnten zwar in 13,4% der Proben *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden, jedoch weder der pathogene Serotyp O:3 noch O:9.

3.1.2 Vorkommen in Wasser

Auch Wasser wird als mögliche Infektionsquelle angesehen (STENGEL 1986). Von HIGHSMITH et al. (1977) wurden Krankheitsausbrüche dokumentiert, die mit verunreinigtem Wasser in Verbindung gebracht wurden. Die Kontamination des Wassers mit Yersinien erfolgt vermutlich über tierische Ausscheider, wie zum Beispiel Vögel, Nagetier und Kleinwild (STENGEL 1986). Bei den Untersuchungen von Oberflächenwasser und Wasser aus Straßenbrunnen durch STENGEL (1986) konnte in keiner der genommenen Proben *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden, dagegen wurden drei Mal *Y. intermedia* und ein Mal *Y. frederiksenii* gefunden. Die in früheren Untersuchungen durch andere Forscher nachgewiesenen Yersinien führte der Autor auf die regional unterschiedliche Infektionshäufigkeit bei den tierischen Ausscheidern und deshalb auf ein nicht regelmäßiges Vorkommen des Erregers in Wasser zurück. Eine Studie, die von Oktober 1988 bis Januar 1990 in Norwegen durchgeführt wurde, ergab, dass die an Gastroenteritis erkrankten Personengruppen neben nicht ausreichend erhitztem Schweinefleisch und Würsten zum Teil auch unbehandeltes Wasser konsumiert hatten (OSTROFF et al. 1994).

3.1.3 Vorkommen in Milch und Milchprodukten

Trotz Vorliegen einiger Berichte von *Y. enterocolitica* beim Rind, geht man davon aus, dass diese Species kein Reservoir für den Erreger darstellt. Nur selten werden pathogene Serovaren in Rohmilch gefunden. Es wird davon ausgegangen, dass Milch nachträglich durch andere Quellen, wie z.B. Schweine, menschliche Ausscheider oder Wasser kontaminiert wird. Die Ursache größerer Ausbrüche, die zum Beispiel in den USA vorkamen, ist in rekontaminierter pasteurisierter Milch, Schokoladenmilch und anderem zu suchen (BECKER 1991).

Bei einer Untersuchung von 211 Rohmilchproben im Jahre 1999 in Ankara, wurden acht Mal (3,79%) apathogene *Y. enterocolitica* und sechs Mal (2,84%) andere *Yersinia*-Species gefunden (URAZ und YUCEL 1999). In anderen Versuchen konnten bei 250 Proben von pasteurisierter Milch und 50 Rohmilchproben *Y. intermedia* und *Y. frederiksenii* nachgewiesen werden, *Y. enterocolitica* jedoch nicht (PADHILA et al. 2001).

3.1.4 Vorkommen in Fischen und Fischprodukten

Von LÖTSCH et al. (1986) wurden Untersuchungen an Fischen und Fischprodukten durchgeführt. In den untersuchten Süßwasserfischen konnten zwar *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden, jedoch gehörten sie den apathogenen Serotypen O:6 und O:5 an. Bei den aus Fischsalatproben isolierten *Y. enterocolitica* handelte es sich um die Serotypen O:10 und O:7, 8. Gleiches wurde von FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001d) und PULLELA et al. (1998) bestätigt. Hier wurden ebenfalls keine pathogenen *Y. enterocolitica* in Fischen nachgewiesen.

3.2 Übertragungswege

In der Literatur wird eine Infektion mit *Y. enterocolitica* meist als „food-borne“, also als eine über die Nahrung erfolgte Infektion, bezeichnet (SCHIEMANN 1982; KAPPERUD 1991). Die oral-alimentäre Infektion durch kontaminierte Lebensmittel erfolgt meist durch den Verzehr von rohem Schweinefleisch (TAUXE et al. 1987; ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001b), ist aber auch über Milchprodukte, Trinkwasser und andere Lebensmittel möglich (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). In **Tabelle 7** (S. 24) sind Krankheitsausbrüche im Zusammenhang mit dem Land, dem Monat, der Anzahl der Fälle, der vermuteten Ursache und dem Serotyp zusammengestellt. Bisher gelang es allerdings ausgesprochen selten, den ursächlichen Zusammenhang zwischen der menschlichen Erkrankung und dem kontaminierten Lebensmittel herzustellen (SCHIEMANN et al. 1989).

Tab. 7: *Y. enterocolitica* bedingte Krankheitsausbrüche aufgegliedert nach Land, Monat, Anzahl der Fälle vermuteter Ursache und Serotyp (nach COVER und ABER 1989)

Ort	Monat	Anzahl der Fälle	Ursache	Serotyp
Finnland	April	7	Krankenhauspatient	O:9
North Carolina	April	16	Hund	O:8
Kanada	April	138	rohe Milch (?)	O:5, 27
New York	September	38	Schokoladenmilch	O:8
Japan	April	1051	Milch	O:3
Neufundland	Juli	9	Krankenhauspatient	O:5
New York	Juli	159	Trockenmilch	O:8
Washington	Dezember	50	Tofu, Quellwasser	O:8
Pennsylvania	Februar	16	Bohnen	O:8
Südamerika	Juni	172	pasteurisierte Milch	O:13a, 13b
Tschechien	September	15	nicht identifiziert	O:3
Japan	Januar	189	nicht identifiziert	O:3
Japan	Juli	544	nicht identifiziert	O:3
Japan	Juli	198	nicht identifiziert	O:3
Japan	April	296	nicht identifiziert	O:3
Japan	Juni	145	nicht identifiziert	O:3
Japan	Januar	6	nicht identifiziert	O:3
Japan	November	184	nicht identifiziert	O:3
Japan	Mai	641	nicht identifiziert	O:3
Japan	Juni	102	nicht identifiziert	O:3

4 Bedeutung von *Yersinia enterocolitica* für Mensch und Tier

4.1 Geographische Verbreitung

Y. enterocolitica findet man in den gemäßigten und subtropischen Klimazonen Europas, Nord- und Südamerikas, Nord- und Ostasiens. In Australien und Südafrika trifft man den Erreger vor allem in den kühleren Jahreszeiten an (KAPPERUD 1981; DEDIE et al. 1993).

4.2 *Y. enterocolitica* beim Tier

Beim Rind:

Rinder können Träger pathogener *Y. enterocolitica*-Isolate sein und diese mit dem Stuhl ausscheiden. Vorherrschend scheint dabei der Serotyp O:9, Biotyp 2 oder 3 zu sein (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1996). Bei experimenteller Infektion von Jungtieren kann es zu intermittierenden Durchfällen, Hyperplasie der Peyerschen Platten und der entsprechenden Darmlymphknoten kommen (GARIN-BASTUJI et al. 1999). Als seltene Komplikationen wurden Mastitiden, mesenteriale Lymphadenitiden und Aborte beschrieben. Bei Untersuchungen von NATTERMANN et al. (1986) wurden bei 11% der untersuchten Aborte von Rindern *Y. enterocolitica* nachgewiesen. Eine potentielle Gefahr der Kontamination von Schlachttierkörpern scheint daher gegeben, jedoch wurden bei Untersuchung von Kot- und Tonsillenproben durch BUCHER et al. (2001) am Münchener Schlacht- und Viehhof keine pathogenen Yersinien nachgewiesen.

Bei kleinen Wiederkäuern:

In Europa tritt bei Schaf und Ziege überwiegend der pathogene *Y. enterocolitica*-Typ O:2, 3 Biotyp 5 auf. In Deutschland wurden klinische Ausbrüche bisher selten beschrieben (WUTHE und ALEKSIC 1997). Die Erkrankung tritt überwiegend beim Jungtier auf. Die typische Symptome Kümern und Durchfall standen in Verbindung mit Stressfaktoren, wie z.B Futterumstellung, Absetzen, Scheren und Aufzucht sowie feuchtem Klima (SLEE und BUTTON 1990; SLEE und SKILBECK 1992; BIN-KUN et al. 1994). Bei Untersuchungen von 13 Aborten durch NATTERMANN et al. (1986) wurden in 30,8% der Fälle *Y. enterocolitica* nachgewiesen.

Bei Hasen und Kaninchen:

In Frankreich sind in den fünfziger Jahren tödliche Erkrankungen von Hasen durch *Y. enterocolitica* aufgetreten. Die isolierten Stämme wurden als sog. „Hasentyp“ der Serovar-Biovar-Kombination O:2, 3 5 zugeordnet (WUTHE und ALEKSIC 1997). Typische Symptome bei Hasen und Kaninchen sind (hämorrhagische) Enterocolitis, fibrinöse Pleuritis und mesenteriale Lymphadenitis. Ebenso können granulomatöse Splenomegalie und Kachexie auftreten (NEUBAUER et al. 2001a).

Bei Chinchillas:

Infektionen von Chinchillas durch die Serovare O:1, 2a, 3 Biovar 3 wurden in verschiedenen Ländern beschrieben (NEUBAUER et al. 2001a; DEDIE et al. 1993). In Zuchten kann sich der Erreger vermutlich über Jahre subklinisch halten. Typisches Krankheitsbild ist eine fibrinöse Enterocolitis und die Ausbildung von Granulomen in verschiedenen Organen (NEUBAUER et al. 2001a). Akut-septikämisch erkrankte Tiere verenden nach 1-2 Tagen (DEDIE et al. 1993).

Bei Pferden:

Untersuchungen zu Vorkommen und Klinik der Yersiniose beim Pferd liegen zurzeit nicht vor. Es existieren nur Beschreibungen von Einzelbeobachtungen (NEUBAUER et al. 2001a). So konnten NATTERMANN et al. (1986) bei neun abortierten Pferdefohlen drei Mal *Y. enterocolitica* nachweisen.

Beim Nutzgeflügel:

Auch vom Geflügel fehlen genauere Untersuchungen. Vereinzelt Erkrankungen und die Isolierung von pathogenen Yersinien (O:3 und O:9) aus seziierten Hühnern wurden beschrieben (NATTERMANN et al. 1986). Bei Untersuchungen von Kot und Abstrichen aus der Schnabelhöhle durch BUCHER et al. (2002) konnten keine pathogenen *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden.

Bei Hund und Katze:

Hunden wird vor allem eine Rolle bei der Einbringung von Yersinien in die Haushalte zugeschrieben. Eine Infektion erfolgt zum einen über infizierte frei lebende Nager, zum anderen, ebenso wie beim Menschen, durch die Aufnahme von rohem oder nicht vollständig erhitztem Schweinefleisch (CHRISTENSEN 1987a; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001c). Zumeist wird der Serotyp O:3, Biotyp 4 isoliert (CHRISTENSEN

1987a; FANTASIA et al. 1993; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001c). Der Verlauf ist größtenteils asymptomatisch, es wird aber auch über Durchfälle (FANTASIA et al. 1993), Infektionen der Analdrüsen, mesenteriale Adenitis u.ä. berichtet. Eine Übertragung innerhalb der Gruppe erfolgt durch das typische Sozialverhalten (NEUBAUER 2001a). Bei der Untersuchung von 200 Fäcesproben vom Hund betrug die Nachweishäufigkeit für humanpathogene *Y. enterocolitica* 1,0% (WEBER und LEMBKE 1981).

Bei Katzen verhält es sich ähnlich wie bei Hunden. Infizierte Katzen können asymptomatische Träger sein, es werden aber auch vereinzelte Fälle von Durchfallssymptomatik beschrieben. In 0,8% von 252 Kotproben konnten humanpathogene *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden (WEBER und LEMBKE 1981).

4.3 *Y. enterocolitica* speziell beim Schwein

Schweine wurden in der Literatur wiederholt als Hauptreservoir von *Y. enterocolitica* des Bioserotyps 4/O:3 beschrieben (BOTTONE 1997). Pathogene *Y. enterocolitica* wurden häufig von Tonsillen und Kot geschlachteter Schweine isoliert (CHRISTENSEN 1987a; DE BOER and NOUWS 1991; BÜLTE et al. 1991; FUNK et al. 1998; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000a). Bei Untersuchungen von Schlachtschweinen im Raum München war die Prävalenz des *Y. enterocolitica* Bioserotyps 4/O:3 in Tonsillen deutlich höher als im Kot (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000c).

Bei experimenteller Infektion von Schweinen traten neben Enteritis, Arthritis, Pneumonie und der damit verbundenen Minderleistung, Entwicklungsstörungen und Jungtierverluste, Fruchtbarkeitsstörungen und Aborte auf (NATTERMANN et al. 1985). THIBODEAU et al. (1999) zeigten, dass *Y. enterocolitica* nach einer Infektion länger in den Tonsillen als im Kot nachweisbar ist.

4.4 *Y. enterocolitica* – Infektionen beim Menschen

Bei der *Y. enterocolitica*-Infektion des Menschen kann man eine Einteilung in einen gastrointestinalen und einen extraintestinalen Verlauf vornehmen.

4.4.1 Gastrointestinaler Verlauf:

Die Inkubationszeit bei einer *Y. enterocolitica* Infektion beträgt 3-10 (durchschnittlich 3-7) Tage (N.N. 2002a). Die am häufigsten genannten klinischen Symptome sind Fieber, abdominale Schmerzen und Durchfall (SCHIEMANN 1989; DEDIE et al. 1993). Da das klinische Bild häufig einer Appendizitis ähnelt, spricht man auch von Pseudoappendizitis (COVER und ABER 1989). Die Erkrankung kann in jedem Alter auftreten, bevorzugt sind aber Kinder und Jugendliche betroffen (FEHLHABER und JANETSCHKE 1992). Bei Untersuchungen von HOOGKAMP-KORSTANJE et al. (1995) wurde festgestellt, dass Kinder unter 5 Jahren meist an Gastroenteritis erkrankten, während die Pseudoappendizitis häufiger bei Kindern über 5 Jahren und bei jungen Erwachsenen auftrat.

4.4.2 Extraintestinaler Verlauf:

Bei älteren oder immungeschwächten Patienten kann eine Infektion mit *Y. enterocolitica* neben der oben angesprochenen Symptomatik auch einen septikämischen Verlauf aufweisen. Neben Alter und Immunschwäche gelten auch Diabetes, Lungenentzündung und Leberzirrhose als prädisponierende Faktoren (COVER und ABER 1989; SCHIEMANN 1989; NEUBAUER et al. 2001b). Die Septikämie kann einen lebensbedrohlichen Verlauf nehmen (COVER und ABER 1989).

Verschiedene Studien identifizierten eine Yersiniose auch als Ursache einer Arthritis und des Reiter-Syndroms (COVER und ABER 1989; SCHIEMANN 1989). Beim Reiter-Syndrom handelt es sich um eine Kombination von Arthritis, Urethritis und Konjunktivitis (N.N. 1990). Die Yersinien-Arthritis gehört zur Gruppe der infektreaktiven Arthritiden. Nach einem Zeitraum von 1-3 Wochen kommt es dabei zu einer Arthritis vor allem in den Gelenken der unteren Körperhälfte, also den Knien, aber auch den Sprung- und Zehengelenken. Ebenfalls werden häufig tiefsitzende Kreuzschmerzen beschrieben, die auf eine Entzündung des Kreuz-Darmbein-Gelenkes hindeuten (N.N. 2001b).

Ebenfalls findet das Erythema nodosum in der Literatur Erwähnung (COVER und ABER 1989; SCHIEMANN 1989). Dabei handelt es sich um eine Erkrankung, die mit dem

Auftreten von roten, erbsen- bis walnussgroßen, unscharf begrenzten druckschmerzhaften Knoten vor allem im Bereich der Unterschenkelstreckseiten, Knie- und Fußgelenke verbunden ist (N.N. 1990).

Des Weiteren werden mit einer *Y. enterocolitica*-Infektion Endocarditis, Glomerulonephritis, Lebererkrankungen und viele andere Erkrankungen in Verbindung gebracht (COVER und ABER 1989; SCHIEMANN 1989).

4.5 Volkswirtschaftliche Schäden

Nach den Angaben der WHO (N.N. 1991) führen Lebensmittel-Kontaminationen zu erheblichen wirtschaftlichen Kosten. Die Berechnung der entstehenden Kosten richtet sich in erster Linie nach den offiziell gemeldeten Erkrankungsfällen, allerdings werden nur ein Bruchteil der Fälle registriert, wie aus dem Bereich der Salmonelleninfektionen bekannt ist (KRUG und REHM 1983). Ab 1990 wurden in Deutschland Kosten in Höhe von 712 DM pro erkrankte Person für Behandlung und Arbeitsausfall aufgewendet. Der Gesamtschaden durch Salmonelleninfektionen belief sich für das Jahr 1991 auf etwa 1,2 Milliarden. DM (KOLB 1993). Für die Yersiniose liegt kein ebenso umfangreiches Datenmaterial vor.

Nach TAUXE et al. (1987) ist bei einer humanen Yersiniose mit einer Erkrankungsdauer von durchschnittlich 22 Tagen zu rechnen. Bei einem Großteil der Patienten konnte im Rahmen dieser belgischen Studie auch durch Medikamenteneinnahme der Verlauf der Erkrankung nicht wesentlich beeinflusst werden. Ungefähr 20% der Betroffenen wurden in eine Klinik überwiesen, der Krankenhausaufenthalt lag durchschnittlich bei neun Tagen (TAUXE et al. 1987). Da es sich bei den Erkrankten überwiegend um Kinder handelte, muss der Arbeitsausfall der pflegenden Personen, zumeist der Eltern, gerechnet werden. Schätzungen über die Kosten liegen jedoch nicht vor (NEUBAUER 2001b).

Laut NEUBAUER et al. (2001b) liegen entsprechende Angaben für Deutschland nicht vor. Die Autoren vermuten jedoch eine erhebliche volkswirtschaftliche Bedeutung, da eine relativ hohe Seroprävalenz (ca. 40%) an Yop-Antikörpern in der Normalbevölkerung vorliegt.

NESBAKKEN et al. (1991) wiesen auf die arbeitsmedizinische Bedeutung dieser Erkrankung hin. Diesen Untersuchungen zufolge hatte Personal, welches direkt in den Schlachtvorgang involviert war, höhere IgG-Konzentrationen als Personal, das in anderen Bereichen des Schlachthofs arbeitete.

Die wesentlichen Punkte für die Kostenanalyse scheinen allerdings klar. Neben den konkreten Kosten für Staat und Gesellschaft, wie Einbuße der Produktionskraft (N.N. 1991), gilt es auch die schwer messbaren Kosten zu erfassen, die durch Freizeitverlust, Schmerzen und Tod entstehen (SOCKETT 1991).

5 Maßnahmen zur Bekämpfung von Yersinien

5.1 Staatliche Maßnahmen

Die Lebensmittelsicherheit wird in Deutschland durch Rechtsvorschriften geregelt. Als Rahmenvorgabe kann hierbei das Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) (N.N. 1997) angesehen werden. Eine direkte Yersinien-Bekämpfung - wie zum Teil für andere Erreger - ist vom Gesetzgeber in Deutschland nicht vorgeschrieben. Vorhandene Sicherungsstrategien beziehen sich meist nur auf die Gesamtheit der Krankheitserreger oder ganz allgemein auf die Unschädlichkeit bzw. Unbedenklichkeit eines Lebensmittels. Nach § 8 LMBG darf beispielsweise kein Lebensmittel in den Verkehr gebracht werden, welches zu einer Schädigung der menschlichen Gesundheit führen könnte. Dabei ist die Eignung des Erregers zur Gesundheitsschädigung entscheidend, tatsächlich muss die Schädigung noch nicht eingetreten sein (MEYER 1998).

In § 5 der Fleischhygieneverordnung (FIHV) (N.N. 2001) ist als prophylaktische Maßnahme festgelegt, dass jedes Tier einer amtlichen Schlachtier- und Fleischuntersuchung unterzogen werden muss. Als präventive Schutzmaßnahme vor Yersinien kann man die Forderungen in Anlage 1 Kapitel II der FIHV ansehen. Hier wird die Vorgehensweise bei der Fleischuntersuchung dargestellt und in Nummer 5.4.1 ist festgelegt, dass die Tonsillen, die, wie bereits erwähnt, ein Reservoir für Yersinien darstellen, nach der fleischhygienerechtlichen Untersuchung entfernt werden müssen. Nur in Anlage 2a der Fleischhygieneverordnung (Hygienische Anforderungen an das Gewinnen, Zubereiten und Behandeln von Fleisch in zugelassenen Betrieben) und in der Hackfleischverordnung wird auf bestimmte Keimarten bzw. Keimgruppen eingegangen. Die Yersinien finden jedoch keine ausdrückliche Nennung. Ebenso wurden sie nicht in die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG mit einbezogen. Spezielle Erwähnung findet *Y. enterocolitica* dagegen im Infektionsschutzgesetz (IfSG) (N.N. 2001). Seit 2001 ist der direkte oder indirekte Nachweis des Erregers beim Menschen, sobald er im Zusammenhang mit einer akuten Infektion steht, laut § 7 IfSG (N.N. 2001) meldepflichtig.

5.2 Freiwillige Maßnahmen am Beispiel des Systems der QS - Qualität und Sicherheit GmbH

Die Sorgfaltspflicht ist im Lebensmittelrecht nicht ausdrücklich festgelegt. Doch aus der Verpflichtung der Verantwortlichen, den Schutz des Verbrauchers vor Gesundheitsschäden und Irreführung zu gewährleisten, ergibt sich eine Sorgfaltspflicht (TERNES und QUINT 1994). In der Bundesrepublik Deutschland wurde zur Verbesserung des Verbraucherschutzes und zur Erhöhung der Transparenz der Lebensmittelgewinnung das sogenannte „QS“ ins Leben gerufen. Träger dieses Zeichens ist eine eigens von allen Teilnehmern der Lebensmitteleproduktion ins Leben gerufene GmbH, die ihre Tätigkeit bereits auf allen Ebenen der Lebensmittelgewinnung und -verarbeitung aufgenommen hat (HENTSCHE 2002).

Das Ziel von QS ist es, dem Verbraucher Qualität und Sicherheit zunächst von Fleisch und Fleischprodukten zu gewährleisten. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein System zur Qualitätssicherung eingeführt. Es umfasst alle Produktionsprozesse, von der Geburt über die Mast, Schlachtung, Zerlegung und Verarbeitung bis hin zu Transport und Lagerung. Zusätzlich soll die Herkunft der Rohstoffe rückverfolgbar gemacht werden und dem Tierschutz Rechnung getragen werden. Dadurch soll eine Transparenz auf allen Ebenen der Herstellung, von der Geburt bis in den Handel erreicht werden. Die genannten Standards sollen ebenso für Inland- wie für Importprodukte gelten. Unabhängige Prüfinstitute kontrollieren, ob der jeweilige Betrieb die Vorgaben der QS erfüllt, ein unabhängiger Sanktionsbeirat entscheidet über notwendige Maßnahmen. Werden sämtliche Anforderungen, die zum Teil über die gesetzlichen Bestimmungen hinausgehen, erfüllt, wird ein Zeichennutzungsvertrag mit dem Zeichengeber, der CMA (Centrale Marketing-Gesellschaft der deutschen Agrarwirtschaft mbH), geschlossen und das Prüfzeichen vergeben (N.N. 2002b).

5.3 Mögliche Maßnahmen im Rahmen der Fleischgewinnung und -verarbeitung

5.3.1 Kritische Bereiche der Schweineschlachtung

Das Schwein gilt nach wie vor als Hauptreservoir für pathogene *Y. enterocolitica* (SCHIEMANN 1989; BOTTONE 1997; KAPPERUD 1991). Hinzu kommt, dass es das am häufigsten zur Lebensmittelgewinnung dienende Tier ist, welches pathogene Stämme von *Y. enterocolitica* beherbergt und oftmals symptomloser Träger ist (SCHIEMANN 1989). In diesem Kapitel soll die Schweineschlachtung im Hinblick auf ihre Hygienrisiken betrachtet und nach möglichen Ursachen für die Kontamination mit pathogenen *Y. enterocolitica* gesucht werden.

Bereits vor der Schlachtung bestehen erste Möglichkeiten der äußeren Kontamination und der horizontalen Übertragung. Wenn die Tiere bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht infiziert bzw. kontaminiert sind, so kann dies zum Zeitpunkt der Aufstallung mit Tieren aus Fremdbeständen durch horizontale Übertragung (Koprophagie, direkten Körperkontakt) geschehen (FUKUSHIMA et al. 1989). Ein entsprechendes Geschehen wurde unlängst beim Schwein anhand der Salmonellen dokumentiert (GREIL 2001). Ein bestandsweites Programm zur Reduzierung des Eintrags von Salmonellen über Schlachtschweine in die Fleischerzeugung (STEFFL 1998) wurde bereits modellhaft vorgestellt und könnte entsprechend für Yersinien adaptiert werden. Alternative Fleischuntersuchungsmodelle bieten die hierfür nötige Möglichkeit, die Primärproduktion fest in Qualitätssicherungssysteme einzubinden (DAVID 1994). Damit wird der Landwirt zum verantwortungsvollen Lebensmittelproduzenten (BOLLWAHN 1994) als Voraussetzung für eine kontaminationsrisikoarme Schlachtung (STOLLE 1989).

Die Schweineschlachtung beinhaltet als wesentliche Prozessstufen (nach PRÄNDL et al. 1988):

- Aufstallung
- Betäubung
- Entbluten
- Brühen und Enthaaren
- Ausweiden
- Spalten der Tierkörper
- Kühlung

Besonders kritische Bereiche im Schlachtprozess sind nach STOLLE (1989) aus nachfolgender Auflistung ersichtlich:

- Bruststich/Herz
- Blutgewinnung
- Brühwasser < +60°C
- ungenügende Wasserzufuhr
- Aufnahme von Wasser in den Schlachtkörper (> 1%)
- Entborsten
- Kreuzkontakt Organe/Tierkörper

Um die Kontamination so gering wie möglich zu halten, sollten vor allem die stark keimbelasteten Tonsillen und der Pharynx so früh wie möglich entfernt werden (CHRISTENSEN 1987). In Deutschland wird üblicherweise das Geschlinge, dazu gehören Zunge, Tonsillen, Trachea, Oesophagus, Lunge, Herz, Zwerchfell und Leber, während des Schlachtvorganges als Ganzes aus dem Schlachttierkörper entfernt und aufgehängt. Eine Kontamination der anderen Organe über Tonsillen und Zunge ist also möglich, aber auch die des restlichen Tierkörpers, da eine vollständige Entfernung der Tonsillen am Kopf nicht in vollem Umfang gewährleistet ist (BUCHER 2001). Somit ist eine Ausbreitung von *Y. enterocolitica* nicht zu verhindern (NIELSON und WEGENER 1997; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000c, 2001a). Des Weiteren sollte das Rektum vor dem Ausweiden stets mit einem Plastikbeutel verschlossen werden,

da Kot als eine der wichtigen Ursachen für die Kontamination anzusehen ist (NESBAKKEN et al. 1994).

Desgleichen muss eine mögliche Keimverschleppung durch verschmutzte Geräte in Betracht gezogen werden (ANDERSEN 1988; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000c). Während des gesamten Schlachtprozesses ist häufiges Berühren der Tierkörper mit bloßen Händen, ebenso wie häufiges Einstechen von Messern in die Tierkörper zu vermeiden. Bei Missachtung dieser Grundlagen hygienischer Aspekte erhöht sich mit Sicherheit eine Gefahr der Kreuzkontamination (SCHÜTZ 1991). Das permanente Aufrechterhalten eines strikten Hygieneregimes ist daher im Bereich Personal, Produktionsprozess und Ausstattung Grundlage jedes bewussten Handelns (FEHLHABER und JANETSCHKE 1992). Inwieweit die Zerlegung der Tierkörper, die Produktion von Fleischerzeugnissen sowie der Transport und Vertrieb die Ausbreitung von *Y. enterocolitica* fördern, ist in Deutschland bisher noch nicht untersucht (NEUBAUER et al. 2001b).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Kontrollmaßnahmen bereits im Rahmen der Primärproduktion eingeführt werden sollten (BOLLWAHN 1994; NEUBAUER 2001b). Als hilfreich werden hierbei Qualitätssicherungssysteme angesehen, von der Zucht, Aufzucht und Mast einerseits, bis zur Fleischgewinnung und Verarbeitung andererseits (BLAHA 1995). Die Bemühungen des Prüfzeichens des Systems „Qualität und Sicherheit“ in Deutschland decken diesen Bereich ab (STOLLE und BABEL 2002). Ein Problem stellt allerdings der hohe Durchseuchungsgrad der Schweinebestände mit Yersinien dar (CHRISTENSEN 1987a). Ob Muttertierimpfungen zur Minimierung der Erregerpersistenz der richtige Weg sind, muss erst noch überprüft werden (NEUBAUER et al. 2001b). Da sich *Y. enterocolitica* jedoch sehr schnell durch Zukauf infizierter Tiere (SKEJERVE et al. 1998), durch infiziertes Sperma oder Abortmaterial nach intrauteriner Infektion etablieren und ausbreiten kann (NATTERMANN et al. 1986), sollte vor allem Augenmerk auf kontrollierten Tierzukauf, bei Kauf von Sperma und eine konsequente Stallhygiene als bestimmende Maßnahmen in den Mittelpunkt gerückt werden (NEUBAUER et al. 2001b).

Zusätzlich sollten bessere Kontrollmaßnahmen im Bereich des Handels eingeführt werden. Bereits 1997 konnten FUKUSHIMA et al. aus nach Japan importiertem Fleisch pathogene *Y. enterocolitica* isolieren. Das Schweinefleisch stammte aus Dänemark, USA, Taiwan und Kanada.

5.3.2 Maßnahmen bei der Fleischverarbeitung

5.3.2.1 Verfahren der Haltbarmachung im Überblick

Fleisch nimmt wegen des sensorischen und ernährungsphysiologischen Wertes einen wichtigen Platz in der Ernährung des Menschen ein. Seit jeher hat der Verbraucher dabei Lebensmittel geschätzt, die er unabhängig von Temperatur, Klima und Marktschwankungen zur Verfügung hat. Dieses Thema einer sachgerechten Behandlung zur Verlängerung der Haltbarkeit besitzt ungebrochene Aktualität und hat eine Fülle von Methoden hervorgebracht, die im folgenden Überblick, unter Berücksichtigung des Verhaltens von *Y. enterocolitica*, kurz zusammengestellt sind.

Grundsätzlich wird zwischen physikalischen und chemischen Methoden der Haltbarmachung unterschieden. Zu den physikalische Methoden zählen unter anderem Kältebehandlung, also Kühlen und Gefrieren, Hitzebehandlung wie Pasteurisieren und Sterilisieren, Trocknen mittels partiellem Wasserentzug oder Gefriertrocknung und Bestrahlung durch UV-Strahlen oder ionisierende Strahlen. Zu den chemischen Methoden zählen Salzen mittels Kochsalz, Pökeln, entweder als Nitratpökeln mit Fermentation oder als Nitritpökeln, Räuchern, entweder als direkte Anwendung (Holzrauch) oder als indirekte Anwendung (Rauchkondensate und -extrakte), Säuern mittels organischer Genusssäuren (pH-Wert Senkung) und die Nutzung von Konservierungsstoffen (PRÄNDL et al. 1988; FEHLHABER und JANETSCHKE 1992; SINELL 1992).

5.3.2.2 Physikalische Methoden

- **Kältebehandlung**

Kälte wird häufig zur Verlängerung der Haltbarkeit von leicht verderblichen Lebensmitteln verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass durch das Absenken der Temperatur das Wachstum der Mikroorganismen kontinuierlich abnimmt, bis eine minimale Wachstumstemperatur erreicht wird (PRÄNDL et al. 1988). Unterhalb dieser minimalen Wachstumstemperatur kommt das Wachstum zum Stillstand (SINELL 1992). Durch das Gefrieren werden schließlich Mikroorganismen möglicherweise letal geschädigt und bestimmte empfindliche Species abgetötet (PRÄNDL et al. 1988).

Yersinien gehören zur Gruppe der psychrotrophen Keime, sie können sich also im Temperaturbereich von 0 bis +37°C noch vermehren (SINELL 1992), zusätzlich überleben sie unbeschadet den Gefriervorgang. Durch eine Lagerung im Kühlschrank kann also eine Vermehrung der Yersinien nicht unterbunden werden und selbst durch den Tiefgefriervorgang bei -18°C erfolgt keine Abtötung (TOORA et al. 1992).

- **Hitzebehandlung**

Das Erhitzen von Fleisch und Fleischwaren dient zum einen dem Erreichen eines genussfähigen Zustandes, zum anderen werden Fleischwaren durch Erhitzen haltbar gemacht. Prinzipiell unterscheidet man Erhitzungsverfahren, die der Zubereitung von Fleisch dienen („Garverfahren“), von Erhitzungsverfahren als Teil des Herstellungsverfahrens bei Fleischwaren, z.B. bei Kochwürsten (PRÄNDL et al. 1988).

Nach den Untersuchungen von HEIM et al. (1984) handelt es sich bei *Y. enterocolitica* um einen Keim mit sehr geringer Hitzestabilität. **Tabelle 8** (S. 38) fasst die Ergebnisse der Studien dieser Autoren zusammen. Wie hieraus ersichtlich, führt bereits eine 15 minütige Erhitzung auf +57°C bzw. eine 5 minütige Erhitzung auf +60°C zur Inaktivierung des Erregers.

Tab. 8: Anzahl der überlebenden *Y. enterocolitica*-Stämme bei verschiedenen Erhitzungsbedingungen (n = 79) (HEIM et al. 1984)

Erhitzungs- dauer	Temperaturen in °C (+)						
	43	45	48	51	54	57	60
5 min	79	79	79	79	79	29	0
10 min	79	79	79	79	n.b.	2	0
15 min	79	79	79	79	9	0	0
30 min	79	79	79	75	0	0	0
1 h	79	79	79	49	0	0	0
2 h	79	79	79	2	0	0	0
3 h	79	79	76	0	0	0	0
4 h	79	79	72	0	0	0	0
5 h	79	78	61	0	0	0	0
1 d	79	0	0	0	0	0	0
2 d	79	0	0	0	0	0	0

n.b.: nicht bekannt

Eine Erhitzung von Lebensmitteln auf weniger als +100°C wird als Pasteurisierung bezeichnet. Dabei werden überwiegend vegetative Mikroorganismen abgetötet. Bei der Sterilisation wird das Produkt einer Hitzebehandlung unterzogen, die sowohl die vegetativen Mikroorganismen als auch Sporen abtötet. Dadurch wird eine lange Haltbarkeit ohne Kühlung oder andere haltbar machende Prozessfaktoren ermöglicht (PRÄNDL et al. 1988; FEHLHABER und JANETSCHKE 1992).

Nach Untersuchungen von HEIM et al. (1984) dürften nach sachgemäß durchgeführter Pasteurisierung, abhängig von der Ausgangskeimzahl lebender Mikroorganismen und den Bedingungen im Lebensmittel, keine lebenden *Y. enterocolitica*-Keime mehr vorhanden sein.

- **Trocknen**

Beim Trocknen wird das Lebensmittel durch teilweisen oder völligen Wasserentzug haltbar gemacht. Durch die Senkung des Wassergehaltes wird der Lebensraum für Mikroorganismen eingeschränkt und ihnen gleichzeitig Wasser entzogen. Daraus resultierend wird ihr Stoffwechsel reduziert und die Vermehrung zum Teil sogar eingestellt (PRÄNDL et al. 1988). Allerdings ist zu bedenken, dass durch schonende Trocknung Mikroorganismen eventuell konserviert werden und bei erneuter Wasseraufnahme neue Aktivität erlangen können. Die Palette der Verfahren ist weit gespannt, von der Trocknung in der Sonne (SINELL 1992) bis zur Verwendung moderner Klimakammern (FEHLHABER und JANETSCHKE 1992).

Spezielle Angaben über das Verhalten von *Y. enterocolitica* gibt es hierzu nicht. Yersinien gehören jedoch zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Es kann somit von einem ähnlichen Verhalten ausgegangen werden. Die minimale Wasseraktivität für diese Gruppe liegt nach Angaben von FEHLHABER und JANETSCHKE (1992) bei 0,95.

- **Bestrahlen**

Durch das Bestrahlen von Lebensmitteln will man eine lange Haltbarkeit erreichen und gleichzeitig den Frischezustand des Produkts erhalten (PRÄNDL et al. 1988). Strahlen, die im Rahmen der Lebensmittelbehandlung verwendet werden, sind ionisierend. Zum einen können elektromagnetische Wellenstrahlen mit Wellenlängen von 10^{-6} (UV-), 10^{-9} (Röntgen) und 10^{-11} cm (Gamma-Strahlen) verwendet werden, zum anderen Korpuskularstrahlen, wobei nur Elektronenstrahlen Einsatz finden (SINELL 1992). Ausgedrückt wird die Bestrahlungsdosis durch die je Masseneinheit des bestrahlten Lebensmittels absorbierte Energie. Je nach Dosis werden unterschiedliche Effekte erreicht. Geringe Dosen verhindern beispielsweise unerwünschtes Auskeimen von Kartoffeln oder Zwiebeln, während eine höhere Dosierung zum Absterben von Mikroorganismen führt (SINELL 1992; STOLLE und SCHALCH 1993).

Bei Untersuchungen von SHENOY et al. (1998) waren Bestrahlungen mit 1,0 kGy ausreichend, um *Y. enterocolitica* vollständig abzutöten.

5.3.2.3 Chemische Methoden

- **Salzen und Pökeln**

Unter Salzen versteht man die Zugabe von Kochsalz zu Fleisch oder anderen tierischen Produkten zum Zwecke der Haltbarmachung (PRÄNDL et al. 1988). Das Prinzip beruht auf der Senkung der Wasseraktivität (SINELL 1992). Beim Pökeln werden spezielle Pökelfarbstoffe (Nitrat oder Nitrit) eingesetzt, um das Produkt haltbar zu machen und um ihm Pökelfarbe und -aroma zu verleihen (PRÄNDL et al. 1988).

Laut HEIM et al. (1984) fördern steigende Nitritkonzentrationen, insbesondere in Kombination mit erhöhtem Kochsalzgehalt und saurem pH-Wert, die Hemmwirkung auf *Y. enterocolitica*. In Untersuchungen von NOPPINGER et al. (2000) zeigte nur ein untersuchter pathogener *Y. enterocolitica*-Stamm bei Erhöhung der Kochsalzkonzentration von 0,5% auf 5% und einer Wachstumstemperatur von +5°C ein verändertes Wachstumsverhalten.

- **Räuchern**

Beim Räuchern wirken die Gase und Dämpfe nicht vollständig verbrannter Pflanzenteile, zumeist Holz, auf Lebensmittel. Dadurch wird das Gefüge, die Farbe, sowie Geschmack und Geruch beeinflusst und die Haltbarkeit erhöht (PRÄNDL et al. 1988). Der Dekontaminationseffekt wird hierbei durch direkte Wirkung verschiedener Rauchinhaltsstoffe, durch die damit einhergehende Trocknung und die eventuell einwirkende Hitze erzielt (SINELL 1992).

- **Säuerung**

Die Senkung des pH-Wertes von Fleischerzeugnissen erfolgt entweder im Verlauf der Reifung oder durch direkte Zugabe von Genuss säuren, wie z.B. Essigsäure. In erster Linie dient sie der Geschmacksbeeinflussung. Eine starke Säuerung würde zwar eventuell vorhandene bedenkliche Mikroorganismen abtöten und auch Verderbniskeime hemmen, das Produkt wäre dann aber nicht mehr für den Verzehr geeignet (PRÄNDL et al. 1988). Die antimikrobielle Wirkung der pH-Wert Senkung beruht

auf einer Wachstumshemmung der Keime. Da eine zu starke Säuerung eines Lebensmittels aus den oben angegebenen Gründen nicht möglich ist, wird diese Art der Haltbarmachung meist in Kombination mit anderen Verfahren, wie zum Beispiel Kühlung und Erhitzung, eingesetzt. Großtechnisch wurden bereits Versuche mit dem Besprühen von Schlachtierkörpern (Rind, Schwein, Geflügel) mit Milchsäure in Kombination mit anderen Genusssäuren durchgeführt. Allerdings ist diese Art der Oberflächenbehandlung in der EU nicht zugelassen (STOLLE 1999).

Bei Untersuchungen von NOPPINGER et al. (2000) wurde festgestellt, dass die Senkung des pH-Wertes eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von pathogenen *Y. enterocolitica* hat.

- **Konservierungsstoffe**

Durch die Anwendung von Konservierungsstoffen wird der Stoffwechsel und das Wachstum von Bakterien, Schimmelpilzen und Hefen gehemmt. Ebenso wie man verschiedene Konservierungsstoffe gemeinsam anwenden kann, können sie auch mit physikalischen Verfahren der Haltbarmachung kombiniert werden (FEHLHABER und JANETSCHKE 1992). Die heutzutage verwendenden Konservierungsstoffe sind in Anlage 3 Liste A der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZZuIVO) des Lebensmittelrechts aufgeführt. Dazu gehören beispielsweise Sorbinsäure, Benzoesäure und andere. (N.N. 1997a)

5.3.3 Anwendung von GMP und HACCP in registrierten Betrieben

5.3.3.1 Grundlagen

Unter hygienischer Sicherheit ist v.a. die Abwesenheit mikrobiell bedingter Gesundheits- und Verderbsgefährdungen zu verstehen. Solche Produkteigenschaften sind nur durch weitgespannte Vorbeugemaßnahmen zu erreichen (SINELL 1997), die dem Gesundheitsschutz des Menschen dienen. Schon immer gehörte zu den Aufgaben der Veterinärmedizin neben der kurativen Tätigkeit eben auch dieser Gesundheitsschutz des Menschen (STOLLE 1999). Wichtige Grundsätze stellen hierbei die „Gute-Herstellungs-Praxis“ (GHP) bzw. „good manufacturing practice“ (GMP) und das

“Hazard analysis and critical control point“- (HACCP)-Konzept dar. Diese Prinzipien sind als internationale Empfehlungen produkt- oder verfahrensbezogen in den “Codes of Hygienic Practice” der Codex Alimentarius-Kommission der FAO/WHO zusammengefasst (N.N. 2002). Neben nationalen Rechtsvorschriften sind sie auch in übergeordneten EU-Normen einbezogen, zum Beispiel in der Lebensmittelhygiene-Richtlinie 93/43 EWG (N.N. 1993).

5.3.3.2 Gute-Herstellungs-Praxis – GHP

Die „Gute-Herstellungs-Praxis“ gehört ebenso wie das HACCP-Konzept zu den Qualitätssicherungsstrategien. Verfahrensgrundsatz der GHP ist es, übliche Herstellungsweisen mit neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen bei der Herstellung und Weiterbehandlung von Lebensmitteln zu kombinieren, um somit die Einhaltung grundlegender Hygieneprinzipien sicherzustellen (PRÄNDL et al. 1988).

Das Prinzip ist sehr einfach: Bestimmte Grundanforderungen müssen eingehalten werden. Dabei sind Hygiene und der Herstellungsvorgang mit Hilfe organisatorischer Maßnahmen so zu verbinden, dass die Hygiene einen untrennbaren Bestandteil des Produktionsprozesses darstellt (FEHLHABER und JANETSCHKE 1992).

5.3.3.3 Hazard Analysis and Critical Control Point – HACCP

Das HACCP-System beschreibt ein Konzept, welches Gefahren (hazards) biologischer, chemischer oder physikalischer Art in Lebensmitteln identifiziert, verifiziert und unter Kontrolle bringt (CORLETT 1997). Die Entwicklung des HACCP-Konzeptes begann bereits im Jahre 1959. Für die NASA sollte ein Lebensmittel hergestellt werden, das unter den Bedingungen der Schwerelosigkeit in Raumkapseln verwendet werden und gleichzeitig absolute Lebensmittelsicherheit gewährleisten konnte (UNTERMANN et al. 1990; CORLETT 1997). Der Versuch der systematischen Fehlervermeidung wurde schließlich weiterentwickelt und als HACCP-System veröffentlicht (CORLETT 1997).

Bei Einsatz des HACCP-Prinzips geht es um „Wissen, Messen und Machen“ (EISGRUBER und STOLLE 1994). Voraussetzung hierfür sind grundlegende mikrobiolo-

gische und technische Fachkenntnisse und der korrekte Gebrauch der definierten Begriffe, welche nachfolgend aufgelistet sind.

HACCP-Begriffe (N.N. 2002):

- Hazard: Gefährdung, Gefahr für die Gesundheit
(hierbei handelt es sich um einen Umstand oder ein Ereignis, so dass dadurch eine Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers besteht)
- Analysis: Analyse, Untersuchung der Gefährdung
- Critical: kritisch, entscheidend für die Beherrschung
- Control: Lenkung, Überwachung der Bedingungen
- Point: Punktstelle im Verfahren

Im Mittelpunkt stehen dabei die „Critical control points“ (CCP's), die risikoträchtigen kritischen Punkte. Hierbei handelt es sich um Stufen, Schritte oder Phasen in der Produktion, an denen eine Gefährdung erkannt und durch kontrollierte Maßnahmen beseitigt oder zumindest auf ein annehmbares Niveau reduziert werden kann, um so die Gefährdung zu beherrschen. Das HACCP-System zur Beherrschung spezieller Gefährdungen besteht aus sieben Grundsätzen (N.N. 2002).

Gemäß Codex Alimentarius Kommission (N.N. 2002) sind diese sieben Grundsätze des HACCP-Konzeptes:

Grundsatz 1:

Auflistung aller potentiellen Gefahren im Prozessablauf, Durchführung einer Gefahrenanalyse und Festlegung von Maßnahmen zur Beherrschung der erkannten Gefahren

Grundsatz 2:

Festlegung der „Critical Control Points“ (CCP's); Bestimmung der Verfahrensschritte, deren Überwachung eine Gefahr eliminieren bzw. auf ein annehmbares Niveau reduzieren kann

Grundsatz 3:

Festlegen von kritischen Grenzwerten für jeden CCP um diese unter Kontrolle zu halten

Grundsatz 4:

Erstellen eines „Monitoring-Systems“ (Überwachungssystem), das durch gezielte Messungen und Beobachtungen die Kontrolle über die CCP's gewährleistet

Grundsatz 5:

Bestimmung von Korrekturmaßnahmen bei Abweichungen vom Zielniveau

Grundsatz 6:

Festlegung der Verifikationsschritte, die die Wirkkraft des eingesetzten HACCP-Systems sowie das Überwachungssystem überprüfen

Grundsatz 7:

Erstellung der Dokumentation aller Vorgänge, Führen von Aufzeichnungen

Die betriebsintern festgelegten Werte müssen sich also immer im sicheren Bereich bewegen. Bei dem biologischen Substrat „Fleisch“ erscheint dies besonders schwierig, da es immer mit einem unvermeidlichen Keimgehalt (biolog. Hazard) belastet ist,

zu dem auch pathogene Mikroben gehören können (STOLLE und MÄRTLBAUER 1995). Inzwischen ist das HACCP-Konzept international als ein präventives System bei der Produktion sicherer Lebensmittel erprobt. In der EG-Richtlinie 93/43 (N.N. 1993) wurde dieses System für die Gewinnung und Herstellung aller Lebensmittel vorgeschrieben. In der Milch-, Fleisch- und Fischhygiene-Richtlinie wird auf die Einführung eines HACCP-Konzeptes als vorbeugende, qualitätssichernde Maßnahme verwiesen. Neu ist, dass ab Juni 2002 registrierte Betriebe (nach FIHV) (N.N. 2001) ein HACCP-Konzept vorweisen müssen. Wie im Einzelfall in kleinen Herstellerbetrieben ein HACCP-Plan einzurichten oder zu etablieren ist, kann nur auf Grund der konkreten Situation entschieden werden (STOLLE 1995; STOLLE et al. 2002).

5.4 Innerbetriebliche Kontrollsysteme

5.4.1 Voraussagende Mikrobiologie – Predictive Microbiology

Bei der Gewinnung und dem Herstellen von Lebensmitteln wurde schon immer auf die für die Qualität und Sicherheit wichtigen Faktoren geachtet. Mit Beginn der industriellen Gewinnung und Fertigung wurden wie oben erläutert entsprechende Sicherheitssysteme eingeführt (STOLLE 1995). Eine zunehmend wichtige Rolle spielt hierbei auch die voraussagende Mikrobiologie bzw. Predictive Microbiology. Sie leitet aus Laborversuchen mathematische Formeln ab, die das Verhalten der zu untersuchenden Keime in Lebensmitteln abhängig von verschiedenen einwirkenden Faktoren (inneren und äußeren) quantitativ beschreiben. Der Beginn des Einsatzes dieses Verfahrens reicht bis in die 60er Jahre zurück, eine zunehmende Beachtung der voraussagenden Mikrobiologie fand jedoch erst in den letzten 20 Jahren statt.

Die Modellerstellung erfolgt über mehrere Stufen. Zunächst werden Änderungen der Keimdichte über die Zeit und unter verschiedenen Bedingungen (a_w -Wert, pH-Wert) in Versuchen aufgezeichnet und danach in mathematische Formeln gefasst. Im nächsten Schritt, der als Modelling bezeichnet wird, werden Gleichungen aufgestellt, die den Einfluss der verschiedenen inneren und äußeren Faktoren (Control Factors) auf die Vermehrungsparameter charakterisieren. Aus diesen Formeln können nun Voraussagen abgeleitet werden, indem verschiedene Controlling Factors eingesetzt werden und so die Vermehrungsparameter berechnet werden. Da die erstellten For-

meln zumeist sehr unhandlich sind, gibt es zwischenzeitlich Anwendersoftware, die das Arbeiten mit der Predictive Microbiology wesentlich erleichtert. Neben Salmonellen, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* O157/H7 ist auch *Y. enterocolitica* Bestandteil der dadurch verfügbaren Wachstumsmodelle. Zuletzt erfolgt die Validierung der Modelle durch Vergleich mit Angaben aus der Literatur oder durch aus eigenen Untersuchungen gewonnenen Ergebnissen mit den Resultaten im Modell. Dass die voraussagende Mikrobiologie eine Vereinfachung der biologische Vorgänge ist, muss dem Anwender allerdings bekannt sein (Einfluss verschiedener Stämme, Säure mit der die pH-Wert-Einstellung erfolgte, kompetitiver Antagonismus etc.), aber trotz der dadurch gesetzten Grenzen stellt die Predictive Microbiology u.a. ein hilfreiches System bei der Einrichtung von HACCP-Konzepten dar (KLEER und HILDEBRANDT 2002).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

6 Material

6.1 Probenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Jahr 2001 über einen Zeitraum von 3 Monaten insgesamt acht Metzgereien im Raum München beprobt. Dabei erfolgte die Auswahl der Geschäfte zufällig, unabhängig von deren Größe, Lage oder anderen Kriterien. Es handelte sich um kleine bis mittelständische Betriebe (siehe **Tabelle 20** im Anhang).

Die Probenmenge umfasste zwischen 30 und 48 Einzelproben pro Betrieb, so dass insgesamt 298 Proben untersucht wurden. **Tabelle 9** (S. 48) bietet eine Übersicht über Probenzahlen und Entnahmeorte in den jeweiligen Metzgereien. Im Ganzen fielen 183 Proben auf die Untersuchung der Umgebung, 115 Proben stammten aus tierischem Untersuchungsmaterial, wie rohem Schweinefleisch und Schlachtnebenprodukten.

Tab. 9: Probenzahlen und Entnahmeorte der Umgebungsproben und des tierischen Probenmaterials in den einzelnen Betrieben

Betrieb	Probenzahl insgesamt	Entnahmeort			
		Umgebungsproben	tierisches Probenmaterial		
A	37	Zerlegung	15	Zerlegung	4
		Herstellung	4	Herstellung	1
		Kühlung	0	Kühlung	3
		Vorbereitung	1	Vorbereitung	0
		Verkauf	4	Verkauf	5
		24	13		
B	30	Kühlung	4	Kühlung	7
		Vorbereitung	11	Vorbereitung	0
		Verkauf	5	Verkauf	3
		20	10		
C	40	Anlieferung	3	Anlieferung	3
		Herstellung	13	Herstellung	2
		Kühlung	4	Kühlung	8
		Verkauf	4	Verkauf	1
		Gang	1	Gang	1
		25	15		
D	33	Herstellung	10	Herstellung	0
		Kühlung	3	Kühlung	7
		Verkauf	8	Verkauf	5
		21	12		
E	40	Herstellung	9	Herstellung	0
		Kühlung	6	Kühlung	13
		Verkauf	6	Verkauf	6
		21	19		
F	40	Herstellung	10	Herstellung	0
		Kühlung	7	Kühlung	10
		Verkauf	7	Verkauf	6
		24	16		
G	48	Herstellung	16	Herstellung	3
		Kühlung	3	Kühlung	11
		Verkauf	8	Verkauf	7
		27	21		
H	30	Zerlegung	11	Zerlegung	0
		Kühlung	4	Kühlung	5
		Verkauf	6	Verkauf	4
		21	9		
Summe	298		183		115

Wie aus **Tabelle 9** ersichtlich, wurden an den charakteristischsten Standorten Proben entnommen. Dabei konnte je nach Betrieb zwischen Anlieferung, Zerlegung, Herstellung, Kühlung, Vorbereitung und Verkauf unterschieden werden.

Die **Tabellen 10 bis 13** (S. 49-52) geben einen Überblick über die gesammelten Proben. Aus den Gegebenheiten vor Ort und den jeweiligen Möglichkeiten in den einzelnen Betrieben ergab sich ein vielfältiges Probenspektrum. Dies lag zum einen an dem zum Zeitpunkt der Probennahme zur Verfügung stehenden Material, zum anderen an der Kooperationsbereitschaft der beprobten Metzgereien.

Tab. 10: Beprobtes, ortsveränderliches Arbeitsmaterial

Betrieb \ Ortsverä. Arbeitsmaterial	A	B	C	D	E	F	G	H
Messer	4	2	4	3	2	2	3	3
Fleischhaken	1	3	0	1	1	2	3	1
Fleischwolf	0	1	1	2	1	4	1	1
Reinigungsbürste	0	1	2	1	0	1	1	1
Waage	1	2	0	1	2	1	1	0
Kettenhandschuhe	1	0	1	0	1	0	1	0
Abzieher	1	1	0	1	0	0	1	0
Arbeitsschürze	2	0	0	0	0	1	0	1
Knochensäge	1	1	0	0	0	0	1	0
Knochenbeil	0	0	0	1	0	0	1	1
Wurstschneidemaschine	0	1	1	0	0	0	0	0
Eislöffel	1	0	0	0	0	0	0	0
Verwurstungsmaschine	0	0	1	0	0	0	0	0
Kasse (Tastatur)	0	0	0	0	1	0	0	0
Wurstfüllmaschine	0	0	0	0	0	1	0	0
Fleischzerkleinerer	0	0	0	0	0	0	1	0
Kutter	0	0	0	0	1	0	0	0
Aufbewahrungs- und Transportgefäße	2	0	1	0	1	1	1	1
Summe	14	12	11	10	10	13	15	9

Aus **Tabelle 10** sind die ortsveränderlichen beprobten Gegenstände zu entnehmen. Wie ersichtlich, wurden in allen Betrieben Messer beprobt. Es folgten Wischtupferproben an Haken und an Fleischwölfen in je sieben Betrieben. In absteigender Rei-

henfolge schlossen sich Bürsten und Waagen (in sechs Betrieben), Kettenhandschuhe und Abzieher in je vier Betrieben, Schürzen, Sägen und Beile in je drei Metzgereien und die Wurstschneidemaschine in nur zwei Betrieben an. Bei den anderen beprobten Gegenständen handelte es sich jeweils um Einzelproben, die sich aus der Situation ergaben. Dazu gehörte ein Eislöffel, eine Verwurstungs- und eine Wurstfüllmaschine, eine Kasse, ein Fleischzerkleinerer, ein Kutter und diverse Aufbewahrungs- und Transportgefäße.

Tab. 11: Beprobtes, ortsunveränderliches Material

ortsunver. Arbeitsmaterial	Betrieb	A	B	C	D	E	F	G	H
Arbeitsfläche		5	2	3	3	3	3	5	4
Boden		4	4	6	3	2	3	3	3
Türgriffe		1	1	1	5	4	5	3	4
Wand		0	1	0	0	0	0	1	0
Schwenktüren		0	0	2	0	1	0	0	0
Wasserhahn		0	0	1	0	1	0	0	0
Spülbecken		0	0	1	0	0	0	0	0
Seifenspender		0	0	0	0	0	0	0	1
Summe		10	8	14	11	11	11	12	12

Tabelle 11 gibt die ortsunveränderlichen Materialien wider. Dabei handelt es sich um fest verankerte Gegenstände und Oberflächen. In allen acht Betrieben wurden dabei Arbeitsflächen, Böden und Türgriffe beprobt. In zwei Betrieben wurden Wischtupferproben an Wänden, Schwenktüren und Wasserhähnen genommen. Ein Spülbecken und ein Seifenspender wurden in je einem Betrieb beprobt.

Tab. 12: Beprobte Innereien pro Betrieb

Betrieb	A	B	C	D	E	F	G	H
Innereien								
Leber	2	0	2	2	2	0	1	0
Zunge	1	0	0	0	0	0	2	2
Niere	1	0	0	0	1	0	1	0
Herz	1	0	0	0	0	0	1	0
Hirn	1	0	0	0	0	0	0	0
Summe	6	0	2	2	3	0	5	2

Wie **Tabelle 12** zeigt, wurden in sechs der acht Metzgereien (Betrieb Nr. **A, C, D, E, G, H**) Schlachtnebenprodukte beprobt. Am häufigsten war dabei das Schlachtnebenprodukt Leber vertreten. In fünf Betrieben wurde es insgesamt neun Mal beprobt. Nacheinander folgten Zunge (fünf in drei Betrieben), Niere (drei in drei Betrieben), Herz (zwei in zwei Betrieben) und Hirn (ein Mal).

Tab. 13: Tierisches Probenmaterial

Betrieb	A	B	C	D	E	F	G	H
tier. Material								
Füße, z.T mit Schlegel	1	1	0	2	2	1	1	1
Speck	0	1	3	1	1	3	1	2
Keule	1	2	1	2	1	0	2	0
Kotelett	0	1	1	2	2	1	3	0
Filet	0	1	0	0	1	1	1	1
Köpfe	1	0	2	1	1	1	0	0
Bauch	0	1	1	0	1	0	0	1
Fleisch zur Weiter- verarbeitung	0	0	1	1	0	2	2	0
Schweinhälfte	2	0	0	0	1	3	0	0
Bauchspeck	0	0	1	1	0	0	1	0
Schulter	0	0	0	0	1	0	3	1
Ferkel	2	0	0	0	1	0	0	0
Schnitzel	0	1	0	0	0	0	0	1
Fleischsud	0	1	0	0	1	0	0	0
Schwarte	0	1	1	0	0	0	0	0
Hals	0	0	0	0	1	2	0	0
Hackfleisch	0	0	0	0	1	0	1	0
Brät	0	0	0	0	1	1	0	0
Fleischzubereitung	0	0	1	0	0	0	0	0
Leberkäsebrät	0	0	1	0	0	0	0	0
Schwanz	0	0	0	0	0	1	0	0
Konfiskat	0	0	0	0	0	0	1	0
Summe	7	10	13	10	16	16	16	7

Tabelle 13 zeigt eine Auflistung des tierischen Probenmaterials. Das Probenspektrum war je nach Vorliegen der Ware in den Metzgereien vielfältig bzw. reglementiert. Füße und Speck konnten in sieben der acht Metzgereien beprobt werden. In sechs Betrieben wurden Keulen, Koteletts, Filets und Köpfe vorgefunden. Alle anderen beprobten Materialien tierischen Ursprungs sind aus oben stehender Tabelle ersichtlich.

Die Aufbereitung und mikrobiologische Untersuchung der Proben fand in einem akkreditierten Prüflabor statt. Noch am Tag der Probennahme wurde ein Direktausstrich

auf CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin)-Agar durchgeführt, die Tupfer selbst wurden bei -18°C für ca. 3 Monate tiefgefroren, während der CIN-Agar sofort bebrütet wurde (s.u.).

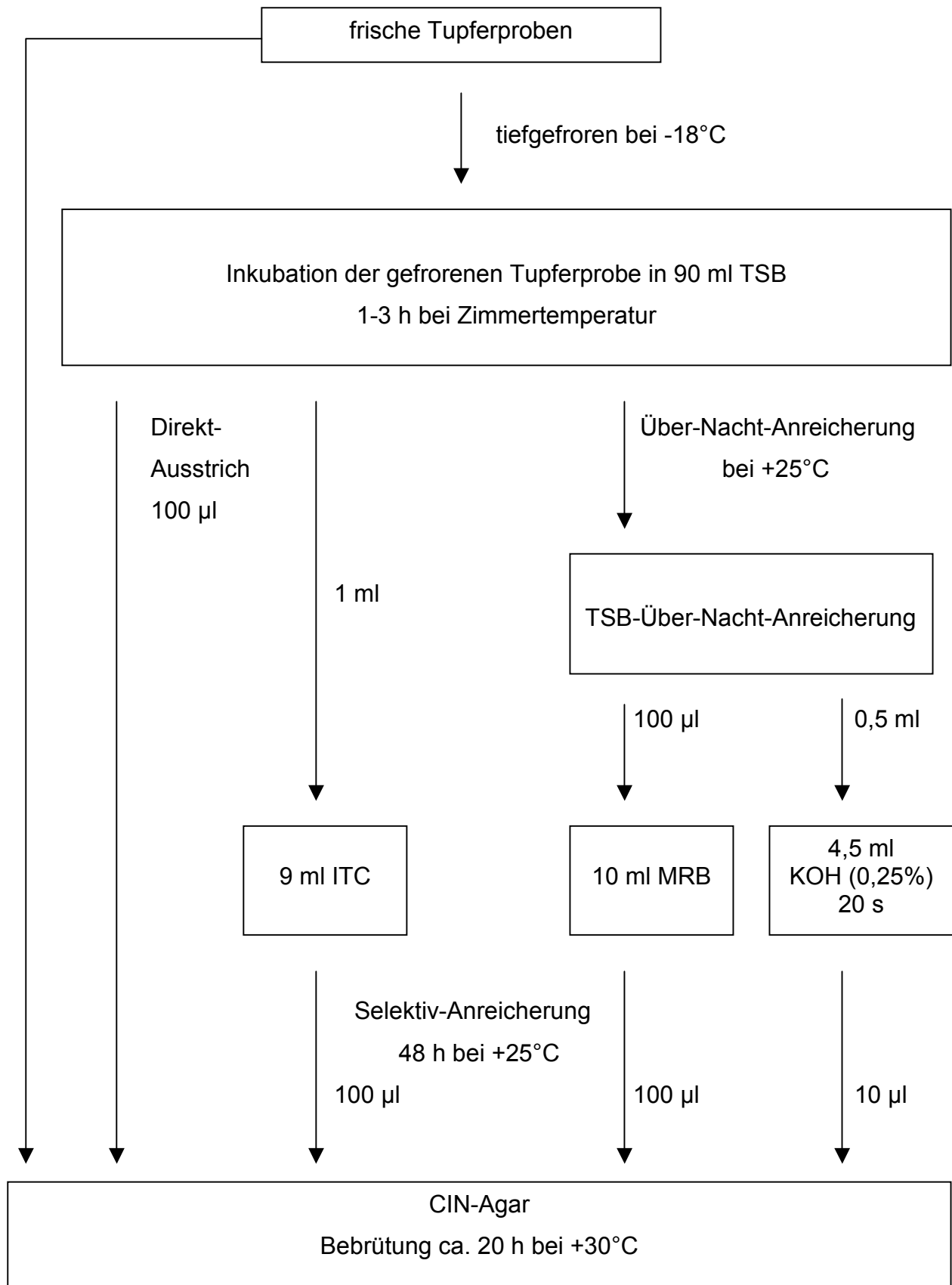
6.2 Arbeitsmaterial

Alle für diese Arbeit verwendeten Materialien sind im Anhang aufgelistet.

7 Methodik

Die Probennahme erfolgte mittels steriler Handschuhe und mit Leitungswasser angefeuchteter 5 x 5 cm großer steriler Tupfer, die anschließend mit Trypton-Soja-Bouillon (TSB) getränkt wurden und in den Probennahmehandschuh verpackt wurden. Bei jeder Probennahme wurde versucht, eine möglichst große Fläche zu beproben. In jedem Betrieb wurde auch eine Negativkontrolle - dabei handelte es sich um einen ausschließlich mit Leitungswasser getränkten Tupfer - genommen, die dasselbe Programm wie die anderen Proben durchlief. Im Anschluss an die Probennahme wurde das Material in einer handelsüblichen Kühlbox mit Kühlaggregaten zum Labor transportiert. Die Transportdauer betrug maximal eine Stunde, so dass eine ununterbrochene Kühlung gewährleistet werden konnte.

Eine Zusammenfassung der Isolierung von *Y. enterocolitica* zeigt **Abbildung 2** (S. 55). Die Nachweismethode basiert auf einer Kombination aus dem bereits erwähnten Internationalen Standard ISO 10273 und der Methode des NCFA (Nordic Committee On Food Analysis).

Abb. 2: Isolierung von *Y. enterocolitica*

7.1 Isolierung von *Y. enterocolitica*

Tag der Probennahme:

Noch am Tag der Probennahme wurden die Tupfer steril aus dem Probenhandschuh entnommen und ein Direktaustrich auf CIN-Agar durchgeführt. Die Bebrütung erfolgte bei +30 °C für ca. 20 Stunden, die Tupfer selbst wurden nach Verbringen in einen neuen sterilen Handschuh bei -18°C für ca. drei Monate tiefgefroren.

Die Beurteilung der auf CIN-Agar gewachsenen Kolonien erfolgte anhand der Farbe und Größe. Typische Kolonien (klein, dunkelrot mit schmalem hellen Hof, sogenannte „bulleyes“) wurden auf unspezifischen Trypton-Soja-Agar (TSA)-Platten ausgestrichen und konnten so kurzzeitig im Kühlschrank bei +4°C gelagert werden und zu einem späteren Zeitpunkt weiter differenziert werden.

1. Tag:

Die noch tiefgefrorenen Tupferproben wurden steril aus dem Handschuh entnommen und in jeweils 90 ml TSB gegeben, abgedeckt und 1-3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde mit 100 µl der Suspension ein Drei-Ösenausstrich auf einer CIN-Platte durchgeführt, die bei +30°C für ca. 20 Stunden bebrütet wurde.

Des Weiteren wurde 1 ml der inkubierten TSB in 9 ml des ITC-Anreicherungsmediums pipettiert und für 48 Stunden bei +25°C bebrütet. Die Tupferproben in der TSB wurden zur Anreicherung über Nacht bei +25°C bebrütet.

2. Tag:

Mit der über Nacht bebrüteten TSB wurde ein zweites Anreicherungsmedium beimpft: 100 µl der TSB wurden in 10 ml MRB-Anreicherungsmedium pipettiert. Die Bebrütung erfolgte für 48 Stunden bei +25°C.

Zudem wurden 0,5 ml der TSB in 4,5 ml einer 0,25%igen KOH-Lösung gegeben, durchmischt und nach 20 Sekunden eine Öse der Proben-KOH-Lösung auf eine halbe CIN-Platte ausgestrichen. Bebrütet wurden die Platten bei +30°C für ca. 20 Stunden.

Die Auswertung der CIN-Platte vom vorigen Tag erfolgte durch die Beurteilung von Koloniegröße und -farbe. Wurden typische Kolonien gefunden (s.o.), erfolgte ein Ausstrich auf TSA-Platten.

3. Tag:

Die Auswertung der KOH-CIN-Platte erfolgte wieder aufgrund der Beurteilung von Koloniegröße und -farbe. Die typischen Kolonien wurden auf TSA-Platten ausgestrichen.

Die für zwei Tage bebrütete ITC-Bouillon wurde nochmals durchmischt, 100 µl wurden auf eine CIN-Platte pipettiert, mittels Drei-Ösenaustrich ausgestrichen und bei +30°C für ca. 20 Stunden bebrütet.

4. Tag:

Es erfolgte die Auswertung der am Vortag beimpften ITC-CIN-Platten. Mit den typischen Kolonien wurde wie bereits oben angeführt vorgegangen.

Die für zwei Tage bebrütete MRB wurde nochmals durchmischt und 100 µl auf einer CIN-Platte ausgestrichen. Diese wurde bei +30°C für ca. 20 Stunden bebrütet.

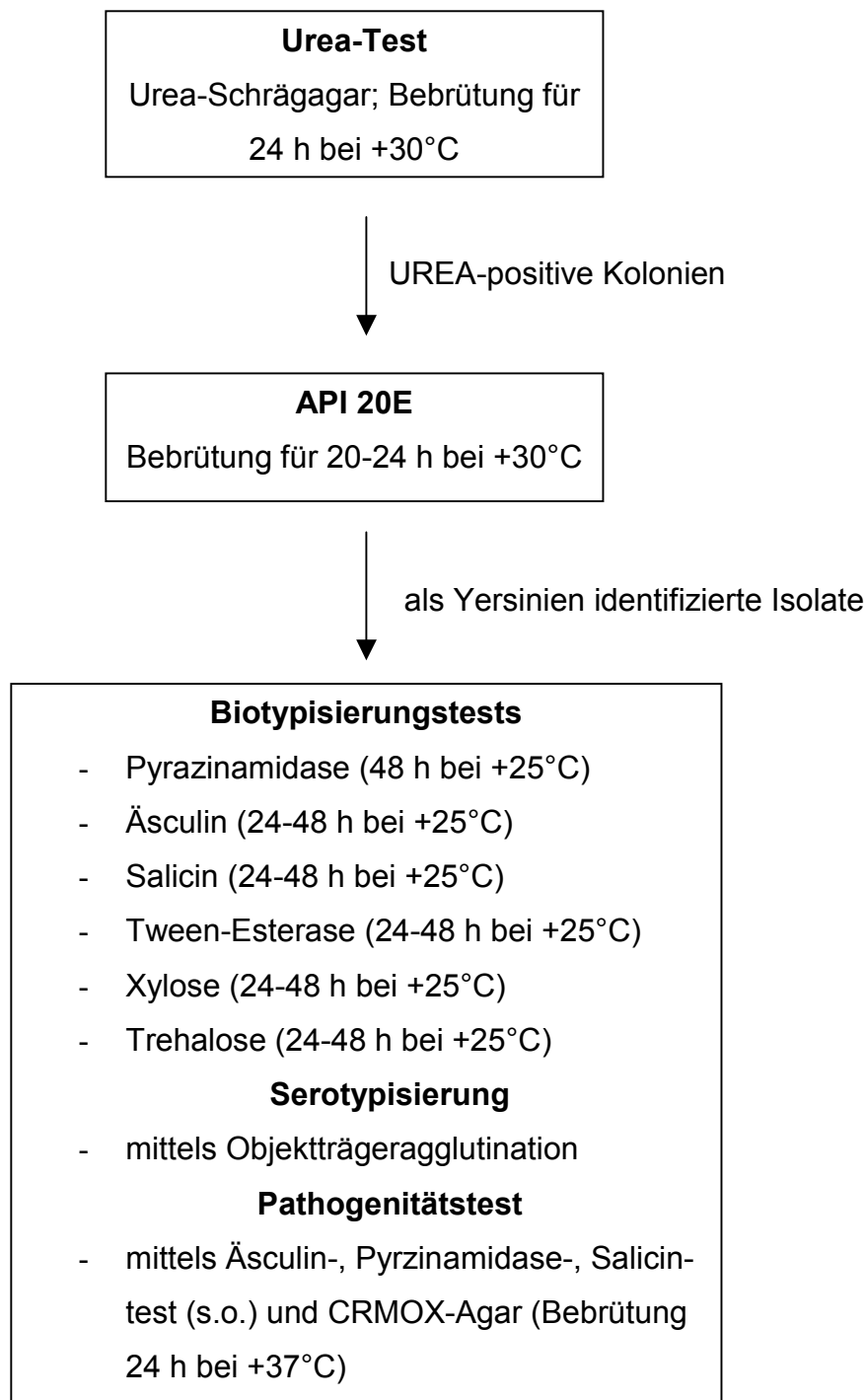
5. Tag:

Die Auswertung und das weitere Vorgehen bei den MRB-CIN-Platten erfolgte nach den bereits oben erwähnten Kriterien.

7.2 Identifizierung von *Y. enterocolitica*

Die Identifizierung von *Y. enterocolitica* erfolgte nach dem in **Abbildung 3** dargestellten Schema.

Abb. 3: Identifizierung von *Y. enterocolitica*



7.2.1 Urea-Test

Yersinien gehören zu den ureasepositiven Bakterien. Sie katalysieren die Hydrolyse von Harnstoff. Hierbei entsteht Ammoniumcarbonat, welches in Ammoniak und Kohlendioxid zerfällt. Dadurch kommt es zu einer alkalischen Reaktion, die durch Farbumschlag des dem Agar zugesetzten pH-Indikators nachgewiesen werden kann.

Ein Harnstoff-Schrägagar wurde für diesen Versuch mit einer von der TSA-Platte abgenommenen typischen Kolonie beimpft und bei +30°C für 24 Stunden bebrütet. Bei einer positiven Reaktion kommt es durch die bereits oben erwähnte Alkalisierung des Mediums zu einem Farbumschlag nach rosa. Bei positiver Reaktion erfolgte die weitere Identifizierung über den API 20E-Test.

7.2.2 API 20E

Das Testsystem API 20E (bioMérieux SA) ist ein System zur Identifizierung von *Enterobacteriaceae*. Der Test besteht aus 20 Mikroröhrchen, die dehydrierte Substrate enthalten. Beim Beimpfen mit der zu untersuchenden Bakteriensuspension werden die Substrate gelöst. Zum Teil geschieht die anschließende Bebrütung aerob, zum Teil unter Luftabschluss. Die während der Inkubation entstehenden Stoffwechselprodukte bewirken entweder einen direkten oder einen indirekten Farbumschlag nach Zugabe entsprechender Reagentien. Die Auswertung der Reaktionen erfolgt anhand einer vorgegebenen Tabelle (**Tabelle 14**, S. 60), die Identifizierung der Isolate mit Hilfe entsprechender Software.

Für den API 20E wurden ca. 3-5 typische Einzelkolonien von einer TSA-Platte gewonnen und in 5 ml sterilem Wasser vollständig gelöst. Anschließend wurden die Mikroröhrchen mit der entstandenen Suspension nach Vorgabe der Anleitung befüllt und zum Teil mit Paraffin luftdicht verschlossen. Die Bebrütung erfolgte bei +30°C für 20-24 Stunden. Die Reaktionen wurden entsprechend **Tabelle 14** (S. 60) ausgewertet.

Tab. 14: Ablesetabelle des API 20E

Test	Reaktion	Ergebnis		
		negativ	positiv	Y. e.
ONPG	β -Galactosidase	farblos	gelb	gelb
ADH	Arginindehydrolase	gelb	rot/orange	gelb
LDC	Lysindecaboxylase	gelb	orange	gelb
ODC	Ornithindecaboxylase	gelb	rot/orange	orange
CIT	Citratabbau	blaßgrün/gelb	blau/blaugrün	blaßgrün/blau
H ₂ S	H ₂ S-Produktion	farblos	Niederschlag	farblos
URE	Urease	gelb	rot/orange	rot/orange
TDA	Tryptophandesaminase	gelb	dunkelbraun	gelb
IND	Indolproduktion	gelb	rosa	gelb/rosa
VP	Acetoinproduktion	farblos	rosa	rosa
GEL	Gelatinase	keine Diffusion	Diffusion	keine Diffusion
GLU	Glucose	blau/blaugrün	gelb	gelb
MAN	Mannit	blau/blaugrün	gelb	gelb
INO	Inosit	blau/blaugrün	gelb	blau
SOR	Sorbit	blau/blaugrün	gelb	gelb
RHA	Rhamnose	blau/blaugrün	gelb	blau
SAC	Saccharose	blau/blaugrün	gelb	gelb
MEL	Melibiose	blau/blaugrün	gelb	blau
AMY	Amygdalin	blau/blaugrün	gelb	gelb/blau
ARA	Arabinose	blau/blaugrün	gelb	gelb/blau
NO ₃ -NO ₂	NO ₂ -Produktion	gelb	rot	rot

Y.e.: *Yersinia enterocolitica*

7.3 Lagerung der identifizierten *Yersinia*-Kulturen

Nach der Identifizierung der *Yersinia*-Stämme wurden diese bis zum weiteren Gebrauch in der Mikrobank gelagert. Dazu wurden Kolonien dieser Stämme auf TSA-Platten ausgestrichen und über Nacht bei +30°C bebrütet. Am folgenden Tag wurde das gesamte gewachsene Material unter der Sicherheitsbank in das vorgesehene Mikrobank-Röhrchen verbracht. Nach ca. 30 Minuten Wartezeit wurde die enthaltene Flüssigkeit entfernt und die an den Keramikügelchen fixierten *Y. enterocolitica*-Stämme eingefroren. Für spätere Untersuchungen wurde ein Keramikügelchen unter sterilen Bedingungen aus der Mikrobank entnommen, auf einer unspezifischen TSA-Platte ausgestrichen und für 24 Stunden bei +30°C bebrütet.

7.4 Weitere Untersuchungen

Die als Yersinien identifizierte Isolate wurden bio- und serotypisiert und auf plasmid- und chromosomal-kodierte Pathogenitätsfaktoren getestet.

7.4.1 Biotypisierung

Im Rahmen der Biotypisierung wurden die Tests auf Pyrazinamidase, Äsculin- und Tween-Esterase-Spaltung durchgeführt und die Fermentation von Salicin, Xylose und Trehalose beurteilt. Die weiteren Tests, die in **Tabelle 15** aufgeführt sind (Indol-Bildung und NO₃-Reduktion), wurden bereits bei der Durchführung des API 20E untersucht. Aus der Kombination der Ergebnisse der verschiedenen Tests wurde der Biotyp ermittelt.

Tab. 15: Biotypisierungstests für *Y. enterocolitica*

Test	Biotyp					
	1A	1B	2	3	4	5
Pyrazinamidase	+	-	-	-	-	-
Äsculin	+	-	-	-	-	-
Salicin	+	-	-	-	-	-
Tween-Esterase	+	+	-	-	-	-
Indol	+	+	+	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+	-
NO ₃ -Reduktion	+	+	+	+	+	+

Pyrazinamidase

Für diesen Test wurde ein Pyrazinamid-haltiger Schrägagar in Reagenzröhrchen hergestellt. Mit Hilfe einer Öse wurden frische Kulturen auf dem Agar ausgebracht und für 48 Stunden bei +25°C bebrütet. Nach Zugabe von einprozentigem Ammoniumferrosulfat bis zum oberen Rand des Agars wurde nach 10 min der Pyrazinamid-Abbau beurteilt. Eine rosa-braune Farbe zeigt eine positive Reaktion an.

Äsculin-Spaltung

Mit einigen Kolonien wurde auf einem Viertel eines Äsculin-Agars ein einfacher Öse-nausstrich durchgeführt. Nach einer Bebrütungsdauer von 24-48 Stunden bei +25°C wurde die Äsculin-Spaltung beurteilt. Färbt sich die Umgebung um den Ausstrich dunkel, so ist das Ergebnis positiv.

Tween-Esterase-Agar

Auf einem Tween-Esterase-Agar wurden mit Hilfe einer Öse einige Kolonien als gerade Linie ausgestrichen und für 24-48 Stunden bei +25°C bebrütet. Bei der Bildung einer milchig-trüben Zone um den Ausstrich handelt es sich um eine positive Reaktion.

Fermentation von Salicin, Xylose und Trehalose

Für diese Tests wurde jeweils eine Öse mit der zu untersuchenden Bakterienkultur in ein Reagenzglas mit Salicin-, Xylose- bzw. Trehalose-haltigem Nährmedium verbracht. Die Bebrütung erfolgte jeweils für 24-48 Stunden bei +25°C. Durch eine Gelbfärbung wurde eine positive Reaktion angezeigt.

7.4.2 Serotypisierung

Die Serotypisierung von *Y. enterocolitica* O:3 wurde mittels kommerziell erhältlicher Testsets (SIFIN) durchgeführt. Hierzu wurde eine Bakterienkolonie unter Zuhilfenahme einer Öse mit einem Tropfen monospezifischen Testserums vermischt und vorsichtig geschwenkt. Im Falle eines positiven Nachweises von *Y. enterocolitica* vom Serotyp O:3 kam es zu einer Agglutination, die durch eine deutliche Trübung erkennbar war.

7.4.3 Pathogenitätsnachweis

Zum Nachweis der chromosomal-kodierten, pathogenen Eigenschaften wurden die Testergebnisse des Pyrazinamidase-Nachweises, der Äsculin-Spaltung und der Salicinfermentation herangezogen. Konnten weder Pyrazinamid abgebaut, Äsculin gespalten, noch Salicin fermentiert werden, so waren pathogenitätsbestimmende chromosomale Faktoren vorhanden.

Mittels der Calciumabhängigkeit bei +37°C und der Adsorption von Kongorot konnte der indirekte Nachweis der plasmid-kodierten Eigenschaften erfolgen. Für diesen Test wurde eine Kolonie auf einem entsprechenden CRMOX-Agar (Kongorot-Magnesium-Oxalat-Agar) ausgestrichen und im Anschluss für 24 Stunden bei +37°C bebrütet. Sehr kleine Kolonien von dunkeloranjer Farbe entsprachen einer positiven Reaktion, wogegen große und helle Kolonien auf eine negative Reaktion hinweisen.

ERGEBNISSE

8 Vorkommen von *Y. enterocolitica* in den untersuchten Betrieben

8.1 Nachweis von Yersinien in der Gesamtheit der Proben

Mit der oben beschriebenen Versuchsanordnung konnten aus den insgesamt 298 genommenen Proben in 23 Fällen Yersinien, hiervon 16 Mal (5,4%) pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 isoliert und identifiziert werden. In **Tabelle 16** (S. 65) sind die Ergebnisse zusammengefasst, aufgegliedert nach Betrieb, Ort und Material der Probenahme. Bei der Unterteilung des Probenmaterials in produktspezifisches Untersuchungsmaterial und Umgebungsproben sind folgende Ergebnisse zu erhalten: Aus insgesamt 115 Proben tierischen Materials konnten vierzehn Mal pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 nachgewiesen werden. Dies entspricht einem prozentualen Wert von 12,2%. Bei den 183 Umgebungsproben wurden in zwei Fällen pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 nachgewiesen, was einem Prozentsatz von 1,1% gleichzusetzen ist.

Tab. 16: Ergebnisse der Probennahme

Betrieb/Probe	Entnahmeort	Material	Ergebnis
A/1	Kühlung	Ferkel	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
A/2	Kühlung	Schweinhälfte	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
A/3	Verkauf	Hirn	<i>Y. enterocolitica</i> 1A
B/1	Vorbereitung	Fleischhaken	<i>Y. kristensenii</i>
B/2	Kühlung	Schweineschwarte	<i>Y. kristensenii</i>
B/3	Verkauf	Filet	<i>Y. kristensenii</i>
C/1	Anlieferung	Boden	<i>Y. intermedia</i>
C/2	Kühlung	Bauchspeck	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
C/3	Herstellung	Arbeitsfläche	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
C/4	Herstellung	Kettenhandschuhe	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
C/5	Verkauf	Messer	<i>Y. rohdei</i>
D/1	Kühlung	Keule	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
D/2	Kühlung	Leber	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
D/3	Verkauf	Leber	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
E/1	Kühlung	Füße mit Schlegel	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
E/2	Kühlung	Füße mit Schlegel	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
E/3	Kühlung	Ferkel	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
E/4	Kühlung	Schwein	<i>Y. frederiksenii</i>
F/1	Kühlung	Schweinehälfte	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
F/2	Kühlung	Fleisch, roh	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
G/1	Verkauf	Leber	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
G/2	Verkauf	Niere	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3
G/3	Verkauf	Zunge	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3

In sechs der acht Metzgereien (Betrieb **A**, **C**, **D**, **E**, **F**, **G**) konnten pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 nachgewiesen werden. *Y. enterocolitica*-positive Proben wurden zwei Mal im Betrieb **A** gefunden. Dabei handelte es sich in beiden Fällen um tierisches Probenmaterial (Ferkel, Schweinhälfte), welches in der Kühlung beprobt wur-

de. In Metzgerei **C** wurden drei Mal pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 isoliert. Eine Probe stammte von im Kühlraum entnommenem tierischem Material (Bauchspeck), bei zwei Proben handelte es sich um Umgebungsproben (Kettenhandschuhe und Arbeitsplatte) aus der Herstellung. Betrieb **D** lieferte drei der positiven Proben. Sie stammten jeweils von Schlachtprodukten vom Schwein. Bei zwei handelte es sich um Schlachtnebenprodukte (Leber), einmal aus einem Kühlraum, einmal aus dem Verkauf, bei der dritten Probe um eine Keule, die in einem Kühlraum gelagert wurde. In Metzgerei **E** wurden ebenfalls drei Mal pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 nachgewiesen. Bei dem beprobten Material handelte es sich jeweils um Produkte vom Tier, nämlich zwei Mal um Füße mit Schlegel und einmal um ein Ferkel. Im Betrieb **F** wurden positive Tupferproben von einer Schweinehälfte und von rohen Fleischstücken gewonnen. In Betrieb **G** stammten die drei positiven Proben von Schlachtnebenprodukten. Jeweils ein Mal konnte der Erreger in Leber, Niere und Zunge nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde im Betrieb **A** ein apathogener *Y. enterocolitica*-Stamm aus dem Probenmaterial Hirn nachgewiesen. In Betrieb **B** wurde *Y. kristensenii* zwei Mal aus den tierischen Probenmaterialien Schweineschwarte und Filet und ein Mal aus Tupferproben von Fleischhaken gewonnen. In Betrieb **C** wurden je ein Mal *Y. rohdei* (Messer) und *Y. intermedia* (Bodenprobe) und in Betrieb **E** ein Mal *Y. frederiksenii* (Oberfläche Schwein) isoliert.

8.2 Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 in gekühlten und ungekühlten Räumen

Von den 298 Gesamtproben wurden insgesamt 95 Proben aus gekühlten Räumen entnommen. Zehn Mal (10,5%) konnten dabei pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 nachgewiesen werden. Die restlichen 203 Proben aus ungekühlten Räumlichkeiten erbrachten sechs Mal (3,0%) ein positives Resultat für pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3.

Für die insgesamt gefundenen pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 ergibt sich damit folgendes Ergebnis: Zehn von sechzehn pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 wurden in Kühlräumen gefunden (62,5%), sechs der positiven Ergebnisse stammten aus ungekühlten Räumen (37,5%).

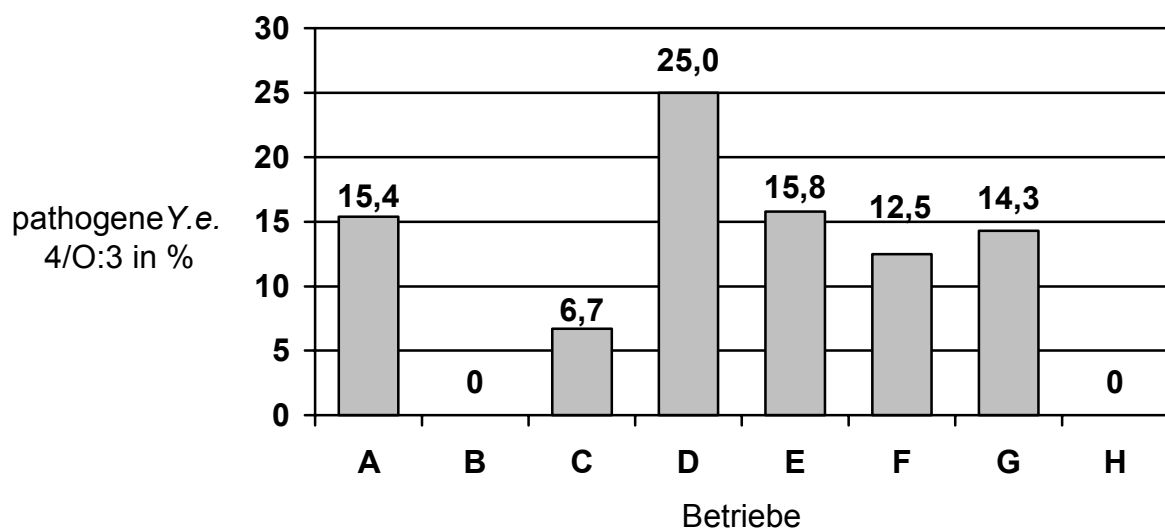
8.3 Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 in den Einzelbetrieben

Bezogen auf die Anzahl der Proben wurden im Betrieb **D** am häufigsten pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 nachgewiesen. In dieser Metzgerei wurden insgesamt 33 Proben genommenen, wovon drei einen positiven Nachweis erbrachten (9,1%). Mit 7,5% Nachweishäufigkeit folgten Betrieb **C** und **E**. Von den in beiden Betrieben genommenen jeweils 40 Proben erwiesen sich jeweils drei als *Y. enterocolitica* 4/O:3-positiv. Betrieb **G** schließt sich mit 6,3% an. Dieser Wert ergibt sich aus den 48 Proben, von denen drei *Y. enterocolitica* 4/O:3-positiv waren. Danach reihen sich die Metzgereien **A** mit 5,4% (von insgesamt 37 Proben enthielten zwei pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3) und **F** mit 5,0% (40 Proben, davon 2 positiv) ein. In Betrieb **B** und **H** konnten keine pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 nachgewiesen werden.

8.4 Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 in tierischem Probenmaterial

Abbildung 4 gibt die prozentuale Nachweishäufigkeit von pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 aus tierischem Probenmaterial wider.

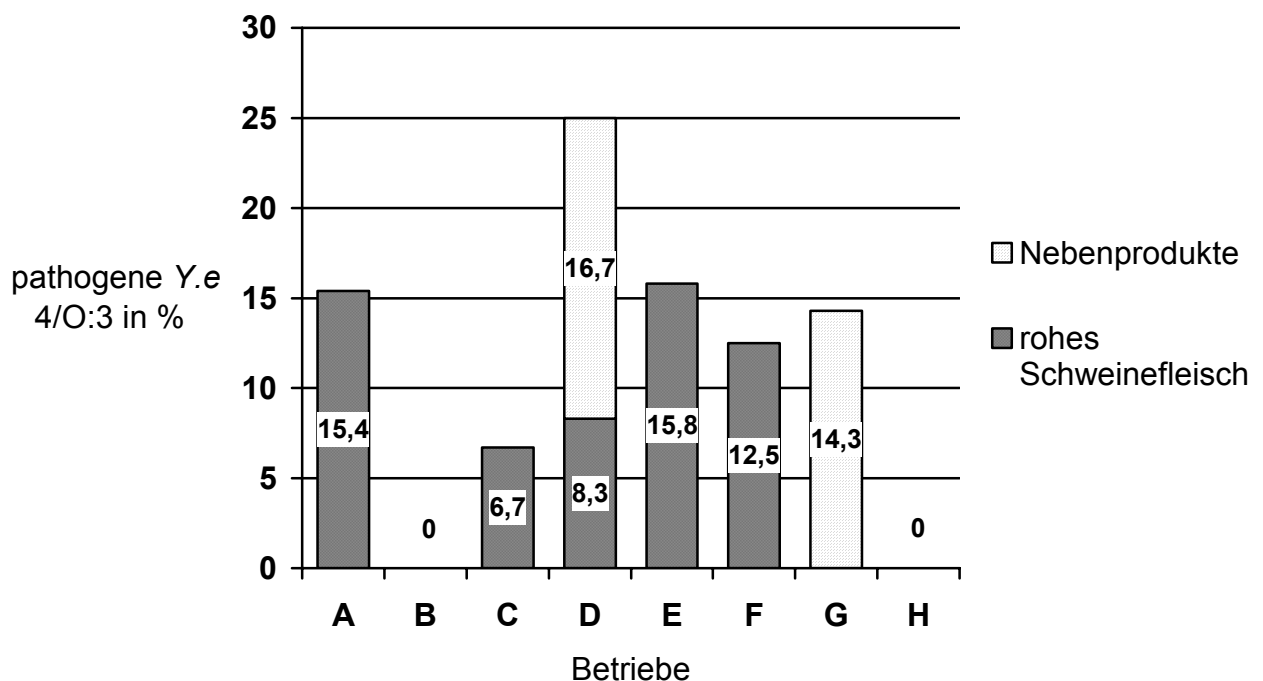
Abb. 4: Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* 4/O:3 aus tierischem Probenmaterial



Der häufigste Nachweis aus tierischem Probenmaterial erfolgte in Metzgerei **D** mit 25,0%. Von den aus diesem Betrieb stammenden zwölf Proben tierischer Herkunft, erwiesen sich drei als *Y. enterocolitica* 4/O:3-positiv. Von den im Betrieb **E** genommenen 19 Proben vom Tier erbrachten drei einen positiven Nachweis für pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3, was 15,8% entspricht. Mit 15,4% positiver Ergebnisse aus tierischem Probenmaterial lag Betrieb **A** ebenfalls in diesem Bereich. Bei den dreizehn vom Tier stammenden Proben wurden zwei *Y. enterocolitica* 4/O:3-positiv getestet. In absteigender Reihenfolge reihten sich die Betriebe **G** (14,3%; drei von 21 Proben positiv), **F** (12,5%; zwei von 16 Proben positiv) und **C** (6,7%; eine von fünfzehn Proben positiv) ein.

8.5 Vergleich des Nachweises von pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 in rohem Fleisch und Schlachtnebenprodukten

Abb. 5: Nachweishäufigkeit von pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 aus rohem Schweinefleisch und Schlachtnebenprodukten



Bei den insgesamt 115 Proben vom Tier handelte es sich in 95 Fällen um Schweinefleisch und in 20 um Schlachtnebenprodukte. Von den 95 rohen Schweinefleischproben erwiesen sich neun (9,5%), von den 20 rohen Schlachtnebenprodukten fünf Stück (25,0%), bezogen auf das entsprechende Probenmaterial, positiv bezüglich

des Nachweises pathogener *Y. enterocolitica* 4/O:3. Bei den positiven Schlachtnebenprodukten handelte es sich um Zunge, Niere und Leber.

In Betrieb **A**, **C**, **E** und **F** wurden pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 ausschließlich aus Fleisch, nicht jedoch von Innereien nachgewiesen, während in Betrieb **D** sowohl aus Schweinefleisch und Schlachtnebenprodukten und in Betrieb **G** der gesuchte Erreger nur aus Schlachtnebenprodukten isoliert werden konnte. In Betrieb **A** erwiesen sich zwei der insgesamt 13 Proben vom Tier als *Y. enterocolitica* 4/O:3-positiv. Sechs beprobte Innereien waren negativ bezüglich pathogener *Y. enterocolitica* 4/O:3. Bei Betrieb **C** wurden insgesamt fünfzehn Proben vom Schwein untersucht. Die untersuchten Innereien erbrachten ein negatives Ergebnis, während aus dem untersuchten Fleisch ein Mal pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 nachgewiesen werden konnten. Betrieb **D** erbrachte sowohl positive Resultate beim untersuchten Fleisch als auch bei den untersuchten Schlachtnebenprodukten. Von den insgesamt zwölf Proben vom Tier erwiesen sich eine Fleischprobe und zwei Innereien als positiv. In Metzgerei **E** waren drei der untersuchten 19 Proben vom Schwein positiv. Der Erreger konnte nur aus rohem Schweinefleisch nachgewiesen werden. Bei keiner der positiven Proben handelte es sich um Schlachtnebenprodukte. Ebenso verhielt es sich bei Betrieb **F**. Von den untersuchten 16 Proben vom Tier konnte der positive Nachweis nur aus zwei Fleischproben erbracht werden. Bei Betrieb **G** erbrachten dagegen aus insgesamt 21 Proben vom Schwein drei Mal Innereien ein positives Ergebnis, während das untersuchte Schweinefleisch negativ war.

8.6 Nachweis von *Y. enterocolitica* 4/O:3 in den Umgebungsproben

Insgesamt wurden im Untersuchungszeitraum 183 Umgebungsproben aus der gesamten Produktionslinie gesammelt und untersucht. Lediglich zwei der *Y. enterocolitica* 4/O:3-positiven Ergebnisse aller Proben stammten aus den Umgebungsproben (1,1%). Dieser positive Nachweis wurde nur im Betrieb **C** ermittelt.

In diesem Betrieb wurden 25 Umgebungsproben genommen, wovon zwei (von einer Arbeitsfläche bzw. von Kettenhandschuhen) ein positives Ergebnis erbrachten.

8.7 Ergebnis der Negativkontrollen

In keiner der Negativkontrollen konnten im Verlauf der verschiedenen Untersuchungsschritte Yersinien nachgewiesen werden.

9 Ergebnisse der verwendeten Testverfahren

9.1 Ergebnisse der verschiedenen Isolierungsverfahren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Isolierungsmethoden für *Y. enterocolitica* angewandt. **Tabelle 17** und **Abbildung 6** (S. 72) zeigen die mit Hilfe der verschiedenen Kultivierungsmedien erzielten Nachweisraten.

Tab. 17: Ergebnisse der verschiedenen Nachweisverfahren für gefundene pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3

Betrieb/Probe	Nachweisverfahren				
	D 1	D 2	KOH	ITC	MRB
Betrieb A, Probe 1	+	-	-	-	-
Betrieb A, Probe 2	+	+	-	+	-
Betrieb C, Probe 1	-	-	-	-	+
Betrieb C, Probe 2	+	+	-	+	-
Betrieb C, Probe 3	+	-	-	-	-
Betrieb D, Probe 1	-	-	-	-	+
Betrieb D, Probe 2	-	-	-	+	-
Betrieb D, Probe 3	-	-	-	+	-
Betrieb E, Probe 1	+	-	-	-	-
Betrieb E, Probe 2	+	-	-	+	+
Betrieb E, Probe 3	-	-	-	-	+
Betrieb F, Probe 1	+	-	-	-	-
Betrieb F, Probe 2	+	-	-	+	-
Betrieb G, Probe 1	+	-	-	-	-
Betrieb G, Probe 2	+	-	-	-	-
Betrieb G, Probe 3	+	-	-	-	-
Summe	11 x pos.	2 x pos.	0 x pos.	6 x pos.	4 x pos.

D 1: Direktausstrich

D 2: Ausstrich nach Inkubation der gefrorenen Probe bei Zimmertemperatur

KOH: Vorbehandlung der aufgetauten Probe mit 25%iger Kalilauge nach Über-Nacht-Anreicherung

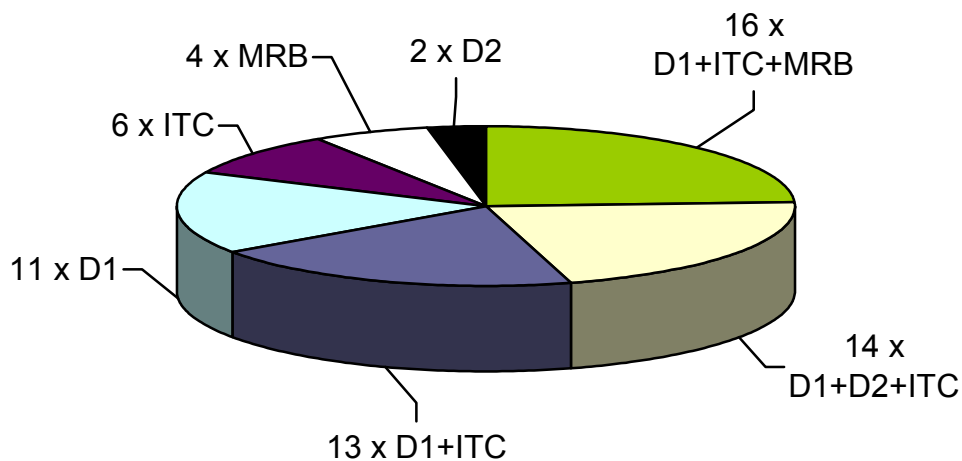
ITC: selektive Anreicherung in Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Bouillon

MRB: selektive Anreicherung in Modifizierter Rappaport-Bouillon

Wie aus **Tabelle 17** deutlich wird, konnte der überwiegende Teil der pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 (11 Stück) bereits durch den Direktausstrich (D1) nachgewie-

sen werden. Ihm folgte die selektive Anreicherung in ITC (sechsmaliger Nachweis), die selektive Anreicherung in MRB (viermaliger Nachweis) und dann der Ausstrich nach Inkubation der tiefgefrorenen Probe in TSB (zweimaliger Nachweis). Durch die Vorbehandlung der Über-Nacht-Anreicherung mit KOH konnten in dieser Arbeit keine pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 nachgewiesen werden.

Abb. 6: Nachweisrate von pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 in Abhängigkeit von der Nachweismethode und deren Kombination



- D 1: Direktausstrich
- D 2: Ausstrich nach Inkubation der gefrorenen Probe bei Zimmertemperatur
- KOH: Vorbehandlung von der aufgetauten Probe mit 25%iger Kalilauge nach Über-Nacht-Anreicherung
- ITC: selektive Anreicherung in Irgasan-Ticarillin-Kaliumchlorat-Bouillon
- MRB: selektive Anreicherung in Modifizierter Rappaport-Bouillon

In **Abbildung 6** sind die Ergebnisse in einem Kreisdiagramm zusammengefasst, wobei deutlich wird, welche Nachweismethode und welche Kombinationen am erfolgreichsten waren. Die Identifizierung aller sechzehn pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 war ausschließlich durch den Gebrauch von Direktausstrich (D1), selektiver Anreicherung in MRB und selektiver Anreicherung in ITC möglich. In vierzehn Fällen konnte der Nachweis durch Kombination von Direktausstrich und selektiver Anreicherung in MRB, in dreizehn Fällen durch Verbindung des Direktausstriches mit der selektiven Anreicherung in ITC erreicht werden. Elf Mal konnten pathogene

Y. enterocolitica 4/O:3 durch den alleinigen Direktausstrich nachgewiesen werden. Durch die Anwendung der selektiven Anreicherung in ITC konnten sechs Mal, durch die alleinige Verwendung von MRB nur vier Mal pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 isoliert werden.

9.2 Ergebnisse des Testsystems API 20E

Die typischen Kolonien auf CIN-Agar („Kuhaugen“), die im Urea-Test positiv reagierten, wurden einer Differenzierung mit dem API 20E unterzogen. Letztere wurde mit insgesamt 42 Isolaten aus 36 Proben durchgeführt. Die für *Y. enterocolitica* typische Zahlenkombination wurde 18 Mal (aus 18 Proben) nachgewiesen. Dabei handelte es sich, wie bei der späteren Differenzierung festgestellt wurde, siebzehn Mal um pathogene *Y. enterocolitica*-Isolate und ein Mal um ein apathogenes *Y. enterocolitica*-Isolat. Zusätzlich konnten mittels des API 20E drei Mal *Y. kristensenii* (aus drei Proben), und je ein Mal *Y. intermedia*, *Y. rohdei* und *Y. frederiksenii* (jeweils aus einer Probe stammend) identifiziert werden (siehe **Tabelle 19** im Anhang). Die anderen 16 untersuchten Isolate (von zwölf Proben stammend) ergaben eine für Yersinien untypische Zahlenkombination und wurden nicht weiter untersucht.

9.3 Ergebnisse der Biotypisierung

Die Biotypisierung wurde insgesamt in 46 Mal durchgeführt. Diese Zahl ergab sich durch Testung von 46 Isolaten aus 23 Proben, die sich im API 20E als der Species *Yersinia* zugehörig erwiesen hatten (siehe **Tabelle 19** im Anhang). Bei den untersuchten 46 Kolonien konnte 33 Mal der Biotyp 4 aus 16 verschiedenen Proben und zwei Mal der Biotyp 1A aus einer Probe nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich 33 Mal um pathogene *Y. enterocolitica* und zwei Mal um apathogene *Y. enterocolitica*. Bei den restlichen elf untersuchten Isolaten (von sechs Proben stammend) ergab die Bestimmung des Biotyps kein charakteristisches Resultat. Dabei handelte es sich um die anderen gefundenen *Yersinia*-Species.

9.4 Ergebnisse der Untersuchung auf Pathogenität

Insgesamt 46 Isolate wurden auf plasmid- und chromosomal-kodierte Pathogenitätseigenschaften untersucht. Die Anzahl der Isolate ergab sich aus den gleichen Gründen wie bereits unter 9.3 dargestellt. Von den untersuchten Isolaten konnten bei 29 die Aufnahme von Kongorot und ein Calcium-abhängiges Wachstum auf CRMOX-Agar festgestellt werden. Die anderen 17 Isolate zeigten ein negatives Ergebnis. Bei den 29 positiven Ergebnissen handelte es sich in allen 29 Fällen um *Y. enterocolitica* 4/O:3. Vier untersuchte Kolonien (von zwei unterschiedlichen Proben), die als *Y. enterocolitica* 4/O:3 identifiziert worden waren, erbrachten ein negatives Testergebnis. Bei den restlichen dreizehn negativ getesteten Kolonien handelte es sich um die apathogenen *Yersinia*-Species.

Die Untersuchungen auf chromosomal-kodierte Eigenschaften wurden bereits im Rahmen der Biotypisierung durchgeführt. Als Nachweis der chromosomal-kodierten Pathogenitätsfaktoren dienten hierbei die Abwesenheit von Pyrazinamidase und die Unfähigkeit zur Äsculinspaltung und zum Salicinabbau.

Tab. 18: Ergebnisse der Testung auf chromosomal-kodierte Eigenschaften

Test \ Ergebnis	positiv	negativ
Pyrazinamidase	13	33
Äsculin	7	39
Salicin	7	39

Aus **Tabelle 18** ist ersichtlich, dass bei der Untersuchung von insgesamt 46 Kolonien (von 23 Proben stammend) 33 ein negatives Ergebnis bei der Testung auf Pyrazinamidase zeigten. Dabei handelte es sich um die pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3. Bei den dreizehn positiv getesteten Kolonien handelte es sich sechs Mal um *Y.*

kristensenii (aus drei Proben) und je zwei Mal um *Y. intermedia*, apathogene *Y. enterocolitica* und *Y. frederiksenii* (jeweils aus einer Probe stammend). Ein Mal wurde der positive Nachweis von *Y. rohdei* erbracht (von einer Probe). Bei der Testung auf Äsculinspaltung erbrachten 39 Kolonien ein negatives Ergebnis. Darunter fielen 33 Mal die pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 (aus 16 Proben stammend) und sechs Mal *Y. kristensenii* (von drei Proben). Das siebenfache positive Ergebnis wurde je zwei Mal von *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* und den apathogenen *Y. enterocolitica* erbracht und ein Mal von *Y. rohdei* (jeweils von einer Probe stammend). Die Untersuchung auf die Fähigkeit zum Salicinabbau fiel ebenso wie der Äsculinabbau aus. 39 getestete Kolonien reagierten negativ, sieben dagegen positiv. Die Verteilung der einzelnen *Yersinia*-Species entsprach ebenfalls der bei der Äsculinspaltung.

9.5 Ergebnisse der Serotypisierung

Die Serotypisierung wurde in 46 Fällen (aus 23 Proben) zur endgültigen Bestimmung und Identifizierung durchgeführt. In 33 Fällen ergab die Testung auf den Serotyp mittels Objektträgeragglutination ein positives Ergebnis hinsichtlich des Serotyps O:3. Die Isolate stammten aus 16 Proben. Da diese Isolate bereits als Biotyp 4 identifiziert worden waren, handelte es sich somit um *Y. enterocolitica* 4/O:3. Bei dreizehn untersuchten Kolonien (von 7 Proben) erbrachte die Agglutination ein negatives Ergebnis. Dabei handelte es sich um die apathogenen *Yersinia*-Species.

DISKUSSION

10 Prävalenz

10.1 *Y. enterocolitica* 4/O:3 in der Gesamtheit der Proben

Im Rahmen dieser Erhebung wurden insgesamt 298 Proben sowohl vom Schwein (rohes Fleisch und Schlachtnebenprodukte), als auch von Gerätschaften und Oberflächen (Umgebungsproben) gewonnen. Wie viele Proben jeweils genommen wurden, ergab sich aus den Gegebenheiten und der möglichen Relevanz und Aussagekraft der Proben vor Ort. Von den 115 Proben vom Tierkörper und den Schlachtnebenprodukten erwiesen sich vierzehn Proben als positiv für pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 (12,2%). Nur 1,1% der pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 stammte in dieser Untersuchung aus den Umgebungsproben (zwei der 183 untersuchten Proben waren positiv). Bezogen auf die einzelnen Metzgereien lag die Verbreitung von pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 zwischen 0 und 9,1%.

Vergleichsmöglichkeiten mit Angaben aus der Literatur gibt es kaum. Untersuchungen zur Verbreitung von pathogenen *Y. enterocolitica* speziell an Schlachthöfen wurden zwar in den vergangenen Jahren durchgeführt und erbrachten stets hohe Nachweisraten pathogener *Y. enterocolitica* (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000a, 2001a; BUCHER 2001), Untersuchungen über das Vorkommen in Metzgereien wurden nur vereinzelt durchgeführt. CHRISTENSEN (1987) führte in den Jahren 1982-1983 ein Screening hinsichtlich *Y. enterocolitica* O:3 in Metzgereien in Dänemark durch. Dabei wurden sowohl mittels Abstrich die Umgebung und mittels Tampons das Abflusswasser als auch verzehrsfähiges tierisches Material wie Kopf- und Nackenfleisch, Zungen, Herz, Leber und Zwerchfell beprobt. Die Kontaminationsrate der untersuchten Proben lag bei 10%.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 auch in Bayern in Metzgereien vertreten sind und somit ein Risiko für den Verbraucher darstellen. Üblicherweise werden die meisten rohen Produkte vor dem Verzehr durch den Verbraucher durcherhitzt. In diesem Fall werden, wie durch Untersuchungen von HEIM (1984) bereits bestätigt, Yersinien auch abgetötet. Jedoch darf die Ge-

fahr einer Kreuzkontamination im Gewinnungs- und Herstellungsprozess nicht unterschätzt werden. Berührt der Metzger beispielsweise zunächst kontaminiertes rohes Fleisch, unterzieht danach aber seine Hände keiner ausreichenden Reinigung und Desinfektion, so besteht die Gefahr der Kontamination von Ware, die anschließend nicht bzw. nicht nochmals erhitzt wird, wie beispielsweise Wurstwaren. Ebenso gehört heutzutage der Genuss von rohem Hackfleisch, zum Beispiel in Form von Hackepeter, zu den normalen Verzehrsgewohnheiten des Verbrauchers. Die Problematik ergibt sich zum einen aus dem rohen Verzehrstatus, zum anderen aus dem hohen Zerkleinerungsgrad (FEHLHABER und JANETSCHKE 1992). Wird also aus mit Yersinien kontaminiertem Fleisch Hackfleisch gewonnen, besteht für den Verbraucher ebenfalls die Gefahr einer Infektion. Die gleiche Problematik besteht bei Rohwürsten, wie beispielweise Mettwurst. Für die Herstellung findet mehr oder weniger stark zerkleinertes rohes Fleisch Verwendung (PRÄNDL et al. 1988). Da jedoch im Anschluss, im Rahmen der Reifung, keine Durcherhitzung stattfindet, besteht auch hier ein Risiko. Die Gefahr für den Verbraucher ergibt sich aus der hier dargestellten Situation: kontaminierte Ware gelangt über die Metzgereien in die einzelnen Haushalte und kann zu einer Infektion führen.

Die aktuellen Zahlen des Robert-Koch-Institutes (RKI) bestätigen die Problematik von *Y. enterocolitica*-Infektionen. Bis zur 36. Kalenderwoche 2002 wurden insgesamt schon 5063 amtliche Fälle gemeldet. Dies sind 270 mehr als im Vorjahr. Zusätzlich sind in diese Statistik Daten der nicht erkannten Fälle mit einzurechnen. Weder geht jeder Betroffene mit milder Durchfallssymptomatik zum Arzt, noch leitet jeder behandelnde Arzt eine genaue Erregerabklärung ein. So wird beispielsweise die Dunkelziffer bei Salmonelleninfektionen auf zehn bis zwölf Mal höher als die nachgewiesene Fallzahl geschätzt. Es ist davon auszugehen, dass für Yersinien Entsprechendes zu erwarten ist, eventuell muss sogar mit höheren Zahlen gerechnet werden. Bei Durchfallssymptomatik wird zunächst an eine Salmonellose, Campylobacteriose oder virale Infektionserreger gedacht und darauf untersucht. Bei einem negativen Ergebnis wird jedoch oft keine weitere Ursachenforschung betrieben. Somit kann der Erreger unerkannt bleiben.

Neben den pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 konnten drei Mal *Y. kristensenii* und je ein Mal *Y. frederiksenii*, *Y. rohdei*, *Y. intermedia* und ein apathogener

Y. enterocolitica-Stamm nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde gezielt nach pathogenen *Y. enterocolitica* gesucht, bei dem eingesetzten Nachweisverfahren handelte es sich um eine Methode zur Isolierung von pathogenen *Y. enterocolitica*. Zusätzlich wurde bei der Beurteilung der verschiedenen Medien explizit nach entsprechenden Kriterien selektiert. Es ist davon auszugehen, dass bei weniger aufwendiger Selektionsmethode und Auswertung der Platten wesentlich mehr apathogene *Y. enterocolitica* und andere *Yersinia*-Species gefunden worden wären.

10.2 Pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 in gekühlten und ungekühlten Räumen

Y. enterocolitica gehört zu den psychrotrophen Keimen, das heißt, eine Vermehrung findet auch noch im Temperaturbereich bis 0°C statt. Der überwiegende Teil (62,5%) der pathogenen *Y. enterocolitica* konnte in der vorliegenden Studie in gekühlten Räumen ($\leq +7^{\circ}\text{C}$) nachgewiesen werden. Dadurch wird die besondere Problematik dieses Erregers nochmals verdeutlicht. Eine Kühlung verlangsamt zwar das Wachstum der Yersinien, bewirkt aber nicht deren Abtötung. Trotz dieses Wachstumsverhaltens muss die Kühlkette vom Transport in die Metzgerei und auf dem weiteren Weg innerhalb des Betriebes konsequent eingehalten werden, um die rasche Vermehrung des Erregers zu unterdrücken.

10.3 *Y. enterocolitica* 4/O:3 in den Einzelbetrieben

In sechs der acht Betriebe konnten pathogene Yersinien nachgewiesen werden. Bei den Betrieben **A**, **B**, **D**, **E**, **G** und **H** handelte es sich um Betriebe mit einer Mitarbeiterzahl unter zehn Personen. In Betrieb **B** – einem kleinen Familienunternehmen – wurden lediglich apathogene *Y. enterocolitica* gefunden. Bei Betrieb **H**, einem ähnlich strukturierten Betrieb, wurden weder apathogene noch pathogene Yersinien gefunden. Bei den anderen genannten Metzgereien (**A**, **D**, **E**, **G**) lag die Verbreitung für pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 zwischen 5,4 und 9,1%. Bei den Metzgereien **C** und **F** handelte es sich um Betriebe mit einer Mitarbeiterzahl über zehn Personen. In beiden konnten pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 mit einer Prävalenz von 7,5% bzw. 5,0% nachgewiesen werden.

Bei Untersuchungen von CHRISTENSEN (1987) waren pathogene *Y. enterocolitica* vor allem in kleinen Metzgereien vertreten. Dies wurde mit geringer Durchlauftrate, Lage-

rung von minderwertigem Fleisch (nicht im Sinne der Rechtsvorschriften, sondern als Bezeichnung für im Nahrungs- und Genusswert verminderte Teilstücke) wie zum Beispiel Zwerchfellen und diversen Zutaten in den Kühlräumen und fehlender Trennung bei der Behandlung von rohem Fleisch und von Endprodukten erklärt. Die geringere Nachweishäufigkeit in den größeren Metzgereien und Supermärkten wurde damit begründet, dass hier Durchlaufrate und Hygiene hoch waren, außerdem eine deutliche Trennung zwischen rohen Produkten und Endprodukten stattfand.

In dieser Arbeit wurden pathogene *Y. enterocolitica* auch aus größeren Betrieben nachgewiesen. Es kann also nicht davon ausgegangen werden, dass alleine die Aufteilung in verschiedene Arbeitsbereiche die Verbreitung von Yersinien vermindert, sondern es muss auch eine strikte Einhaltung dieser Einteilung stattfinden. Ebenso besteht durch eine große Anzahl an Mitarbeitern die Gefahr, dass die Verbreitung von Yersinien durch unbedachtes Handeln gefördert wird. Ähnliches wurde bereits durch HOLMES (2002) beschrieben. Die Problematik bei großen Betrieben ist häufig ungeschultes Personal, das weniger Hygienebewusstsein als gelerntes Personal zeigt. Im Gegensatz dazu muss bei der Betrachtung von Ein-Mann-Betrieben mit einbezogen werden, dass eventuell gerade in diesen Betrieben oft eine bessere Hygiene herrscht. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Verantwortung für die Hygiene bei einer Person, die in dem Fall identisch mit dem Besitzer ist, liegt.

10.4 *Y. enterocolitica* 4/O:3 in tierischem Probenmaterial

Das Probenspektrum der vom Schweineschlachtkörper genommenen Proben verteilte sich wie folgt: 95 der Proben stammten von rohem Schweinefleisch und 20 von rohen Schlachtnebenprodukten. Von den 95 Fleischproben erwiesen sich neun (9,5%) als positiv, von den 20 Schlachtnebenprodukten fünf (25%).

Bei Probennahmen durch BUCHER (2001) an einem Schlachthof erbrachte die Untersuchung von Geschlingen vom Schwein mit 54% eine noch höhere Nachweisrate an pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3. Als Ursache für die Kontamination findet man in der Literatur immer wieder Tonsillen, Zungen und Kot an erster Stelle. Diese sind auch hier als Kontaminationsquelle zu vermuten. Der Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 der hier untersuchten Proben lag unter den Angaben von BU-

CHER (2001). Als Ursache hierfür könnte zum einen eine Yersinien-freie Charge an Tieren in Betracht gezogen werden, das heißt, die Tiere stammten aus einem Yersinien-freien Bestand, eine andere Möglichkeit ist die unterschiedliche Form der Probennahme. Während von BUCHER (2001) Poolproben untersucht wurden, erfolgte in dieser Studie eine Analyse von Einzelproben. Trotz der geringeren Nachweisrate wird aber deutlich, dass ein Eintrag in die Metzgereien durchaus stattfindet und somit ein Problem im Rahmen des Verbraucherschutzes besteht.

10.5 *Y. enterocolitica* 4/O:3 in den Umgebungsproben

Wie bereits oben erwähnt, liegt das Problem des Einbringens dieser Erreger in den Betrieb bei unbehandeltem Fleisch und Schlachtnebenprodukten, die weitere Ausbreitung im Betrieb sowohl bei Fleisch und Schlachtnebenprodukten als auch bei den Gegenständen, die mit diesen in Berührung kommen (Gerätschaften, andere Ausstattung und Oberflächen, zusammenfassend als Umgebungsproben bezeichnet). Bei den beiden positiven Umgebungsproben dieser Studie handelte es sich um Kettenhandschuhe und um eine Arbeitsfläche. Als Ursache derer Kontamination kann frisches oder schon gelagertes kontaminiertes Tiermaterial angesehen werden.

Die nur geringe Nachweisrate von pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 aus Umgebungsproben ist sicherlich darauf zurückzuführen, dass die Probennahme zum Teil erst nach der Reinigung und Desinfektion durchgeführt wurde (siehe **Tabelle 20** im Anhang) und dadurch im allgemeinen nur sehr geringe Keimzahlen bzw. im speziellen keine Yersinien mehr nachgewiesen werden konnten.

11 Eignung der angewandten Methoden und Testverfahren

11.1 Beurteilung der verschiedenen Isolierungsverfahren

Der Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* wurde in dieser Arbeit in Anlehnung an die ISO DIN 10273 und an die Methode des NCFA durchgeführt. Er umfasste einen Direktausstrich, einen Ausstrich der bei Zimmertemperatur angetauten Probe, Vorbehandlung der aufgetauten Probe mit 0,25%iger KOH nach Über-Nacht-Anreicherung und die selektiven Anreicherungen in MRB und ITC. Am häufigsten konnten pathogene Yersinien mit der Methode des Direktausstriches nachgewiesen werden (insgesamt elf Nachweise). Ohne Direktausstrich wären in fünf untersuchten Proben keine pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 nachgewiesen worden. Dies ist außergewöhnlich, spricht jedoch für eine hohe Keimkonzentration (> 4 bis 10^6) (VIS-NUBHATLA et al. 2001) im beprobten Ausgangsmaterial. Des Weiteren konnte in drei Fällen der Erregernachweis nur über selektive Anreicherung in MRB und zwei Mal nur über die selektive Anreicherung in ITC erbracht werden. Zusätzlich zeigten die Ergebnisse, dass durch die Kombination von Direktausstrich und ITC 13 Mal, durch die Verwendung von Direktausstrich und MRB 14 Mal der positive Nachweis erbracht werden konnte. Analog zu diesen Beobachtungen wurde von verschiedenen Autoren stets der Einsatz unterschiedlicher Methodenkombinationen befürwortet, wie beispielsweise der Gebrauch von selektiver Anreicherung in ITC und Direktausstrich auf festen Nährmedien, der u.a. von DE BOER et al. (1991) verwendet wurde, während FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999) feste Nährmedien und MRB bei ihren Untersuchungen einsetzten.

Hieraus wird ersichtlich, dass sowohl der Direktausstrich als auch die selektiven Anreicherungen in MRB und ITC als unerlässliche Bestandteile des Verfahrens zur Isolierung von pathogenen *Y. enterocolitica*, insbesondere 4/O:3, anzusehen sind. Bei der Verwendung kultureller Methoden kann also erst durch die Kombination der ISO-Methode und des Vorschlages des NCFA bei der Bestimmung von pathogenen *Y. enterocolitica* die höchste Nachweisrate erzielt werden.

11.2 Beurteilung des API 20E, der Bio- und Serotypisierung und der Untersuchung auf Pathogenität

Der API 20E hat sich in dieser Untersuchung als sehr gute Identifikationsmöglichkeit für die verschiedenen *Yersinia*-Species erwiesen. Er wurde für die Differenzierung bei 42 Kolonien eingesetzt und erbrachte 23 Mal ein positives Ergebnis für die verschiedenen pathogenen und apathogenen *Yersinia*-Species. Bei den restlichen 19 Isolaten konnten aufgrund der erhaltenen Zahlenkombination Yersinien eindeutig ausgeschlossen werden.

Die Biotypisierung wurde an 46 Kolonien durchgeführt. Bei den gefundenen Biotypen handelte es sich um den pathogenen Biotyp 4 und den apathogenen Typ 1A (siehe **Tabelle 19** im Anhang). Mittels Agglutinationsserum wurde die gleiche Anzahl an Kolonien auf Vorliegen des Serotyps O:3 untersucht. In 33 Fällen kam es zu einer Objektträgeragglutination, also einem positiven Ergebnis bezüglich des Serotyps O:3. Dementsprechende Ergebnisse findet man auch in der Literatur, wie beispielsweise bei FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001d). Bei Untersuchungen verschiedenster Organe und Fleisch war stets der Bioserotyp 4/O:3 bzw. der apathogene Biotyp 1A vertreten.

Die plasmid-kodierten Pathogenitätsfaktoren wurden in dieser Arbeit mittels CRMOX-Agar überprüft. Dabei ergaben von den getesteten 46 Kolonien 29 ein positives Ergebnis. Es handelte sich hierbei um pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3. In vier Fällen, durch die anderen Tests bereits als *Y. enterocolitica* 4/O:3 identifizierte Kolonien, konnten keine für plasmid-kodierte Pathogenität sprechenden Ergebnisse gefunden werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das Plasmid im Laufe der verschiedenen Kultivierungsschritte verloren ging (SCHIEMANN 1989; KAPPERUD 1991). Derartige Erreger müssen als potentiell pathogen eingestuft werden.

12 Vorschläge zur Risikominimierung

Bei der Bekämpfung von Yersinien und der Verminderung derer Ausbreitung in den Metzgereien steht Hygiene an erster Stelle. Hygienemaßnahmen sollten bereits zum frühestmöglichen Zeitpunkt beginnen, also schon beim Erzeuger selbst. Anzustreben wären Yersinien-freie Bestände, wobei sich die Schaffung derselben aufgrund symptomloser Träger äußerst schwierig gestaltet. Im Rahmen des neu eingeführten QS-Systems (Qualität und Sicherheit GmbH) wurde ein Schritt in diese Richtung getan.

Der weitere Weg in den Schlachthof und die dort herrschende Hygiene wurde bereits von anderen Arbeiten beleuchtet. Hier kann auf BUCHER (2001) verwiesen werden. Ein Ergebnis seiner Arbeit war, dass nur eine Optimierung der Hygieneverhältnisse und eine bessere Ausbildung der Mitarbeiter eine Verminderung der Kontamination von Fleisch und Innereien mit Yersinien bewirken kann. Als weitere Maßnahme sollten Änderungen in der Schlachttechnik angestrebt werden. Der Kopf einschließlich der stark kontaminierten Mandeln und der Zunge sollte zu einem frühestmöglichen Zeitpunkt entfernt werden, um so die Kontamination des übrigen Schlachttierkörpers so gering wie möglich zu halten (CHRISTENSEN 1987; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001). Ist dies aus organisationstechnischen Gründen nicht möglich, muss eine konsequente Reinigung und Desinfektion der Messer erfolgen, mit denen das Entfernen der Tonsillen erfolgt, um die Gefahr einer Kreuzkontamination so gering wie möglich zu halten. Möglich wäre auch, ein separates Messer für die Entfernung der Tonsillen zu verwenden. FUKUSHIMA (1989) sah jedoch eine gründliche Waschung oder sogar eine eventuelle Sterilisation der Tiere vor der Schlachtung als Lösung an. Eine Umsetzung solch einer Forderung ist aber aufgrund der derzeitigen Gesetzeslage nicht möglich. Leitfäden für die Schlachtung und Zerlegung im Rahmen des QS-Systems existieren bereits und umfassen neben den Anforderungen der FIHV auch Bestimmungen für die Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen sowie Anforderungen an die Eigenkontrolle u.a.. Des Weiteren beinhaltet das QS-System die Bekämpfung von lebensmittelassoziierten Infektionen auch auf Bestandesebene, wobei ein Salmonellenmonitoring für Schweine bereits vorgeschrieben ist. Dieses Konzept ist auch auf Yersinien übertragbar.

Bei der Weiterverarbeitung des Fleisches durch die Metzgereien muss bereits beim Transport zu denselben auf eine konsequente Einhaltung der Kühlkette geachtet

werden. Dadurch kann zwar die Vermehrung der Yersinien nicht verhindert, doch zumindest verlangsamt werden. Ebenso sollte eine räumliche Trennung von rohem Fleisch und Schlachtnebenprodukten bereits während des Transports, aber auch in der Metzgerei – beispielsweise in der Kühltheke – gewährleistet sein. Getrennte Arbeitsflächen beim Arbeiten mit rohem Fleisch, Schlachtnebenprodukten und Fleischerzeugnissen sind ebenfalls anzustreben. Keinesfalls sollte aus potentiell risikoreichem Material, bei dem eventuell Tonsillen enthalten sein könnten, wie es beispielsweise bei Kopf- oder Backenfleisch der Fall ist, Ware zum rohen Verzehr hergestellt werden. Eigenkontrollen der Metzgereien, welche Reinigungspläne, Temperaturkontrollen, bakteriologische Untersuchungen sowie Personalhygiene und Schulungen beinhalten, müssen ein unerlässlicher Bestandteil bei der Bekämpfung von Krankheitserregern inklusive der Yersinien sein. Leitfäden bezüglich *Y. enterocolitica* sollten in Betracht gezogen werden. Da die Metzgerei die letzte Stufe vor der Abgabe an den Endverbraucher darstellt, ist sie somit auch die letzte Möglichkeit hygienisch reglementierende Maßnahmen zu ergreifen und zu kontrollieren. Eine absolute Sicherheit kann jedoch, wie bei jedem anderen Keim auch, nicht gewährleistet werden. Da vom Verbraucher allerdings durchaus ein Maß an Hygienebewusstsein erwartet werden kann, dürften die hier genannten Vorschläge, sofern sie Anwendung finden, vorläufig als ausreichend betrachtet werden.

Aus den besprochenen Endergebnissen ist ersichtlich, dass der Gesamtkomplex betriebseigener Qualitätssicherung ein wichtiger und unerlässlicher Bestandteil bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen sein muss. Die Einhaltung der Einzelschritte Kühlung, Reinigung/Desinfektion und zusätzlicher Hygienemaßnahmen ist unumgänglich und bildet die Grundlage für das in der FIHV geforderte Eigenkontrollsystem nach HACCP-Grundsätzen. Unter Beachtung und Anwendung dieser „Betriebsphilosophie“ können derartige Denkmodelle einen wichtigen Beitrag zur Reduzierung des „Yersinien-Eintrages“ in die Nahrungskette liefern.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Zeitraum von Juni bis August 2001 wurde in acht verschiedenen Metzgereien im Raum München eine Gesamtzahl von 298 Proben gesammelt. 115 Tupferproben stammten von rohem Schweinefleisch und Innereien, 183 von Gerätschaften und Oberflächen, die mit Lebensmitteln, insbesondere rohem Fleisch, in Berührung kommen. Die Proben wurden auf *Yersinia enterocolitica* untersucht. Die Nachweismethode erfolgte in Anlehnung an die ISO DIN 10273: „Microbiology – General guidance for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*“ und an den Vorschlag des NCFA (Nordic Committee On Food Analysis: „*Yersinia enterocolitica* – Detection in foods“).

Unmittelbar nach der Probennahme wurde ein Direktausstrich auf Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN)-Agar durchgeführt und die Proben anschließend für ca. drei Monate tiefgefroren. Nach diesem Zeitraum wurde ein CIN-Agar-Ausstrich nach Inkubation der tiefgefrorenen Probe in Tryptose-Soja-Bouillon (TSB) durchgeführt. Ein Ausstrich wurde nach Vorbehandlung der Über-Nacht-Anreicherung dieser Probe mit 0,25%iger KOH angefertigt. Außerdem erfolgten selektive Anreicherungen in Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Nährbouillon (ITC-Nährbouillon) bzw. modifizierter Rappaport-Bouillon (MRB-Bouillon) mit anschließendem Ausstrich auf CIN-Agar. Typische Kolonien auf CIN-Agar (sog. „Kuhaugen“), die sich als Urea-positiv erwiesen, wurden mit dem API 20E weiterdifferenziert. Die gefundenen *Y. enterocolitica*-Isolate wurden bio- und serotypisiert und die Pathogenität mit Hilfe des Kongorot-Magnesium-Oxalat (CRMOX)-Agars bestätigt.

Die meisten der pathogenen Isolate (68,8%) wurden bereits nach Direktausstrich auf selektive CIN-Agar-Platten gefunden, weitere pathogene Yersinien konnten erst nach selektiver Anreicherung in ITC und MRB identifiziert werden. Pathogene *Y. enterocolitica* 4/O:3 wurden in sechs der acht Metzgereien aus rohen Produkten vom Schwein nachgewiesen. Insgesamt stammten 9,5% der positiven Ergebnisse aus rohem Schweinefleisch (von 95 Proben erwiesen sich neun als positiv) und 25,0% aus Schlachtnebenprodukten (Zunge, Niere und Leber; von 20 Proben erbrachten fünf ein positives Ergebnis). In einem Betrieb konnten pathogene

Y. enterocolitica auch in zwei Umgebungsproben gefunden werden. Alle pathogenen Isolate gehörten zum Bioserotyp 4/O:3. Neben den pathogenen *Y. enterocolitica* konnten an apathogenen Yersinien drei Mal *Y. kristensenii* und je ein Mal *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. rohdei* und ein apathogener *Y. enterocolitica*-Stamm nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass pathogene *Y. enterocolitica* in Metzgereien vorhanden sind, wobei der Großteil der Nachweise in unbehandeltem Schweinefleisch und in Nebenprodukten der Schlachtung gelang. Der geringe Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* in den Umgebungsproben ist insofern nicht erstaunlich, als die vorhergehende Reinigung und Desinfektion eine entscheidende Verminderung der Keimflora bewirkt hatte. Die meisten *Y. enterocolitica*-Isolate wurden ohne Anreicherung gefunden. Dies weist auf eine große Menge an pathogenen Isolaten in den untersuchten Proben hin. Damit wird deutlich, dass das Vorkommen und die Ausbreitung von pathogenen *Y. enterocolitica* 4/O:3 in nicht selbstschlachtenden Metzgereien ein nicht zu vernachlässigendes Problem darstellt.

SUMMARY

A contribution to the epidemiology and distribution of pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in butchers' shops in the Munich area

Between June and August 2001 a total of 298 samples were collected in eight different butchers' shops in the Munich area. 115 swab samples were taken from raw pork and offal and 183 swab samples from equipment and surfaces that get in contact with food, particularly raw meat. The samples were examined for the presence of pathogenic *Y. enterocolitica*. The examination of the samples was performed according to the international standard ISO DIN 10273 ("Microbiology – General guidance for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*") and the method of the NCFA (Nordic Committee On Food Analysis: „*Yersinia enterocolitica* – Detection in foods“).

Immediately after sampling, direct plating on Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin agar plates (CIN-agar) was carried out, afterwards the samples were frozen for three months. After this period, a second plating on CIN-agars was performed after a 3 h incubation of the frozen samples in Tryptic-Soya-Broth (TSB). In addition, CIN-agar plates were inoculated after pre-treatment of the over-night-enrichment in TSB with KOH (0.25%) and after selective enrichments in modified Rappaport-Broth (MRB) as well as Irgasan-Ticarcillin-Potassium-Chlorate-Broth (ITC). The typical colonies of *Yersinia enterocolitica* ("bulleyes"), which proved to be urea-positive, were further bio- and serotyped and the pathogenicity was proved via Congo-Red-Magnesium-Oxalat (CRMOX) agar plates.

Most (68.8%) of the positive samples were already discovered after direct plating on selective CIN-agars, however, selective enrichment in both MRB and ITC broths was needed to detect the remaining positive samples. Pathogenic *Y. enterocolitica* of bio-serotype 4/O:3 were found in raw pork products in six of the eight butchers' shops. In all, 9.5% of raw pork (9 out of 95) and 25.0% of the edible offal samples (5 out of 20) (tongue, kidney and liver) were contaminated with pathogenic strains. In one shop, pathogenic *Y. enterocolitica* were also isolated from two environmental samples. Bio-serotype 4/O:3 was the only pathogenic type found. Besides the pathogenic

Y. enterocolitica , *Y. kristensenii* were identified three times, *Y. intermedia*, *Y. rohdei* and a pathogenic *Y. enterocolitica* 1A each once.

These results reveal that pathogenic *Y. enterocolitica* are distributed among butchers' shops in the Munich area. Raw pork and especially edible offal were shown to be contaminated with pathogenic *Y. enterocolitica* 4/O:3. The low isolation rate from environmental samples is not surprising as cleaning and disinfection were performed previous to sampling which lead to a significant reduction of bacterial counts. The majority of the *Y. enterocolitica* isolates were detected without enrichment. This implies the presence of a large number of pathogenic isolates in the samples. For this reason, it is obvious that the occurrence and the spread of pathogenic *Y. enterocolitica* in butchers' shops that don't perform their own slaughtering is a not too underrating problem.

ANHANG

13 Medien zur Anreicherung, Isolierung und Identifizierung von *Y. enterocolitica*

13.1 Flüssige Medien

TSB-Nährbouillon

(Tryptone Soya Broth/Caseinpepton-Sojamehl-Pepton-Lösung)

Caseinpepton-Sojamehl-Pepton-Lösung (CASO-Agar)

(OXOID, CM 129)

30 g

Destilliertes Wasser

ad 1000 ml

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

ITC- Nährbouillon

(Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Nährbouillon)

Trypton (OXOID, L42)

10 g

Hefe Extrakt (OXOID, L21)

1 g

Magnesiumchlorid-Hexahydrat $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

(MERCK, 105833)

60 g

Natriumchlorid (NaCl) (MERCK, 106404) 5 g

Kaliumchlorat ($KClO_3$) (MERCK, 104944)

1 g

Malachitgrün (0,2%ige wässrige Lösung)

(MERCK, 101398)

5 ml

Destilliertes Wasser

ad 1000 ml

- Einstellung des pH-Wertes bei ca. +25°C auf 7,1-7,6
- Verteilung von jeweils 9 ml in Reagenzglasröhrchen
- Sterilisation für 15 min bei 121°C

Zugabe von Supplementen:

Zugabe von jeweils 10 µl der folgenden Lösungen zu jedem Reagenzglas:

Ticarcillin-Lösung 0,1%

- Ticarcillin Disodium (DUCHEFA, T 0180)	10 mg
- Steriles destilliertes Wasser	10 ml

Irgasan-Lösung 0,1%

- Irgasan [®] DP 300 (CIBA)	10 mg
- Ethanol absolut (vergällt) (MERCK, 100974)	10 ml

MRB-Nährbouillon

(Modifizierte Rappaport-Bouillon)

Trypton (OXOID, L42)	7 g
di-Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (MERCK, 106559)	2 g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (MERCK, 105833)	80 g
Malachitgrün (0,2%ige wässrige Lösung) (MERCK, 101398)	6 ml
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

- Abfüllen von je 10 ml in Reagenzglasröhrchen
- Sterilisation für 15 min bei +121°C

KOH-Lösung

Potassiumhydroxid (KOH) (Sigma P-1767)	2,5 g
Natriumchlorid (NaCl) (MERCK, 106404)	8,5 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

- Mischen der Komponenten
- Verteilung von jeweils 4,5 ml in Reagenzröhrchen
- Sterilisation für 15 min bei +121°C

Medium für die Fermentation von Kohlenhydraten

Basismedium

Peptonwasser gepuffert (MERCK, 107228)	10 g
Natriumchlorid (NaCl) (MERCK, 106404)	5 g
Phenolrot (SIGMA, P-4133)	0,02 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

- Mischen der Komponenten, wenn nötig erhitzen
- Einstellen des pH-Wertes bei ca. +25°C auf 6,8
- Abfüllen von je 5 ml in Reagenzglasröhrchen
- Sterilisation für 15 min bei +121°C

Kohlenhydrat-Lösung (Trehalose, Xylose und Salicin)

- D(+)-Xylose (SIGMA, X-3877-25G)
- Salicin (SIGMA, S-0625-25G)
- D(+)-Trehalose (SIGMA, T-5251)

- Zubereitung von Trehalose- und Xylose-Lösung je 10%ig (10 g Zucker/100 ml H₂O) und Salicin 5%ig (10 g Zucker/200 ml H₂O)
- Sterilisation durch Filtration mit Sterilfilter

Gebrauchsfertige Lösung:

- Sterile Zugabe der Xylose- oder Trehalose-Lösung bzw. 1 ml der Salicin-Lösung zu 500 µl des Basismedium
- Röhrchen bei +30°C für 2-3 Tage lagern, um eine Kontamination des Mediums, die durch eine Farbveränderung erkennbar wäre, auszuschließen

13.2 Feste Medien

CIN-Agar

(Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar)

Basismedium:

<i>Yersinia</i> Agar Basis (OXOID, CM 653)	29 g
Destilliertes Wasser	ad 500 ml

- Zum Lösen erhitzen
- Sterilisation für 15 min bei +121°C

zugeführtes Supplement:

Yersinia Selektiv Supplement (gefriergetrocknetes Selektiv-Supplement zur Isolierung von *Yersinia*-Spezies) (OXOID, SR 109E)

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

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

TSA-Agar

(Tryptic soy agar/CASO-Agar)

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CASO-Agar)

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

- Zum Lösen erhitzen
- Serilisation für 15 min bei +121°C
- Abfüllen zu je ca. 15 ml in sterile Petrischalen

UREA-Agar**Basismedium:**

Harnstoff-Pepton-Agar-Basis nach Christensen

(OXOID, CM 53)

2,4 g

Destilliertes Wasser

ad 95 ml

- Zum Lösen erhitzen
- Sterilisation für 15 min bei +121°C

zugeführte Lösung

Harnstoff-Lösung 40% (OXOID, SR 020U)

5 ml

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

Äsculin-Agar

Nutrient Agar Bacto® (DIFCO, 213000)

40 g

Esculin (SIGMA, E-8250)

1 g

Destilliertes Wasser

ad 1000 ml

- Mischen und erhitzen
- Sterilisation für 15 min bei +121°C
- Abfüllen zu je ca. 15 ml in sterile Petrischalen

Tween-Esterase-Agar

Nutrient Agar Bacto® (DIFCO, 213000)

14 g

Destilliertes Wasser

ad 500 ml

- Zum Lösen erhitzen

Tween 80 zur Synthese (MERCK, 822187)

5 ml

- Zugabe von Tween 80 und erneut für 5 min erhitzen
- Sterilisation für 15 min bei +121°C

Pyrazinamidase-Agar

CASO-Agar (MERCK, 105458)	30 g
Pyrazinamid (SIGMA, P-7136)	1 g
Tris-Hydrochlorid (SIGMA, T-3253)	31,5 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

- Mischen der Komponenten mit ca. 800 ml destilliertem Wasser
- Einstellung des pH-Wertes auf 6,0
- Ggf. Angleichung des pH-Wertes mit 1N NaOH
- Auffüllen mit destilliertem Wasser auf 1 Liter
- Abfüllen in Reagenzglasröhrchen zu je 5 ml
- Sterilisieren 15 min bei +121°C
- Abkühlen in schräger Position

Indikator:

Ammoniumferrosulfat-Lösung (NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ (MERCK, 103792)	1 g
Destilliertes Wasser	ad 100 ml

CRMOX-Agar

(Kongorot-Magnesium-Oxalate-Medium)

CASO-Agar (MERCK, 105458)	40 g
Natriumoxalat (SIGMA, S-9265)	3 g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x6H ₂ O) (MERCK, 105833)	4 g
D(-+)-Glucose (MERCK, 108337)	2 g
Kongorot (100%) (SIGMA, C-6767)	50 mg
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

- Zum Lösen erhitzen
- Sterilisation für 15 min bei +121°C
- Abfüllen zu je ca. 15 ml in sterilen Petrischalen

13.3 Aufbewahrungsmedium

Mikrobank

Microbank[®] (PRO-LABDIAGNOSTICS, PL 160) zur Aufbewahrung von Keimen

14 Testsysteme und Reagenzien

API 20 E

Testsystem zur Identifizierung von *Enterobacteriaceae*

BioMérieux SA, Marcy-l'Étoile France

Beinhaltet folgende Tests :

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

Zusätzlich benötigte Reagenzien:

TDA Reagenz	70400 (bioMérieux)
JAMES Reagenz	70540 (bioMérieux)
VP 1 Reagenz	70420 (bioMérieux)
VP 2 Reagenz	70430 (bioMérieux)
NIT 1 Reagenz	70440 (bioMérieux)
NIT 2 Reagenz	70450 (bioMérieux)

Paraffin dickflüssig (MERCK, 107160)

Serotypisierung

Monospezifisches Testserum "Anti-*Yersinia enterocolitica*"

Anti-*Yersinia enterocolitica* O:3 (TS 1701, SIFIN)

15 Geräte und Hilfsmittel

Waagen

- Laborwaage MC1 Typ LC 6200 D SARTORIUS
- Laborwaage Typ L 2200 P SARTORIUS
- Laborwaage BABA 200 SARTORIUS

Magnetrührer mit Heizplatte

- Typ RCT JANKE & KUNKEL IKA-LABORTECHNIK
- Typ RCH JANKE & KUNKEL IKA-LABORTECHNIK
- Magnetrührwerk MR 2002 HEIDOLPH

Pipetten

- Reference[®] fix 1000 µl EPPENDORF
- Reference[®] variabel 10-100 µl EPPENDORF
- Reference[®] variabel 100-1000 µl EPPENDORF
- Transferpipette 1000 µl BRAND

Pipettenspitzen

- Standardtips 100 µl EPPENDORF
- Standardtips 1000 µl EPPENDORF

Pipettierhilfe

- Typ pipetus[®]-akku HIRSCHMANN

Dispensierhilfe

- Dispensette[®] 0-10 ml BRAND

Glaspipetten

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

Reagenzgläser

- Reagenzgläser 160x16 mm SCHOTT

Reagenzglas-Schüttelgerät

- Vibro-FixVF 2 JANKE & KUNKEL IKA-LABORTECHNIK

Wattestopfen

- STERI-Wattestopfen Nr. 14 SCHUBERT

Messzylinder

- Messzylinder 20 ml BRAND
- Messzylinder 100 ml BRAND
- Messzylinder 500 ml BRAND
- Messzylinder 1000 ml BRAND

Aufbewahrungsgefäße

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

Aludeckel

- Aludeckel Ø 8 cm MERCK
- Aludeckel Ø 10 cm MERCK
- Aludeckel Ø 13 cm MERCK

Kühlschränke

- Kühl-Gefrier-Kombination Typ „Premium“ LIEBHERR
- FKS 5000 Index 10C Typ 200071 LIEBHERR

Brutschränke

- Typ B 6060 HERAEUS INSTRUMENTS
- Typ B 6200 HERAEUS INSTRUMENTS
- Typ B 6420 HERAEUS INSTRUMENTS

Autoklav

- Tischautoklav Typ 3850EL TUTTNAUER SYSTEC
- Hochdruckdampf-Sterilisator Typ 112 KSG STERILISATOREN GmbH

Petrischalen

- Sterile Petrischalen Nr. 100 WALDECK

Sicherheitsbrenner

- Fireboy S 1000 TECNOMARA AG
- Gasi Fabrik-Nr.: 94113 SCHÜTT

Sterilbank

- Sterilbank BSB GELAIRE®

Mikrobank

- Mikrobank™ Product Code PL. 160 PRO-LAB DIAGNOSTICS

pH-Meter

- Typ pH 535 Miltical mit Temperaturabgleich WTW

Objektträger

- Objektträger einfach 76 x 26 mm MENZEL-GLÄSER

Filter

- Sterilfilter Einmal Filterhalter 0,2 µl SCHLEICHER & SCHUELL

Spritzen

- Injekt 10 ml Luer BRAUN

Ösen

- Platin/Iridium-Ösen 90/10

BENDER & HOBEIN

Handschuhe

- Einmal-Handschuhe PE gehämmert

MERCK

Tupfermaterial

- Einfachtupfer, 16-lagig, 5x5 cm

HOFFMANN

16 Ergebnisse der untersuchte Wischtupferproben mit positivem Ergebnis bezüglich *Yersinia*-Species

Tabelle 19: Ergebnisse der Wischtupferproben

Probe	Urea	API	Xyl	Tre	Sal	Tw	Aes	MOX	Pyr	BT	O:3	<i>Yersinia</i> ...
1M1.1D Ferkel	+	10155231	-	+	-	-	-	-	-	4	+	<i>Y. e.</i>
1M5.1D Schweinehälfte	+	10155211	-	+	-	-	-	-	-	4	+	<i>Y. e.</i>
1M5.2D Schweinehälfte	+		-	+	-	-	-	-	-	4	+	<i>Y. e.</i>
1M5ITC Schweinehälfte	+		-	+	-	-	-	-	-	4	+	<i>Y. e.</i>
1M32.1KOH Hirn	+	11557230	+	+	+	+	+	-	+	1A	-	<i>Y. e., ap</i>
1M32.2KOH Hirn	+		+	+	+	+	+	-	+	1A	-	<i>Y. e., ap</i>
2M2.1KOH Haken	+	11545031	+	+	-	+	-	-	+		-	<i>Y. k.</i>
2M2.2KOH Haken	+		+	+	-	+	-	-	+		-	<i>Y. k.</i>
2M16.1MRB Schweineschw.	+	11545031	+	+	-	+	-	-	+		-	<i>Y. k.</i>
2M16.2MRB Schweineschw.	+		+	+	-	+	-	-	+		-	<i>Y. k.</i>
2M25.1D Schweinefilet	+	13145031	+	+	-	+	-	-	+		-	<i>Y. k.</i>
2M25.2D Schweinefilet	+		+	+	-	+	-	-	+		-	<i>Y. k.</i>
3M7.1D Bodenprobe	+	11557731	+	+	+	+	+	-	+		-	<i>Y. i.</i>
3M7.2D Bodenprobe	+		+	+	+	+	+	-	+		-	<i>Y. i.</i>
3M12.1MRB Bauchspeck	+	10155230	-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
3M12.2MRB Bauchspeck	+		-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
3M23.4D Arbeitsfläche	+	10155230	-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
3M23.1D2 Arbeitsfläche	+		-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
3M23.2D2 Arbeitsfläche	+		-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
3M23.1ITC Arbeitsfläche	+	10145231	-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
3M25.1D Kettenhandsch.	+	10155231	-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
3M25.2D Kettenhandsch.	+		-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>

Tabelle 19 (Fortsetzung): Ergebnisse der Wischtupferproben

Probe	Urea	API	Xyl	Tre	Sal	Tw	Aes	MOX	Pyr	BT	O:3	<i>Yersinia...</i>
3M39.1D Messer	+	13155631	+	+	+	+	+	-	+		-	<i>Y. r.</i>
4M12.1MRB Keule	+	00155231	-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
4M12.2MRB Keule	+		-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
4M14.1ITC Leber	+	10155211	-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
4M14.2ITC Leber	+		-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
4M22.1ITC Leber	+	01015521	-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
4M22.2ITC Leber	+		-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
5M18.1D Füße, Schlegel	+	10155231	-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
5M18.2D Füße, Schlegel	+		-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
5M19.1D Füße, Schlegel	+	01015523	-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
5M19.2D Füße, Schlegel	+		-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
5M19.1MRB Füße, Schlegel	+		-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
5M19.1ITC Füße, Schlegel	+		-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
5M25.1MRB Ferkel	+	01015523	-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
5M30.1D Schwein	+	13545331	+	+	+	-	+	-	+		-	<i>Y. f.</i>
5M30.2D Schwein	+		+	+	+	-	+	-	+		-	<i>Y. f.</i>
6M3.1D Schweinhälfte	+	10155231	-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
6M11.2D Fleisch, roh	+	10155230	-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
6M11.1ITC Fleisch, roh	+		-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
7MV1.1D Leber	+	10155230	-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
7MV2.1D Niere	+	03175221	-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
7MV2.2D Niere	+		-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
7MV4.1D Zunge	+	11155220	-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>
7MV4.2D Zunge	+		-	+	-	-	-	+	-	4	+	<i>Y. e.</i>

17 Angaben zu den einzelnen Betrieben

Tabelle 20: Angaben zu Mitarbeiterzahl und Zeitpunkt der Probennahme in den einzelnen Betrieben

Betrieb	Mitarbeiterzahl	Zeitpunkt der Probennahme			
		Produktion		Reinigung/Desinfektion	
		während	nach	vor	nach
A	< 10	+		+	
B	< 10		+		+
C	>10	+		+	
D	< 10		+		+
E	< 10		+		+
F	> 10	+		+	
G	< 10		+		+
H	< 10		+		+

LITERATURVERZEICHNIS

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

Comparative study of culture methods to detect *Yersinia enterocolitica* serogroup O3 on swine tongues

Zbl. Bakteriол., **272**: 306-312

ALEKSIC S. (1995)

Occurrence of *Y. enterocolitica* antigens O:3, O:9 and O:8 in different *Yersinia* species, their corresponding H antigens and origin

Contrib. Microbiol. Immunol., **13**: 89-92

ALEKSIC S., 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

Immun. Infekt., **18**: 178-185

ALEKSIC S., BOCKEMÜHL J. (1996)

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

Bundesgesundheitsblatt, **3**: 94-97

ALEKSIC S., BOCKEMÜHL J., LANGE F. (1986)

Studies on the serology of flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related *Yersinia* species

Zbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. (A), **261**: 299-310

ALEKSIC S., BOCKEMÜHL J., WUTHE H.H., ALEKSIC V. (1988)

Occurrence and clinical importance of the pathogenic serogroup O:5,27 of *Yersinia enterocolitica* in the Federal Republic of Germany and methods for its serological and bacteriological identification

Zbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. (A), **269**: 197-204

ANDERSEN J.K. (1988)

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

Int. J. Food Microbiol., **7**: 193-202

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

Identification of *Yersinia* spp. with the API 20E system

J. Clin. Microbiol., **25**: 2398-2399

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

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

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

BAUMGART J. (1993)

Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln

Behr's Verlag

BECKER H. (1991)

Yersinia enterocolitica – Vorkommen, Bedeutung und Nachweis

Gesellschaft Deutscher Chemiker GDCh – Fortbildungskurs

Lebensmittelmikrobiologie – Nachweis wesentlicher pathogener Keime

München 15.-16.Oktober 1991

BIN-KUN H., DE-SHENG X., HONG-BI O. SHI-XIANG Z., SLEE K.J. (1994)

Yersiniosis in sheep due to *Yersinia enterocolitica*

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

BLAHA T., BLAHA M.-L. (1995)

Qualitätssicherung in der Schweinefleischerzeugung

Verlag G. Fischer, Jena, Stuttgart

BOCKEMÜHL J. (1999)

Yersinia enterocolitica und *Yersinia pseudotuberculosis*

aus: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, S. 168-176

Behr's Verlag

BOER DE E. (1994)

Occurrence of *Yersinia* species in poultry products

Fleischwirtschaft, **74**: 287

BOER DE E. (1995)

Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods

Contr. Microbiol. Immunol., **13**: 71-73

BOER DE E., NOUWS J.F.M. (1991)

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

Int. J. Food Microbiol., **12**: 375-378

BOLLWAHN W. (1994)

Informationen zum EU-Projekt „alternative Fleischuntersuchung“

Dt. Tierärzteblatt, **42**: 1136-1138

BOTTONE E.J. (1997)

Yersinia enterocolitica: The Charisma Continues

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

BUCHER M. (2001)

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

Diss. med. vet., LMU München

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

Praevalenz von *Yersinia spp.* in Kälbern und Bullen

42. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, 25. – 28.09.2001

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

Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Puten

43. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, 24 – 27.09.2002

BÜLTE M., KLEIN G., REUTER G. (1991)

Pig slaughter – Is the meat contaminated by *Yersinia enterocolitica* strains pathogenic to man?

Fleischwirtsch., **72**: 1267-1270

CHIESA C., PACIFICO L., GIAMPIETRO R. (1993)

Identification of pathogenic serotypes of *Yersinia enterocolitica*

J. Clin. Microbiol., **31**: 2248-2250

CHRISTENSEN S.G. (1987)

Co-ordination of a nation-wide survey on the presence of *Yersinia enterocolitica* O:3 in the environment of butcher shops

Contr. Microbiol. Immunol., **9**: 26-29

CHRISTENSEN S.G. (1987a)

The *Yersinia enterocolitica* situation in Denmark

Contr. Microbiol. Immunol., **9**: 93-97

CORLETT D.A. (1987)

HACCP – Grundlagen der produkt- und prozessspezifischen Risikoanalyse, S.13-17

Behr's Verlag

COVER T.L., ABER R.C. (1989)

Yersinia enterocolitica

New Engl. J. Med., **321**: 16-24

DAVID H. (1994)

Tierärztliche alternative Fleischuntersuchungsprogramme bei Mastschweinen

Fleischwirtsch., **74**: 1281-1285

DEDIE K., BOCKEMÜHL J., KÜHN H., VOLKMER K.-J., WEINKE T. (1993)

Yersiniosen mit enteritischem Verlauf beim Mensch

Lehrbuch über Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch, Epidemiologie, Pathologie, Klinik, Diagnostik und Bekämpfung, S. 377-398

Ferdinand Enke Verlag Stuttgart

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

Characterization of the urease-encoding gene complex of *Yersinia enterocolitica*

Gene, **145**: 25-32

DI GENARO M.S., MUNOZ E., AGUILERA C., DE GUZMAN A.M.S. (2000)

Yersinia enterocolitica O:8 and O:5 lipopolysaccharide arthrogenicity in hamsters

Rheumat., **39**: 73-78

DOYLE M.P., HUGDAHL M.B., TAYLOR L.S. (1981)

Isolation of Virulent *Yersinia enterocolitoca* from porcine tongues

Appl. Environ. Microbiol., **42**:661-666

DUDLEY M.V., SHOTTS E.B. (1979)

Medium for iaolation of *Yersinia enterocolitica*

J. Clin. Microbiol., **10**: 180-183

EISGRUBER H., STOLLE A. (1994)

Zur Einschätzung des Salmonellenrisikos bei Fleisch

Amtstierärztl. Dienst und Lebensmittelkontrolle, **1**: 28-34

FANTASIA M., MINGRONE G.M., MARTINI A., BOSCATO C., CROTTI D. (1993)
Characterisation of *Yersinia* species isolated from a kennel and from cattle and pig farms

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

FEHLHABER K., JANETSCHKE P. (1992)

Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene

Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart

FREDRIKSSON-AHOMAA M., BJÖRKROTH J., HIELM S., KORKEALA H. (2000a)

Prevalence and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig tonsils from different slaughterhouses

Food Microbiol., **17**: 93-101

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

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, S. 116-122, 25. – 28.09.2000

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

High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on pig offal: a slaughtering technique problem

Syst. Appl. Microbiol., **24**: 457-463

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

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

Epidemiol. Infect., **127**: 37-47

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

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

J. Food Prot., **62**: 123-127

FREDRIKSSON-AHOMAA M., KORTE T., KORKEALA H. (2000c)

Contamination of carcasses, offals and the environment with *yadA*-positive *Yersinia enterocolitica* in a pig slaughterhouse

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

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

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

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

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

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

Arch. Lebensmittelhyg., **52**: 66-68

FUKUSHIMA H., GOMYODA M. (1986)

Inhibition of *Yersinia enterocolitica* Serotyp O:3 by natural microflora of pork

Appl. Environ. Microbiol., **51**: 990-994

FUKUSHIMA H. (1987a)

New selective agar medium for isolation of virulent *Yersinia enterocolitica*

J. Clin. Microbiol., **25**: 1068-1073

FUKUSHIMA H., HOSHINA K., NAKAMURA R., ITO Y. (1987)

Vorkommen von *Yersinia* spp. in rohem Rind-, Schweine- und Hühnerfleisch

Zbl. Bakt., 1. Abt. Orig. B, **84**: 50-59

FUKUSHIMA H., MARYAMA K., OMORI I., ITO K., IORIHARA M. (1989)

Role of the contaminated skin of pigs in fecal *Yersinia* contamination of pig carcasses at slaughter

Fleischwirtsch., **69**: 369-372

FUKUSHIMA H., MARYAMA K., OMORI I., ITO K., IORIHARA M. (1990)

Kontamination von Schweinen mit *Yersinia* im Schlachthaus

Fleischwirtsch., **70**: 1330-1333

FUKUSHIMA H., HOSHINA K., ITOGAWA 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

GARIN-BASTUJII B., HUMMEL N., GERBIER G., CAU C., POULLOT R., DA COSTA M., FONTAINE J.-J. (1999)

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

Vet. Microbiol., **66**: 223-233

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

Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* lacking classical virulence markers

Infection and Immunity, **66**: 1113-1120

GREIL B. (2001)

Vergleichende Untersuchung zur selektiven Erfassung von Salmonellen bei Schlachtschweinen unter besonderer Berücksichtigung des Salmonellen-Antikörperstatus in Schweinebeständen

Diss. med. vet., LMU München

HALLMANN L. (1953)

Bakteriologische Nährmedien – Ausgewählte Nährbodenrezepturen für das medizinisch-bakteriologische Laboratorium

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3. Auflage

HANNA M.O., STEWART J.C., CARPENTER Z.L., SMITH G.C. (1977)

Development of *Yersinia enterocolitica*-like organisms in pure and mixed cultures on different Bismuth Sulfite Agars

J. Food Prot., **40**: 676-677

HARTUNG M. (1996)

Infektionsbelastung durch Salmonellen aus dem Tierbereich

Arbeitsunterlagen zum Seminar „Lebensmittelsicherheit“

BgVV, Berlin 25.09-27.09.1996, S. 1-4

HEESEMANN J. (1990)

Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische Methoden

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

HEESEMANN J. (1994)

Die Gattung *Yersinia* – Yersiniosen

In: Brandis H., Eggers H.J, Köhler W., Pulverer G. (Hrsg.)

Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie

Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York, S. 313-317

HEESEMANN J., KARCH H. (1995)

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

Internist, **36**: 102-105

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

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

Arch. Exper. Vet. med., **38**: 729-734

HENTSCHKE A. (2002)

Vortrag, Arbeitskreis „Gesunde Tiere – gesunde Nahrung“, Cloppenburg, 14.05.2002

HIGHSMITH A.K., FEELEY P., SKALIY P., WELLS J.G., WOOD B.T. (1977)

Isolation of *Yersinia enterocolitica* from well water and growth in distilled water

Appl. Environ. Microbiol., **34**: 745-750

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

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

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

HOLMES R.J. (2002)

Studie zur Evaluierung des Umsetzungsgrades von Eigenkontrollen in registrierten Metzgereibetrieben eines oberfränkischen Landkreises unter besonderer Berücksichtigung von Hygieneschulung und praxisnahen Nachweismethoden

Diss. med.vet., LMU München

HOOGKAMP-KORSTANJE J.A.A., STOLK-ENGELAAR V.M.M. (1995)

Yersinia enterocolitica infection in children

Pediatr. Infect. Dis. J., **14**: 771-775

HURVELL B. (1981)

Zoonotic *Y. enterocolitica* infection: Host range, clinical manifestation and transmission between animals and man

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

CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, S. 145-159

KAPPERUD G. (1981)

Survey on the reservoirs of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria in Scandinavia

Acta pathol. Microbiol. Scand., Sect. B, **89**: 29-35

KAPPERUD G. (1991)

Yersinia enterocolitica in food hygiene

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

KARIB H., SEEGER H. (1994)

Vorkommen von Yersinien- und Campylobacter-Arten in Lebensmitteln

Fleischwirtschaft, **74**: 1104-1106

KERBER J. (1997)

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

Diss. med. vet., FU Berlin

KHALAFALLA F.A., YASSIEN N.A., IBRAHIM H.M. (1995)

Yersinia enterocolitica in Fleischfertiggerichten

Fleischwirtsch., **75**: 508

KHARE S.S., KAMAT A.S., DOCTOR T.R., NAIR, P.M. (1996)

Incidence of *Yersinia enterocolitica* and related species in some fish, meat and meat products in India

J. Sci. Food Agric., **72**: 187-195

KLEEMANN J., BERGANN T. (1994)

Yersinia spp. in frischer Rohwurst

Untersuchungen zum Vorkommen und zur Charakterisierung der *Yersinia enterocolitica*-Isolate

Fleischwirtsch., **74**: 1101-1103

KLEER J., HIDEBRANDT G. (2002)

Bedeutung der Predictive Microbiology zur Risikominimierung bei der Lebensmittelherstellung

Bundesgesundheitsbl., **45**: 474-483

KOLB H. (1993)

Lebensmittelbedingte Erkrankungen im Spannungsfeld des Hygienebewusstseins

AID Verbraucherdienst, **38**: 47-50

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

Enterale Yersiniosen

Lehrbuch über Zoonosen, S. 89-92

Deutscher Ärzte Verlag, Köln, 2. Auflage

KRUG W., REHM N. (1983)

Nutzen – Kosten – Analyse der Salmonellenbekämpfung

Schriftenreihe des BMJFG, Bd. 131 (731), Verl. W. Kohlhammer

Stuttgart 1983

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

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

Vet. Microbiol., **36**: 205-214

LEE W.H. (1977)

An assessment of *Yersinia enterocolitica* and its presence in foods

J. Food Prot., **40**: 486-489

LÖTSCH G. (1986)

Untersuchungen zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* bei Speisefischen und ausgewählten Fischprodukten

Mh. Vet. Med., **41**: 496-498

MEYER A.H. (1998)

Lebensmittelrecht: Leitfaden für Studium und Praxis

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

MOLLARET H., BROSSOLLET J. (1987)

Alexandre Yersin – der Mann der die Pest besiegte

Benzinger Verlag AG Zürich

NAKTIN J., BEAVIS K.G. (1999)

Yersinia enterocolitica and *Yersinia pseudotuberculosis*

Clin. Lab. Med., **19**: 523-536

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

Epizootiologie der *Yersinia enterocolitica* in einem Schweinebestand

Mh. Vet. Med., **40**: 366-370

NATTERMANN H., DIESS I., HORSCH F., JUNG G., KIESWALTER J., RINKA E.
(1985b)

Die Bedeutung der *Yersinia enterocolitica*-Infektion für die Veterinärmedizin

Dt. Gesundh.-Wesen, **37**: 1993-1997

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., LASSEN J., SKJERVE E. (1991)

Yersinia enterocolitica O:3 antibodies in slaughterhouse employees, veterinarians
and military recruits

Contr. Microbiol. Immunol., **12**: 32-39

NESBAKKEN T., NERBRINK E., RØTTERUD O. J., BORCH E. (1994)

Reduction of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria spp.* on pig carcasses by enclosure of the rectum during slaughter

Int. J. Food Microbiol., **23**: 197-208

NEUBAUER (2000)

A miniaturised semiautomated system for the identification of *Yersinia* species within genus *Yersinia*

Clin. Lab., **46**: 561-567

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

Yersinia enterocolitica-Infektionen: 1. Bedeutung bei Tieren

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

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

Yersinia enterocolitica-Infektionen: 2. Bedeutung bei Menschen

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., **114**: 81-87

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

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

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

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

Public health and pork products: regional perspectives of Denmark

Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., **16**: 513-524

NOPPINGER N., STEPHAN R., UNTERMANN F. (2000)

Wachstumsverhalten von pathogenen und apathogenen *Yersinia enterocolitica* Stämmen in Bezug auf unterschiedliche extrinsic und intrinsic Faktoren

41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“, Teil II Poster, S. 639-642

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 case-control study

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

PADHILA M.R. et al. (2001)

Isolation of pathogenic bacteria in pasteurized type C milk sold in Recife City, Pernambuco, Brazil

Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **34**: 167-171

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

Yersinia species isolated from sheep with enterocolitis

Austr. Vet. J., **68**: 108-110

PRÄNDL O., FISCHER A., SCHMIDHOFER TH., SINELL H.J. (1988)

Fleisch – Technologie und Hygiene der Gewinnung und Verarbeitung

Verlag Eugen Ulmer

PULLELA S., FERNANDES C.F., FLICK G.J., LIBEY G.S., SMITH S.A., COALE C.W. (1998)

Indicative and pathogenic microbiological quality of aquacultured finfish grown in different production systems

J. Food Protect. **61**: 205-210

ROBERTS R.J. (1985)

Grundlagen der Fischpathologie, S. 184

Verlag Paul Parey

ROLLE/MAYR (1993)

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, S. 628-631

6. Auflage, Enke-Verlag

SAARI T.N., JANSEN G.P. (1979)

Waterborne *Yersinia enterocolitica* in the midwest United States

Contr. Microbiol. Immunol., **5**: 185-195

SCHIEMANN D.A. (1982)

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

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

SCHIEMANN D.A. (1989)

Yersinia enterocolitica und *Yersinia pseudotuberculosis*

In: Doyle M.P. (Hrsg.), Foodborne bacterial pathogens, S. 601-672

Marcel Dekker, New York

SCHÜTZ F. (1991)

Hygienekonzept für Schlachthöfe

Verl. F. Enke, Stuttgart, 1991

SHENOY K., MURANO E.A., OLSON D.G. (1998)

Survival of heat-shocked *Yersinia enterocolitica* after irradiation in ground pork

Int. J. Food Microbiol., **39**: 133-137

SINELL H.J. (1992)

Einführung in die Lebensmittelhygiene

Verlag Paul Parey

SINELL H.J. (1997)

aus: Handbuch der Fleisch und Fleischwaren, Kap. 7

Wirth F., Barciaga J., Krell U. M. (Hrsg)

Behr's Verlag

SKEJERVE E., LIUM B., NIELSON B., NESBAKKEN T. (1998)

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

Int. J. Food Microbiol., **45**: 195-203

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

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

Austr. Vet. J., **67**: 396-398

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

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

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

SOCKETT P.N. (1991)

The economic implications of human *salmonella* infection

J. Appl. Bacteriol., **71**: 289-295

SOLTESZ L., SCHALEN C., MARDH P.-A. (1980)

An effective, selective medium for *Yersinia enterocolitica* containing sodium oxalate

Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, **88**: 11-16

STENGEL G. (1986)

Zur Diagnostik und Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Wasser

J. Vet. Med. B, **33**: 83-92

STEFFL M. (1998)

Bekämpfungskonzepte zur Reduzierung der Salmonellenbelastung in Rohprodukten aus Schweinefleisch

Diss. med. vet., München

STOLLE A. (1989)

Die hygienischen Rahmenbedingungen während des Schlachtvorgangs

Der praktische Tierarzt, **12**: 5-15

STOLLE A. (1995)

Qualitätsmanagement in der Fleischwirtschaft – Praktische Erfahrungen beim Aufbau von QS-Systemen

Vortrag , BPT, 17.11.1995, Würzburg

STOLLE A., STOCK K. (1999)

Fleischqualitätssicherung 2000 – aus der Sicht der Wissenschaft

Vortrag, Rheda 1999 Forum, Reethus, Rheda – Wiedenbrück, 26.05.1999

STOLLE A. (2002)

Privatisierung der Lebensmittelüberwachung. Fluch oder Segen?

Vortrag, Olper Hygienetag, Olpe, 11.04.2002

STOLLE A., BABEL I. (2002)

QS – Kritische Betrachtung – Höhere Akzeptanz

Vortrag, Arbeitskreis „Gesunde Tiere – gesunde Nahrung“, Cloppenburg, 14.05.2002

STOLLE A., MÄRTLBAUER E. (1995)

Ein altes und neues Problem in der Lebensmittelhygiene – Bemerkungen zu Salmonellen und enterohämorrhagischen *E. coli*

Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, **2**: 275-281

STOLLE A., SCHALCH B. (1993)

Anmerkungen zur Lebensmittelbestrahlung

Die Fleischerei, **1**: 41-45

STOLLE A., STOCK K. (1999)

Microbial reduction of poultry carcasses by addition on food grade acids

Vortrag Working Group “Inhibition growth of carcass microflora” of the Food Safety and Inspection Service of the USDA, 23.02.1999

Washington D.C, USA

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

Yersinia enterocolitica infections and pork: The missing link

The Lancet, **1**: 1129-1132

TERNES W., QUINT A.W. (1994)

Lebensmittelrecht für Lebensmitteltechnologien

Behr's Verlag GmbH, Hamburg

THIBODEAU V., FROST E. H., CHENIER 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

TOORA S., BUDU-AMOAKO A., ABLETT R.F., SMITH J. (1992)

Effect of high-temperature short-time pasteurisation, freezing and thawing and constant freezing, on survival of *Yersinia enterocolitica* in milk

J. Food Prot., **55**: 803-805

UNTERMANN F., PAULE J., STEPHAN R. (1996)

35 Jahre HACCP-System

Fleischwirtsch., **76**: 589-594

URAZ G., YUCEL N. (1999)

The isolation of certain pathogen micro-organisms from raw milk

Cent. Eur. J. Public Health, **7**: 145-148

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

Evaluation of a 5'-nuclease (TagMan) Assay for the detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica* in raw meat and tofu samples

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

WAUTERS G. (1973)

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

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

WAUTERS G. (1981)

Yersinia enterocolitica

In: Bottone E.J.

CRC Press Inc., Boca Raton, Florida

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

Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*

Contr. 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.

WEBER A. (1982)

Zur Isolierung von *Yersinia enterocolitica* aus tierischem Untersuchungsmaterial und Identifizierung humanpathogener Serotypen

Fortschr. Vet.-med., **35**: 210-214

WEBER A., LEMBKE C. (1981)

Untersuchungen zum Vorkommen von humanpathogenen *Yersinia enterocolitica* bei Katzen

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., **94**: 325-327

WUTHE H.-H., ALEKSIC S. (1997)

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

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., **110**: 176-177

SONSTIGE LITERATURQUELLEN

DRAFT INTERNATIONAL STANDARD (1994)

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

International Organization for Standardization

N.N. (1990)

Pschyrembel – Klinisches Wörterbuch

256. Auflage, De Gruyter

N.N. (1991)

WHO

Lebensmittelsicherheit – weltweit ein Problem für das öffentliche Gesundheitswesen

Bundesgesundheitsblatt, **34**: 132-133

N.N. (1993)

Richtlinie 93/43/EWG des Rates vom 14 Juni 1993 über Lebensmittelhygiene

Amtsblatt Nr. L 175 vom 19/07/1993, S. 1-11

N.N. (1997)

Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfgegenständen (Lebensmittel – und Bedarfsgegenständegesetz – LMBG)

In der Fassung der Bekanntmachung vom 9. September 1997 (BGBl. I S. 2296), zuletzt geändert durch die Art. 42 Siebente ZuständigkeitsanpassungsVO vom 29.10.2001 (BGBl. I, S. 2785)

N.N. (1997a)

Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln

Zusatzstoff-Zulassungsverordnung – ZZuV

Vom 22 Dezember 1981, (BGBl. I S. 1625), zuletzt geändert durch Art. 2 Dritte Verordnung zur Änderung Rückstands-HöchstmengenVO vom 26.09.1997 (BGBl. I S. 2366)

N.N. (2001)

Verordnung über die hygienischen Anforderungen und amtliche Untersuchungen beim Verkehr mit Fleisch

(Fleischhygiene-Verordnung – FIHV)

In der Fassung der Bekanntmachung vom 29. Juni 2001 (BGBl. I S. 1366), zuletzt geändert durch Art. 2 und 2a Dritte Fleischhygiene-ÄndVO vom 14.03.2002 (BGBl. I S. 1081)

N.N. (2001a)

Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen

Infektionsschutzgesetz (Infektionsschutzgesetz – IfSG)

Vom 01. Januar 2001 (BGBl. I S. 1045, im Gesetz zur Neuordnung seuchenrechtlicher Vorschriften (SeuchRNeuG))

N.N. (2001b)

Rheuma-online.de

Yersinien-induzierte Arthritis

<http://rheuma-online.de/a-z/yersinien-induzierte-arthritis.html>

N.N (2002)

Ausländisches Lebensmittelrecht – Codex Alimentarius

Band 1, Textteil A

Verfahrenshandbuch, horizontale Codex Standards, Leitsätze und individuelle Standards, Stand 01.07.2002

Centrale Marketinggesellschaft der deutschen Agrarwirtschaft mbH, Bonn (Hrsg.)

Behr's Verlag

N.N. (2002a)

ROBERT-KOCH-INSTITUT

Steckbrief seltener und „importierter“ Bakterien

www.rki.de/INFEKT/STECKBRF/STBR_B/BAKTERIE.HTM?/INFEKT/STECKBRF/STBR_B/YERSI:HTM&1

N.N. (2002b)

QS – Qualität und Sicherheit GmbH

www.q-s.info/

NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS (1996)

Yersinia enterocolitica – Detection in foods

Nordic committee on food analysis, 117, 3rd edition

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Biotypisierung von <i>Y. enterocolitica</i> -Stämmen	6
Tabelle 2: O- und H-Antigene, Biotypzugehörigkeit, Herkunft und geographische Verbreitung humanpathogener <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme	8
Tabelle 3: Plasmid- und chromosomal-kodierte Pathogenitätsfaktoren in Abhängigkeit von der Temperatur	11
Tabelle 4: Zusammenstellung verschiedener Anreicherungsmedien	13
Tabelle 5: Verschiedene Selektivnährmedien, deren Bebrütungstemperatur und -dauer	15
Tabelle 6: Reaktionsergebnisse diagnostischer Tests von pathogenen <i>Y. enterocolitica</i> gemäß ISO 10273	19
Tabelle 7: <i>Y. enterocolitica</i> bedingte Krankheitsausbrüche aufgliedert nach Land, Monat, Anzahl der Fälle, vermuteter Ursache und Serotyp	24
Tabelle 8: Anzahl der überlebenden <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme bei verschiedenen Erhitzungsbedingungen (n = 79)	38
Tabelle 9: Probenzahlen und Entnahmeorte der Umgebungsproben und des tierischen Probenmaterials in den einzelnen Betrieben	48
Tabelle 10: Beprobtes, ortsveränderliches Arbeitsmaterial	49
Tabelle 11: Beprobtes, ortsunveränderliches Arbeitsmaterial	50
Tabelle 12: Beprobte Innereien pro Betrieb	51
Tabelle 13: Tierisches Probenmaterial	52

Tabelle 14: Ablesetabelle des API 20E	60
Tabelle 15: Biotypisierungstests für <i>Y. enterocolitica</i>	61
Tabelle 16: Ergebnisse der Probennahme	65
Tabelle 17: Ergebnisse der verschiedenen Nachweisverfahren für gefundene pathogene <i>Y. enterocolitica</i>	71
Tabelle 18: Ergebnisse der Testung auf chromosomal-kodierte Eigenschaften	74
Tabelle 19: Ergebnisse der Wischtupferproben	101
Tabelle 20: Angaben zu Mitarbeiterzahl und Zeitpunkt der Probennahme in den einzelnen Betrieben	103

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Internationales Standardverfahren (ISO 10273) zum Nachweis pathogener <i>Y. enterocolitica</i>	18
Abbildung 2: Isolierung von <i>Y. enterocolitica</i>	55
Abbildung 3: Identifizierung von <i>Y. enterocolitica</i>	58
Abbildung 4: Nachweis pathogener <i>Y. enterocolitica</i> aus tierischem Probenmaterial	67
Abbildung 5: Nachweishäufigkeit von pathogenen <i>Y. enterocolitica</i> aus rohem Schweinefleisch und Schlachtnebenprodukten	68
Abbildung 6: Nachweisrate von pathogenen <i>Y. enterocolitica</i> in Abhängigkeit von der Nachweismethode und deren Kombination	72

DANKSAGUNG

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

Mein ganz besonderer Dank gilt **Frau Dr. M. Fredriksson-Ahomaa** für die stets fachkundige, hilfsbereite Betreuung, die aufmunternden Worte und die manchmal „mystische“ Zusammenarbeit.

Herrn Dr. M. Bucher danke ich für die wertvolle Kritik, die kollegiale Zusammenarbeit und die fachbezogene Durchsicht meiner Arbeit.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei **Frau Dr. B. Sperner** für die Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit.

Für die freundliche und nette Zusammenarbeit im Labor möchte ich **Frau H. Dietz, Frau A. Fendel, Frau I. Fitzek, Frau S. Holzmann, Frau C. Kerschbamer** und **Frau U. Scheffler** ganz herzlich danken.

Ebenso möchte ich allen anderen **Mitarbeitern des Institutes** meinen Dank aussprechen.

Ich danke allen meinen Freunden, insbesondere **Frau Judith Schöbi** für die Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit.

Zuletzt möchte ich meinen **Eltern** und meiner **Schwester** danken, die mich während meines Studiums und der Erstellung dieser Arbeit stets unterstützt und begleitet haben.

LEBENS LAUF

Name **Christiane Ulrike Koch**
Geburtsdatum 5. Januar 1973
Geburtsort Geislingen/Steige
Eltern Dipl.-Ing. Hans-Jörg Koch
Ursula Koch, geb. Braun
Geschwister Nicole Koch

Ausbildung

1979 – 1983 Besuch der Grundschule in Geislingen/Steige
1983 – 1992 Besuch des Helfenstein-Gymnasiums in Geislingen/Steige
Abschluss mit dem Abitur
10/1992 – 10/1995 Ausbildung zur Krankenschwester
Abschluss mit dem Titel Krankenschwester
11/1995 – 01/2001 Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München
02/2001 Approbation als Tierärztin
Beginn der Doktorarbeit am Institut für Hygiene und
Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München
seit 01/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Hygiene
und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München