

**Nachweis, Prävalenz und
Charakterisierung von
Yersinia pseudotuberculosis aus
Schwarzwild im Nordosten
Deutschlands**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Marie Reinhardt

aus Schwedt/ Oder

2018

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2015 bis September 2018 am Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin-Marienfelde unter der Leitung von Prof. Dr. Karsten Nöckler angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Karsten Nöckler
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am: 07. 03. 2019

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	3
II	Abkürzungsverzeichnis	9
III	Abbildungsverzeichnis	17
IV	Tabellenverzeichnis	20
1	Einleitung	24
2	Literaturübersicht	26
2.1	Die Gattung <i>Yersinia</i> - Systematik und Eigenschaften.....	26
2.2	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	27
2.3	Yersiniose.....	28
2.3.1	Krankheitsverlauf beim Menschen.....	29
2.3.1.1	Enterale Verlaufsform.....	29
2.3.1.2	Septische Verläufe und Abzessbildung.....	30
2.3.1.3	Postinfektiöse Folgeerkrankungen.....	31
2.3.2	Krankheitsverlauf bei Tieren.....	32
2.4	Pathogenität.....	33
2.4.1	Plasmidkodierte Virulenzfaktoren.....	33
2.4.2	Chromosomalkodierte Virulenzfaktoren.....	35
2.5	Epidemiologie.....	37
2.5.1	Vorkommen beim Menschen.....	38
2.5.2	Vorkommen beim Tier.....	40
2.5.3	Vorkommen in Lebensmitteln und Lebensmittelinfectionsausbrüche.....	42
2.6	Wildbret als Lebensmittel.....	45
2.6.1	Mikrobiologischer Status von Wildfleisch.....	47

2.7	Diagnostik.....	48
2.7.1	Kulturelle Nachweismethoden.....	49
2.7.2	Molekularbiologische Nachweismethoden.....	50
2.7.2.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)/ Real-Time-PCR.....	51
2.7.2.2	MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization — Time of Flight Mass Spectrometry).....	52
2.7.3	Biochemische und serologische Identifizierung.....	54
2.7.4	Prüfung auf Pathogenität.....	56
3	Ziel der Arbeit.....	58
4	Material und Methoden.....	59
4.1	Material.....	59
4.1.1	Bakterienstämme.....	59
4.1.2	Probenmaterial.....	60
4.1.3	Enzyme.....	60
4.1.4	Reaktionskits, Antibiotika-Testkits.....	61
4.1.5	Genomsequenzen.....	61
4.1.6	DNA-Längenstandards, Nukleotide.....	62
4.1.7	Chemikalien.....	62
4.1.8	Primer.....	63
4.1.9	Medien.....	68
4.1.10	Lösungen und Puffer.....	69
4.1.11	Geräte.....	70
4.1.12	Software.....	71
4.2	Methoden.....	72

4.2.1	Untersuchung einzelner Kultivierungsschritte zur Optimierung der Isolierung von <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> aus tierischem Probenmaterial.....	72
4.2.1.1	Anreicherungsmedien für die Kälteanreicherung.....	74
4.2.1.2	Inkubationszeit/ Vorinkubation.....	75
4.2.1.3	Festmedium.....	75
4.2.1.4	KOH-Behandlung.....	76
4.2.1.5	Praktische Untersuchungen mit künstlich kontaminierten Matrices.....	77
4.2.2	Prävalenzuntersuchung.....	78
4.2.2.1	Probenakquisition.....	78
4.2.2.1.1	Probengebiet.....	78
4.2.2.1.2	Durchführung der Probennahme.....	79
4.2.2.1.3	Probenaufarbeitung/ Stamm-Isolierung.....	81
4.2.2.1.4	Stamm-Haltung und -Rekultivierung.....	81
4.2.2.2	Identifizierung der gewonnenen Isolate.....	82
4.2.2.2.1	MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization — Time of Flight Mass Spectrometry).....	82
4.2.2.2.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	83
4.2.2.2.3	Biochemische Identifizierung der Isolate.....	85
4.2.2.3	Charakterisierung der Stämme.....	87
4.2.2.3.1	Bestimmung der Kolonie- und Zellmorphologie.....	87
4.2.2.3.2	Biochemische Typisierung.....	87
4.2.2.3.3	Serotypisierung.....	88
4.2.2.3.4	Untersuchung von Antibiotika-Resistenzen....	94

4.2.2.3.5	Bestimmung des Multi-Lokus-Sequenz-Typs (MLST).....	95
4.2.2.3.6	Pathogenitätsnachweis.....	95
4.2.2.3.6.1	Mikrobiologische Untersuchungen.....	95
4.2.2.3.6.2	Molekularbiologische Untersuchungen.....	96
4.2.2.3.6.2.1	PCR.....	96
4.2.2.3.6.2.2	Gesamtgenom-Sequenzierung/ In silico Virulenzgen-Untersuchungen.....	98
4.2.2.4	Phylogenetische Untersuchungen.....	99
4.2.2.4.1	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).....	99
4.2.2.4.2	Stammbaumerstellung anhand von Einzelnukleotid-Polymorphismen.....	100
5	Ergebnisse	102
5.1	Entwicklung eines Verfahrens zur Isolierung von <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> aus tierischem Probenmaterial.....	102
5.1.1	Vergleich der Medien für die Kälteanreicherung.....	102
5.1.2	Inkubationszeit/ Vorinkubation.....	103
5.1.3	Modifizierung des CIN-Agar-Mediums (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar).....	106
5.1.4	KOH-Behandlung.....	106
5.1.5	Sensitivitätsprüfung der wzz-PCR.....	108
5.2	Modifiziertes Verfahren zur Isolierung von <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> aus tierischem Probenmaterial.....	109
5.3	Testung des modifizierten Verfahrens mit künstlich kontaminierten Matrices.....	112
5.4	Untersuchung der Prävalenz von <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> in Schwarzwild im Nordosten Deutschlands.....	114

5.4.1	Probenakquise.....	114
5.4.2	Prävalenz von <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> im Schwarzwild.....	116
5.5	Identifizierung der gewonnenen Isolate.....	118
5.5.1	Identifizierung durch wzz-PCR.....	118
5.5.2	Identifizierung durch MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	119
5.5.3	Biochemische Identifizierung.....	121
5.6	Charakterisierung der gewonnenen Isolate....	123
5.6.1	Kolonie- und Zellmorphologie der gewonnenen Isolate.....	123
5.6.2	Biotyp der gewonnenen Isolate.....	126
5.6.3	Serotyp der gewonnenen Isolate.....	127
5.6.4	Antibiotika-Resistenzen der gewonnenen Isolate.....	130
5.6.5	Multi-Lokus-Sequenz-Typus (MLST) der gewonnenen Isolate.....	133
5.6.6	Pathogenitätspotenzial der gewonnenen Isolate.....	133
5.6.6.1	Das Virulenzplasmid pYV.....	134
5.6.6.2	Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren.....	136
5.7	Phylogenetische Beziehung zwischen den gewonnenen Isolate.....	140
6	Diskussion.....	146
6.1	Entwicklung eines Verfahrens zur Isolierung von <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> aus tierischem Probenmaterial.....	146
6.2	Prävalenzuntersuchung von <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> aus Schwarzwild im Nordosten Deutschlands.....	151

6.3	Charakterisierung der gewonnenen <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> -Isolate.....	156
7	Zusammenfassung.....	165
8	Summary.....	167
9	Literaturverzeichnis.....	169
V	Danksagung.....	187
VI	Veröffentlichungen.....	188
VII	Eidesstattliche Erklärung.....	190

II Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad	Lat.: zu, z.B. zu einem Liter auffüllen
Ail	Attachment and Invasion Locus, Membranprotein
<i>ail</i>	Gen, welches für das Membranprotein Ail kodiert
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bidest.	Bidestillata (lat.: zweifach destilliert)
BJagdG	Bundesjagdgesetz
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
BVDF	Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie e.V.
ca.	circa
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (engl.: Zentren für Krankheitskontrolle und Prävention)

Abkürzungsverzeichnis

CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
cm	Zentimeter
CR-MOX	Congo red-magnesium oxalate (engl.: Kongorot- Magnesium-Oxalat)
d	Days (engl.: Tage)
DIN	Deutsches Institut für Normung
DJV	Deutscher Jagdverband
DNA	Deoxyribonucleic acid (engl.: Desoxyribonukleinsäure)
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control (engl.: Europäisches Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	European Food Safety Authority (engl.: Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit)
EN	Europäische Norm
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae, et alia</i> (lat.: und andere)
etc.	<i>et cetera</i> (lat.: die Übrigen)

Abkürzungsverzeichnis

EU	Europäische Union
g	Gramm
Ha	Hektar
HLA	Histokompatibilitätsantigen
HPI	High-Pathogenicity Island (engl.: Hochpathogenitätsinsel), Cluster chromosomaler Gene für Eisenaufnahme
IfSG	Infektionsschutzgesetz
<i>in vitro</i>	Lat.: im Glas
<i>int</i>	Gen, welches für Integrase innerhalb der Hochpathogenitätsinsel kodiert
<i>inv</i>	Gen, welches für Membranprotein Invasin kodiert
<i>irp1</i>	Gen, welches für Protein kodiert, welches an Yersiniabactin-Synthese beteiligt ist
<i>irp2</i>	Gen, welches für Protein kodiert, welches an Yersiniabactin-Synthese beteiligt ist
<i>IS100</i>	Gen, welches für flankierenden Insertionselemente innerhalb der Hochpathogenitätsinsel kodiert

Abkürzungsverzeichnis

ISO	International Organization for Standardization
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
KBE	Koloniebildende Einheit
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter
LB	Lysogeny-Broth
Lcr	Low calcium response
<i>lcrF</i>	Gen, welches für Transkriptionsaktivator LcrF kodiert
lt.	laut
M	Molar
mM	Millimolar
m/z	Masse/ Ladung

MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization — Time of Flight Mass Spectrometry (engl.: Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung mit Flugzeitanalyse)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mio.	Million
ml	Milliliter
MLSA	Multilocus Sequenzanalysen
mm	Millimeter
MRB	Modifizierte-Rappaport-Bouillon
M-Zellen	Microfold cells, Epithelzellen mit vielen kleinen Zellfalten
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
O	Oligosaccharid
o. g.	oben genannt

Abkürzungsverzeichnis

PCR	Polymerase-Chain-Reaction (engl.: Polymerase-Kettenreaktion)
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
<i>pil</i>	Gen, welches für Pilus-Struktur kodiert
PK	Positivkontrolle
pmol	Picomol
<i>psn</i>	Gen, welches für Yersiniabactin-Außenmembran-Rezeptor kodiert
pYV	Virulenzplasmid, „Plasmid für <i>Yersinia</i> Virulenz“
RKI	Robert Koch-Institut
rpm	Maßeinheit, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (engl.: Einzelnukleotid-Polymorphismus)

Abkürzungsverzeichnis

<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i> (lat.: mehrere, nicht im Einzelnen zu nennende Arten)
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
u. a.	unter anderem
USA	United States of America (engl.: Vereinigte Staaten von Amerika)
V	Volt
<i>virF</i>	Gen, welches für Transkriptionsaktivator VirF kodiert
<i>wzz</i>	Gen, welches für O-antigen-Kettenlängen-Determinator kodiert
Y.	<i>Yersinia</i>
YadA	Außenmembranprotein „ <i>Yersinia</i> Adhesin A“

<i>yadA</i>	Gen, welches für <i>Yersinia</i> Adhesin A kodiert
<i>ybtP-ybtQ</i>	Genbereich, welcher für Proteine kodiert, die am Transport von Yersiniabactin über Cytoplasmamembran beteiligt sind
<i>ybtX-ybtS</i>	Genbereich, welcher für Proteine kodiert, die an der Yersiniabactin-abhängigen Zinkaufnahme beteiligt sind
Yop	<i>Yersinia</i> outer membrane protein (engl.: <i>Yersinia</i> -Außenmembranproteine)
YPM	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> -derived mitogen
<i>ypm</i>	Gene, welche für das <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> -derived mitogen kodieren
<i>yptE</i>	Gen, welches für Protein kodiert, das an einer vollständigen Funktionsweise der Hochpathogenitätsinsel beteiligt ist
Ysc	<i>Yersinia</i> -Sekretionssystem
z. B.	zum Beispiel
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Wirkmechanismus des Yop-Virulons von <i>Y. pseudotuberculosis</i>	35
Abbildung 2	Gemeldete Yersiniosen in Deutschland, 2001-2016.....	40
Abbildung 3	Vergleich dreier Massenspektren der pathogenen Yersinien.....	54
Abbildung 4	Verfahren zum kulturellen Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> nach DIN EN ISO 10273:2017-08.	73
Abbildung 5	Übersichtskarte der Probeneinzugsgebiete.....	79
Abbildung 6	Probennahme.....	80
Abbildung 7	Vergleich der Anreicherungsmedien für die Kälteanreicherung.....	103
Abbildung 8	Vergleich von Inkubationszeiten für die Kälteanreicherung.....	104
Abbildung 9	Wirkung einer Vorinkubation auf das Wachstum von <i>Y. pseudotuberculosis</i>	105
Abbildung 10	Effekt einer KOH-Behandlung auf <i>Y. pseudotuberculosis</i>	108

Abbildung 11	Agarosegel zur Sensitivitätsprüfung der <i>wzz</i> -PCR...	109
Abbildung 12	Modifiziertes Verfahrensschema zur Isolierung von <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> aus tierischem Probenmaterial in Anlehnung an die DIN EN ISO 10273.....	111
Abbildung 13	Strecken zusammensetzung beim Schwarzwild.....	116
Abbildung 14	Agarosegel zur Identifizierung der gewonnenen Isolate anhand der <i>wzz</i> -PCR.....	119
Abbildung 15	Zellmorphologie der <i>Y. pseudotuberculosis</i> - Isolate	123
Abbildung 16	Koloniemorphologien der <i>Y. pseudotuberculosis</i> - Isolate aus Wildschweintonsillen.....	125
Abbildung 17	Agarosegel der <i>virF</i> -PCR der morphologisch unterschiedlichen Kolonien (Isolat M66, M69, M89 und M91).....	126
Abbildung 18	Agarosegel der Multiplex-PCR zur Serotyp-Bestimmung der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate.....	128
Abbildung 19	Mikrobiologischer Nachweis von pYV anhand des CR-MOX-Tests.....	135
Abbildung 20	Agarosegel der <i>virF</i> -PCR der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate.....	135

Abbildung 21	Phylogenetische Beziehung der gewonnenen Isolate – Agarosegel der PFGE-Analyse der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate aus Wildschweintonsillen.....	141
Abbildung 22	Phylogenetische Beziehung der gewonnenen Isolate - Cluster-Analyse der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate auf Basis von Gesamtgenom-Daten.....	144
Abbildung 23	Phylogenetische Beziehung der gewonnenen Isolate – Einzelnukleotid-Polymorphismus-Analyse der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate auf Basis der Gesamtgenom-Daten.....	145

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Isolierungsraten von <i>Y. pseudotuberculosis</i> bei verschiedenen Tieren (ergänzt, nach Frederiksson-Ahomaa und Wacheck, 2011).....	41
Tabelle 2	Lebensmittelassoziierte Infektionen durch <i>Y. pseudotuberculosis</i> in den letzten Jahrzehnten (ergänzt und verändert, nach Frederiksson-Ahomaa und Wacheck, 2011).....	44
Tabelle 3	PCR-Methoden zum Nachweis von <i>Y. pseudotuberculosis</i>	51
Tabelle 4	PCR-Methoden zum Nachweis pathogenitätsrelevanter Gene für <i>Y. pseudotuberculosis</i>	57
Tabelle 5	Verwendete <i>Y. pseudotuberculosis</i> Referenz- und Kontrollstämme.....	59
Tabelle 6	Zusammensetzung der untersuchten Wildschweinstrecke nach Geschlecht.....	60
Tabelle 7	Verwendete Enzyme.....	60
Tabelle 8	Verwendete Reaktionskits.....	61
Tabelle 9	Herkunft der verwendeten Referenz-Genomsequenzen.....	61
Tabelle 10	Verwendete DNA-Längenstandards.....	62
Tabelle 11	Verwendete Chemikalien.....	62
Tabelle 12	Verwendete Primer.....	63

Tabelle 13	Generierte Sequenzierungsprimer.....	67
Tabelle 14	Verwendete Medien.....	68
Tabelle 15	Verwendete Lösungen und Puffer.....	69
Tabelle 16	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	70
Tabelle 17	Software und Datenbanken.....	71
Tabelle 18	Flüssig-Anreicherungsmedien und ihre Selektivität.....	74
Tabelle 19	Übersicht zur Lage der Reviere und dem dazugehörigen Probenaufkommen.....	78
Tabelle 20	Pipettierschema für die wzz-PCR-Methode (nach Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003).....	84
Tabelle 21	Temperaturprofil der wzz-PCR-Methode nach (Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003).....	84
Tabelle 22a	Gegenüberstellung biochemischer Eigenschaften verschiedener <i>Yersinia</i> Spezies (nach Frederikssn-Ahomaa und Wacheck, 2011).....	86
Tabelle 22b	Differenzierung von <i>Y. enterocolitica</i> und <i>Y. pseudotuberculosis</i> (nach Frederikssn-Ahomaa und Wacheck, 2011).....	87
Tabelle 23	Biochemische Eigenschaften von <i>Y. pseudotuberculosis</i> zur Biotyp-Differenzierung (nach Tsubokura und Aleksic, 1995).....	88
Tabelle 24	Pipettierschema für die Multiplex-PCR-Methode (Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003).....	90

Tabelle 25	Pipettierschema für die Duplex-PCR-Methode (Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003).....	91
Tabelle 26	PCR-Programm für die Multiplex- und Duplex-PCR-Methode (nach Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003).....	91
Tabelle 27	Übersicht der spezifischen Bandenmuster der einzelnen Serotypen nach Anwendung der PCR-Methode (nach Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003).....	92
Tabelle 28	Eingesetzte Antibiotika zur Überprüfung möglicher Antibiotika-Resistenzen der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate.....	94
Tabelle 29	Pipettierschema für die <i>virF</i> -PCR-Methode (nach Thoerner <i>et al.</i> , 2003).....	97
Tabelle 30	PCR-Programm für die <i>virF</i> -PCR-Methode (nach Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003).....	97
Tabelle 31	Wiedergewinnung von <i>Y. pseudotuberculosis</i> aus künstlich kontaminierten Wildschwein-Tonsillen unter Anwendung des modifizierten Isolierungsverfahrens im Vergleich mit und ohne KOH-Behandlung.....	113
Tabelle 32	Zusammensetzung der untersuchten Wildschweinstrecke nach Alter und Geschlecht.....	114
Tabelle 33	Herkunft und Bezeichnung der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate.....	117
Tabelle 34	Prävalenz von <i>Y. pseudotuberculosis</i> im Schwarzwild aus dem Nordosten Deutschlands.....	118
Tabelle 35	MALDI-TOF MS-Score-Werte der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate aus Wildschweintonsillen.....	120

Tabelle 36	Übersicht der biochemischen Eigenschaften der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate aus Wildschweintonsillen.....	122
Tabelle 37	Übersicht der Biotypen und der zugehörigen biochemischen Eigenschaften der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate.....	127
Tabelle 38	Überblick über die genetische Zusammensetzung der O-Antigen-Gencluster und dem daraus folgenden Serotypen der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate.....	129
Tabelle 39	Überblick über die Hemmkonzentrationen aus den Antibiotika-Resistenzuntersuchungen der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate.....	131
Tabelle 40	Multi-Lokus-Sequenz-Typus (MLST) der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate.....	133
Tabelle 41	Virulenz-Eigenschaften der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate.....	138
Tabelle 42	PFGE-Restriktionsmustergruppen der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate.....	140
Tabelle 43	Accession-Numbers der Gesamtgenom-Sequenzen der <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Isolate.....	143

1 Einleitung

Die Yersiniose ist die dritthäufigste bakterielle Magen-Darm-Erkrankung in Deutschland und anderen Ländern Europas. Sie wird neben *Yersinia* (*Y.*) *enterocolitica* auch durch *Y. pseudotuberculosis* verursacht. Die klinische Manifestation ist durch Diarrhoe, Pseudoappendizitis und Fieber gekennzeichnet und tritt meist bei kleinen Kindern auf. Die Pathogenität der Erreger steht in engem Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Virulenzgenen, die sowohl auf dem Chromosom der Bakterien, als auch auf dem Virulenzplasmid pYV (70 kb) lokalisiert sein können. Die Inzidenz für durch *Y. enterocolitica* hervorgerufene Yersiniosen ist wesentlich höher als die für *Y. pseudotuberculosis*. Die Gründe hierfür könnten das diverse Wirtsspektrum und der schwierige kulturelle Nachweis von *Y. pseudotuberculosis* sein, aber auch ein schwaches Bewusstsein für diese Spezies als Gastroenteritis-Erreger. *Y. pseudotuberculosis* ist nicht nur humanpathogen, sondern kann auch Nutztiere und Haustiere sowie Zoo- und Wildtiere infizieren. Mit Hinblick auf das steigende Interesse an Lebensmitteln aus unkonventioneller Produktion (z. B. Wildfleisch, Freilandhaltung von Hausschweinen) erlangt *Y. pseudotuberculosis* zunehmende Relevanz für den gesundheitlichen Verbraucherschutz. Allein in dem Zeitraum der Jagdsaison 2016/2017 wurden ca. 26.800 Tonnen Wildfleisch in Deutschland verzehrt. Den größten Anteil nimmt dabei das Wildbret vom Schwarzwild mit 13.900 Tonnen ein. Zusätzlich kann unter bestimmten Bedingungen Wildfleisch direkt vom Jäger ohne amtliche tierärztliche Kontrolle (mit Ausnahme der amtlichen Trichinenuntersuchung) direkt an den Verbraucher vermarktet werden.

Pathogene *Y. enterocolitica*-Stämme konnten bereits aus Wild isoliert werden. Zur Prävalenz von *Y. pseudotuberculosis* im Wild gibt es derzeit nur wenige Daten, insbesondere in Deutschland. Serologische Untersuchungen deuten jedoch auf ein Vorkommen von *Y. pseudotuberculosis* in Wildschweinen hin. Da es bisher kein zufriedenstellendes kulturelles Nachweisverfahren für *Y. pseudotuberculosis* gibt, gestaltet sich die Isolierung dieser Spezies und die Vergleichbarkeit von Prävalenzen schwierig. Die DIN EN ISO 10273, die auf

den kulturellen Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* abzielt, wurde kürzlich überarbeitet, aber die beiden Arten sind zu unterschiedlich, um diese Methoden für die Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* zu verwenden. Ziel dieser Studie war es daher, *Y. pseudotuberculosis* durch eine verbesserte Isolierungsmethode aus Wildschweinen zu isolieren und die Isolate eingehend zu charakterisieren.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Gattung *Yersinia* - Systematik und Eigenschaften

Die Gattung *Yersinia* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*, in die Klasse der *Gammaproteobacteria* des Stammes der *Proteobacteria* (Bottone *et al.*, 2005). Yersinien sind nicht sporenbildende Stäbchenbakterien, die in ihrer Größe von 1-3 µm Länge und 0,5 - 0,8 µm Breite variieren (Hahn *et al.*, 2013). Sie wachsen fakultativ anaerob in einem Temperaturbereich von 0 bis 44 °C, wobei das Temperaturoptimum für die Vermehrung bei 28 bis 30 °C liegt (Schiemann, 1989). Geißeln werden in der Regel bei Wachstumstemperaturen unter 30 °C gebildet. Derzeit umfasst die Gattung der Yersinien 17 Spezies. Allerdings wird in den Arbeiten von Savin *et al.*, 2014 sowie Neubauer und Sprague, 2015, über die Aufnahme von *Yersinia wautersii* als neue Art diskutiert. Von besonderer Bedeutung sind die drei human- und tierpathogenen Spezies *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* (Skurnik *et al.*, 2009). *Y. pestis* ist der Erreger der Pest (der „schwarze Tod“), einer hochinfektiösen Erkrankung von Nagetieren, die durch Vektoren, wie den Rattenfloh, über den Blutweg auf den Menschen übertragen wird und besonders im Mittelalter pandemisch auftrat (Skurnik *et al.*, 2009). Gegenwärtig ist die Pest in Europa hinsichtlich ihres Vorkommens nicht relevant, wohingegen *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* als Erreger der enteralen Yersiniose von besonderer Wichtigkeit sind. Obwohl *Y. pseudotuberculosis* ähnliche gastrointestinale Erkrankungen wie *Y. enterocolitica* hervorruft, zeigen Multilocus-Sequenzanalysen (MLSA) und DNA-DNA Hybridisierungsstudien, dass *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* sich bereits vor 200 Mio. Jahre voneinander weg entwickelt haben, während *Y. pestis* ein Klon von *Y. pseudotuberculosis* ist, der sich in den letzten 1.500 bis 20.000 Jahren herausbildete (Achtmann *et al.*, 1999, Skurnik *et al.*, 2000). Die Genomsequenzanalysen von Wren (2003) bestätigten das enge verwandtschaftliche Verhältnis von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* mit einer DNA-Sequenz-Identität von nahezu 97 %, während beide Spezies lediglich eine Homologie von ca. 50 % zu *Y. enterocolitica* aufweisen. Trotz der

ausgeprägten genetischen Ähnlichkeit werden *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* in getrennte Spezies unterteilt. Dies beruht unter anderem auch auf die von diesen Spezies verursachten Krankheitsbildern.

2.2 *Yersinia pseudotuberculosis*

Y. pseudotuberculosis wurde als erste *Yersinia*-Spezies im Jahr 1883 aus einem Meerschweinchen isoliert, das mit dem Eiter eines an Tuberkulosemeningitis erkrankten Kindes infiziert worden war (Schiemann, 1989; Thal, 1978; Malassez und Vignal, 1884). 1889 wurde *Y. pseudotuberculosis* von Pfeiffer ebenfalls aus einem Meerschweinchen isoliert und als *Bacillus pseudotuberculosis rodentium* bezeichnet, in Assoziation mit den in der Tuberkuloseforschung häufig eingesetzten Meerschweinchen (Kirch *et al.*, 2013). Die erste direkte Isolierung aus einem Menschen erfolgte 1909 aus dem Blut eines an einer Sepsis erkrankten Patienten (Saisawa, 1913). Die Gattung *Yersinia* wurde bereits 1944 von Van Loghem begründet, jedoch wurde der Erreger, welcher bis dahin als *Pasteurella pseudotuberculosis* bekannt war, erst 1965 der Gattung *Yersinia* zugeordnet (Mollaret, 1965; Mollaret und Thal, 1974). Innerhalb der Spezies *Y. pseudotuberculosis* gibt es Subtypen basierend auf biochemischen StoffwechsellLeistungen und der Variabilität der O-Antigene (Tsubokura und Aleksic, 1995) (Kap. 2.7.3). Anders als bei *Y. enterocolitica* wird die biochemische Differenzierung in Biotypen aufgrund der unklaren klinischen Relevanz bei *Y. pseudotuberculosis* nur selten angewandt. Die Serotypisierung ist dagegen eine häufig angewandte Methodik und unterscheidet derzeit 15 O-Serotypen (O:1-O:15) und 10 Subtypen (O:1a, O:1b, O:1c, O:2a, O:2b, O:2c, O:4a, O:4b, O:5a, O:5b). Obwohl *Y. pseudotuberculosis* ubiquitär in der Umwelt verbreitet ist, besteht bei dieser Spezies nicht selten eine Verbindung zwischen dem Serotyp und dessen geografischer Verteilung sowie der eingenommenen ökologischen Nische. So sind die Serotypen O:1-O:3 weit verbreitet, während die Serotypen O:4-O:15 vorwiegend im asiatischen Raum vorkommen (Frederiksson-Ahomaa und

Wacheck, 2011). Ein weiterer Unterschied zu *Y. enterocolitica* ist, dass alle Serotypen von *Y. pseudotuberculosis* aufgrund des möglichen Vorhandenseins des Virulenz-Plasmides pYV und der Hochpathogenitätsinsel HPI als potenziell pathogen für Menschen und Tiere angesehen werden müssen und somit in der Lage sind, eine Yersiniose hervorzurufen (EFSA, 2007).

2.3 Yersiniose

Die Yersiniose ist die dritthäufigste bakterielle Magen-Darm-Erkrankung in Deutschland und Europa und wird sowohl durch *Y. enterocolitica* als auch durch *Y. pseudotuberculosis* hervorgerufen (EFSA und ECDC, 2016). Der Nachweis von enteropathogenen *Yersinia* spp. im Zusammenhang mit einer akuten Erkrankung unterliegt der Meldepflicht nach § 7 des Infektionsschutzgesetzes (Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG)). Die Prävalenz der durch *Y. enterocolitica* hervorgerufenen Yersiniose ist jedoch um ein Vielfaches höher als bei *Y. pseudotuberculosis*. Diese Spezies zeichnet sich dagegen durch ein sehr weites Wirtsspektrum aus und konnte bereits in Nutztieren (Rinder, Pferde, Schweine, Ziegen) (Slee *et al.*, 1988; Welsh und Stair, 1993; Czernomysy-Furowicz, 1997; Slee und Button, 1990), Haustieren (Katzen, Hunde) (Yanagawa *et al.*, 1978; Bergman *et al.*, 2010), Zootieren (Kageruka *et al.*, 1976; Nakamura *et al.*, 2015) und Wildtieren (Schalenwild, Raubwild, Nagetiere) (Jerrett *et al.*, 1990; Nikolova *et al.*, 2001; Gaydos *et al.*, 2009) nachgewiesen werden. Für diese beiden *Yersinia*-Spezies fehlen aber bisher verlässliche Angaben über die zur Erkrankung notwendige Infektionsdosis (Dedié *et al.* 1993). Beim Menschen erfolgt die Übertragung häufig durch kontaminierte Nahrungsmittel wie Schweinefleisch, Rohkost und Rohmilch (MacDonald *et al.*, 2012; Rimhanen-Finne *et al.*, 2009; Pärn *et al.*, 2015; Boqvist *et al.*, 2009; Grahek-Ogden *et al.*, 2007). Bei Tieren erfolgt die Übertragung eher durch Kontakt zu bereits infizierten Tieren, spezifische Management-Faktoren in der Nutztierhaltung (Virtanen *et al.*, 2011) und möglicherweise durch kontaminiertes Trinkwasser und Futter (Fukushima *et*

al., 1988; Niskanen *et al.*, 2003). Nach der Aufnahme gelangen die Yersinien über den Magen in den Dünndarm und adhären an die im terminalen Ileum liegenden Peyer'schen Platten. Durch anschließende Bindung mittels des oberflächlich exprimiertem Invasins und β 1-Integrins an die M-Zellen erfolgt die Penetration der Mukosa und der Zugang vom Darmlumen in subepitheliales Gewebe (Vazquez-Torres und Fang, 2000). Im subepithelialen Gewebe werden die Yersinien dann durch Lymphozyten erkannt und von verschiedenen Phagozyten wie Makrophagen und Granulozyten attackiert. Yersinien, die das Virulenzplasmid (pYV = Plasmid für Yersinia Virulenz) enthalten, können durch Expression der plasmidalen Virulenzgene dem Angriff entgehen, während pYV-freie Bakterien in dieser Frühphase der Infektion abgetötet werden. Den plasmidhaltigen Erregern wird sowohl das Überleben, als auch die Vermehrung ermöglicht, was im weiteren Verlauf der Infektion die Bildung von Mikroabzessen in lymphatischen und extralymphatischen Geweben begünstigt.

2.3.1 Krankheitsverlauf beim Menschen

Die Symptome und der Verlauf einer Infektion sind abhängig von der Virulenz des Erregerstammes und vom Alter und Immunstatus des Erkrankten (Bottone, 1997). Die klinischen Erscheinungen nach einer intestinalen Infektion lassen sich wie folgt einteilen:

1. Enterale Verlaufsform
2. Septische Verläufe und Abzessbildung
3. Postinfektiöse Folgeerkrankungen.

2.3.1.1 Enterale Verlaufsform

Innerhalb der enteralen Verlaufsform kann je nach Krankheitsbild eine Unterscheidung in die enteritische und pseudoappendizitische Verlaufsform vorgenommen werden.

Die enteritische Verlaufsform steht häufig im Zusammenhang mit einer *Y. enterocolitica*-Infektion (Kühn und Schirmeister, 2013). Neben der Gastroenteritis als prädominierendes Symptom können Fieber, Bauchschmerzen, Diarrhoe und Erbrechen zu den Begleitsymptomen gehören (Vandepitte und Wauters, 1979; Hoogkamp-Korstanje und de Koning, 1990; Cornelis *et al.*, 1987). Typisch für *Y. enterocolitica*-Infektionen sind hierbei wässrige, schleimige bis blutige Stuhlgänge, die auf eine Beteiligung des Dickdarms hinweisen (Diedé *et al.*, 1993; Frederiksson-Ahomaa und Wacheck, 2011). Bei der enteritischen Verlaufsform handelt es sich üblicherweise um eine selbstlimitierende Erkrankung (Frederiksson-Ahomaa und Wacheck, 2011; Marimon *et al.*, 2017). Jedoch ist aus wenigen Fällen auch ein chronisches Krankheitsgeschehen bekannt, bei denen die Symptome über mehrere Monate hinweg anhielten (Saebø und Lassen, 1992).

Die pseudoappendizitische Verlaufsform tritt häufig bei einer *Y. pseudotuberculosis*-Infektion auf und äußert sich durch Symptome wie Erbrechen, Fieber und Bauchschmerzen im rechten Unterbauch, hervorgerufen durch eine terminale Ileitis, mesenteriale Lymphadenitis oder Pseudoappendizitis. Eine Diarrhö ist hier eher selten. (Terti *et al.*, 1989; Wren, 2003). In einigen Fällen wird im Zusammenhang mit der mesenterialen Lymphadenitis von unnötigen Appendektomien berichtet, obwohl es sich hierbei um eine Lymphknotenentzündung in der Bauchhöhle handelt (Grant *et al.*, 1994; Nuorti *et al.*, 2004).

2.3.1.2 Septische Verläufe und Abzessbildung

Eine Septikämie tritt insbesondere bei immunsupprimierten Personen auf und solchen, die unter medikamentöser oder krankheitsbedingter Eisenüberladung, chronischer Hepatitis, Diabetes oder Neoplasie leiden (Carniel *et al.*, 2006; Bottone, 1999). Des Weiteren wurde über einen septischen Krankheitsverlauf in Folge von Bluttransfusionen berichtet (Guinet *et al.*, 2011). Blutspender mit einer asymptomatischen Bakteriämie und die Vermehrungsfähigkeit der Yersinien bei 4 °C sind dabei von entscheidender Wichtigkeit (Frederiksson-

Ahoma and Wacheck, 2011). Symptomatisch äußert sich die septische Verlaufsform durch Kopf- und Gliederschmerzen, Fieber, begleitet von Schüttelfrost und Erbrechen (Dedié *et al.*, 1993).

Abzessbildungen in Leber, Milz, Niere oder Lunge sind aus einigen Fällen bekannt und stehen im Zusammenhang mit einer vorangegangenen Septikämie (Bottone, 1999; Grigull *et al.*, 2005, Nemoto *et al.*, 1992).

Der septische Krankheitsverlauf mit eventuell folgender Abzessbildung kann sowohl bei *Y. enterocolitica*-Infektionen, als auch bei *Y. pseudotuberculosis*-Infektionen vorkommen (Waldschmidt, 1978).

2.3.1.3 Postinfektiöse Folgeerkrankungen

Postinfektiöse Folgeerkrankungen können im Anschluss einer Infektion und in Abhängigkeit vom Immunstatus und Alter der betroffenen Person auftreten. Spätfolgen können reaktive Arthritis, Pseudocrohn und Erythema nodosum sein (Hannu *et al.*, 2003; Homewood *et al.*, 2003; Debois *et al.*, 1978).

Die reaktive Arthritis ist eine nicht-eitrige Gelenkentzündung. Ursächlich dafür kann eine bakterielle Infektion im Urogenitaltrakt oder Darmbereich sein (Flores *et al.*, 2003). Insbesondere Personen mit dem Histokompatibilitätsantigen HLA-B27 besitzen ein erhöhtes Risiko, an reaktiver Arthritis zu erkranken (Leirisalo-Repo und Suoranta, 1988). Es wird vermutet, dass bei dieser Spätfolge die Bakterien nach einer Infektion nicht vollständig durch das Immunsystem eliminiert wurden und diese in den lymphatischen Geweben persistieren (Granfors *et al.*, 1989). Symptomatisch äußert sich die reaktive Arthritis anfänglich mit Rötungen und Schwellungen bis hin zu Schmerzen und eingeschränkter Funktionalität, insbesondere der unteren Extremitäten. Dabei können mehrere Gelenke zeitlich nacheinander betroffen sein (Hein und Knauff, 1978). Ein anderes klinisches Bild zeigt sich bei dem sogenannten „Reiter’s Syndrom“. Dabei steht die reaktive Arthritis im Zusammenhang mit Augenentzündungen in Form von Iritis, Uveitis und Konjunktivitis (Ford, 1979).

Eine weitere postinfektiöse Folgeerkrankung ist Erythema nodosum, diese wird häufig auch als Knotenrose bezeichnet. Es handelt sich dabei um eine akut-entzündliche Hauterkrankung der Subkutis. Bei den betroffenen Personen können sich Symptome wie die Bildung von roten, bis zu 5 cm großen, druckempfindlichen, schmerzhaften Knoten auf den Beinen sowie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen zeigen (Yotsu *et al.*, 2010; Debois *et al.*, 1978). Eine Rückbildung der Knoten kann innerhalb von drei bis sechs Wochen erfolgen (Zechner, 2003).

2.3.2 Krankheitsverlauf bei Tieren

In einigen Fällen ist über eine Übertragung auf den Menschen durch den Kontakt mit infizierten Tieren berichtet worden (Fukushima *et al.*, 1989; Hetem *et al.*, 2013). Tiere sind in den meisten Fällen jedoch nur asymptomatische Träger der Bakterien; klinische Erscheinungen treten häufig erst bei ungünstigen Umwelt- oder Haltungsbedingungen auf.

Y. pseudotuberculosis ist weltweit verbreitet und wird oft im Darmtrakt von Vögeln, Nagetieren, Wildtieren, Nutztieren und Primaten nachgewiesen (Bergman *et al.*, 2010; Magistrali *et al.*, 2015). Die klinische Yersiniose tritt meist als Jungtiererkrankung auf und steht bei adulten Tieren häufig im Zusammenhang mit ungünstigen Veränderungen der Witterung, Haltungsbedingungen oder anderen Stressfaktoren (Gill, 1996; Jerrett *et al.*, 1990). In diesem Fall äußert sich die Yersiniose durch Symptome wie Gewichtsverlust, Apathie, Diarrhö, Atembeschwerden und Muskelschwäche (Mair, 1973). Eine Septikämie kann im weiteren Verlauf der Infektion zu Abzessbildung in Leber, Milz, Nieren und Lunge führen (Giannitti *et al.*, 2014). Eine außergewöhnlich starke Septikämie mit Symptomen wie Blutansammlungen in den Kapillargefäßen des Darmtraktes, Lungenentzündung, multifokalen pulmonären Blutungen, Herzmuskelentzündungen und zystischen Kolitiden ist charakteristisch für eine akute Yersiniose, welche bereits nach wenigen Tagen zum Tod des betroffenen Tieres führen kann (Mair *et al.*, 1973; Zhang *et al.*, 2008).

2.4 Pathogenität

Für pathogene *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* wurden bereits eine Reihe von Plasmid- und chromosomal-kodierten Virulenzfaktoren beschrieben, deren Gene zum Teil hohe DNA-Sequenzähnlichkeiten aufweisen (Heesemann et al., 1983; Atkinson und Williams, 2016; Gemski et al., 1980). In diesem Abschnitt soll die Aufmerksamkeit auf die bedeutensten Virulenzgene von *Y. pseudotuberculosis* gerichtet werden, die sowohl extrachromosomal, als auch auf dem Chromosom platziert sind. Obwohl eine Vielzahl der Virulenzgene von *Y. pseudotuberculosis* auf dem 70 Kilobasen großen Virulenzplasmid (pYV) lokalisiert sind, wird die Ausprägung einer Krankheit zusätzlich durch chromosomal-kodierte Virulenzfaktoren beeinflusst (Revell und Miller, 2001; Galindo et al., 2011).

2.4.1 Plasmidkodierte Virulenzfaktoren

Das Virulenzplasmid pYV kodiert für Proteine, die in der äußeren Membran (z. B. YadA) und als sezernierte Exoproteine, den sog. Yops („*Yersinia* outer membrane protein“) vorkommen (Frederiksson-Ahomaa und Wacheck, 2011). Die Transkription der plasmidalen Virulenzgene wird sowohl durch die Temperatur, als auch durch den Kontakt mit einer eukaryotischen Zelle kontrolliert und *in vitro* nur bei 37 °C unter Kalziummangel aktiviert (Cornelis und Wolf-Watz, 1997; Portnoy et al., 1984). Bei dauerhafter Kultivierung im Labor kann das Virulenzplasmid leicht verloren gehen.

Eine besondere Bedeutung hat das pYV-kodierte Yop-Virulon. Es ist ein integriertes System, welches den Bakterien ermöglicht, im lymphoiden Gewebe des Wirtes zu überleben und sich zu vermehren. Es besteht aus den folgenden vier Elementen: ein Typ-III-Sekretionssystem „Ysc“ (Yop-secretion), ein Translokations-System (YopB, YopD und LcrV), ein Kontroll-Element (YopN) und ein Paket von Effektorproteinen (YopE, YopH und YpkA) (Cornelis und Wolf-Watz, 1997) (Abb. 1). Der Mechanismus wird erst bei einer Temperatur von 37 °C durch den Transkriptionsaktivator LcrF („low calcium response“) aktiviert. Dieser stimuliert die Transkription der *yop*- und *ysc*-Gene, was zur

Folge hat, dass sich ein Ysc-Sekretionsapparat in den Membranschichten etabliert und eine Reihe von Yop-Proteinen synthetisiert werden. Diese Yops können anhand ihrer Funktion in zwei Gruppen unterteilt werden, den Translokatoren, welche an der Bildung des Sekretionsapparates beteiligt sind (z. B. YopB und YopD) und den antiphagozytären Effektorproteinen, die über den Ysc-Sekretionsapparat in die Wirtszelle injiziert werden (z. B. YopE und YopH). Solange kein Kontakt zu einer eukaryotischen Zelle besteht, blockiert das Kontroll-Element YopN den Ysc-Kanal und verhindert die Sekretion der Yop-Proteine. Bei einem Kontakt zu einer eukaryotischen Wirtszelle wird die Adhärenz und Invasion zusätzlich zu den chromosomal-kodierten Proteinen durch das plasmidkodierte YadA (*Yersinia* adhesin A) unterstützt (El Tahir und Skurnik, 2001; Eitel und Dersch, 2002). Des Weiteren vermittelt YadA die Bindung an andere Moleküle der extrazellulären Matrix, wie Kollagen, Laminin, Fibronectin, und führt zu einer Autoagglutination, welche die Bildung von Mikroabszessen in Geweben und Organen begünstigt. Zusätzlich verhindert YadA die Aktivierung eines Membran-Angriff-Komplexes, was die sog. Serumresistenz erklären kann (Heesemann *et al.* 1983; Frederiksson-Ahomaa und Wacheck, 2011). Dadurch wird die Überlebensfähigkeit und weitere Ausbreitung des Erregers im Wirtsorganismus gewährleistet (Bottone, 1999). Die Transkription von *yadA* ist wie die anderen Bestandteile des Yop-Virulons an den Transkriptionsaktivator LcrF und einer Umgebungstemperatur von 37 °C gebunden.

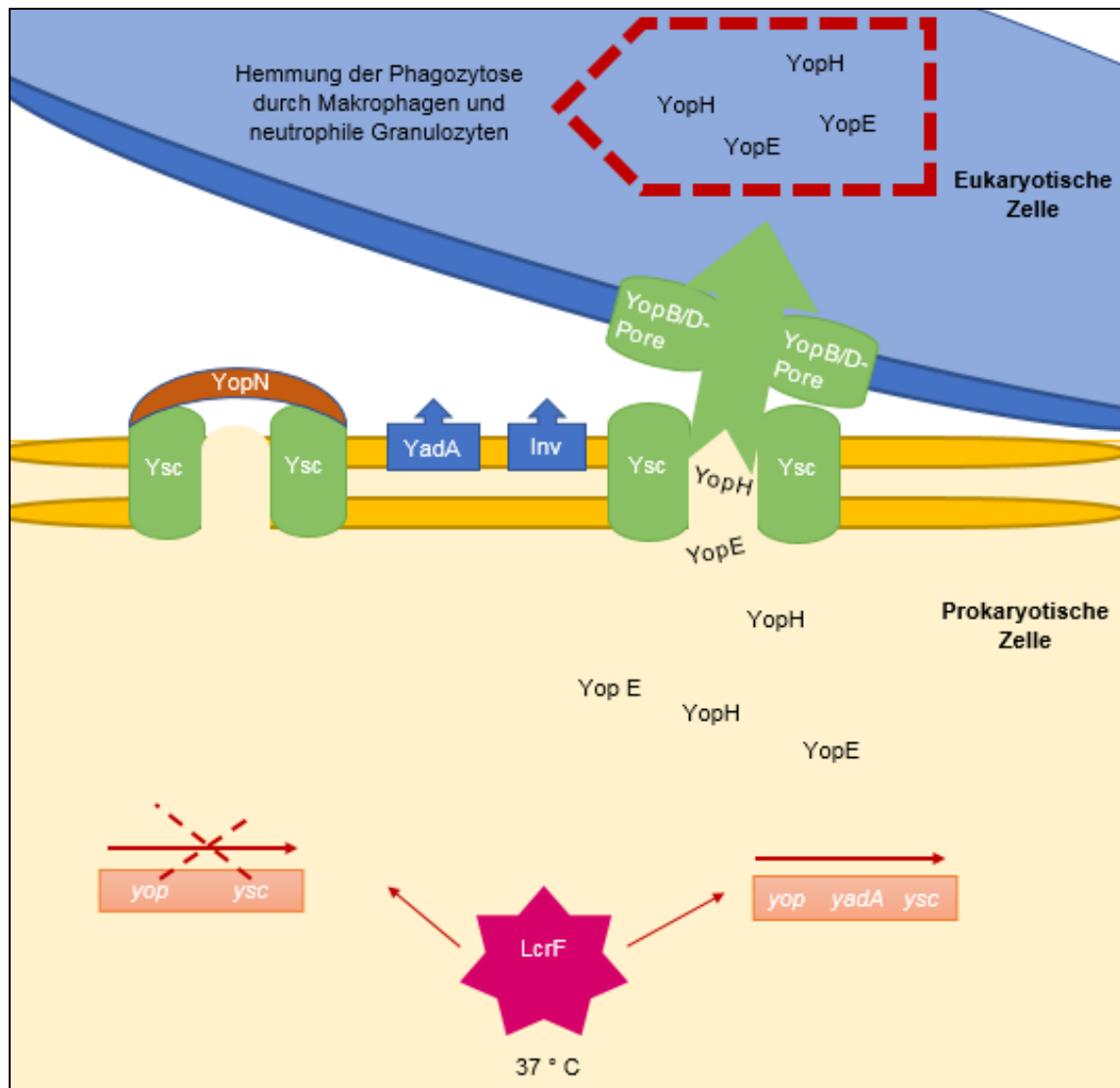


Abbildung 1: Wirkmechanismus des Yop-Virulons von *Y. pseudotuberculosis* (in Anlehnung an Cornelis und Wolf-Watz, 1997).

2.4.2 Chromosomalkodierte Virulenzfaktoren

Neben plasmidkodierten Virulenzfaktoren sind auch chromosomalkodierte Merkmale zur vollständigen Ausprägung der Virulenz von entscheidender Bedeutung (Atkinson und Williams, 2016).

Zu Beginn einer Infektion müssen die Bakterien zunächst das saure Milieu der Magenpassage überwinden. Das Enzym Urease, welches durch den Gen-Lokus *ure* kodiert wird, hydrolysiert Harnsäure zu Kohlensäure und Ammoniak

und führt zu einer lokalen Erhöhung des pH-Wertes. Eine Steigerung des pH-Wertes kann sich förderlich auf das Überleben von *Y. pseudotuberculosis* auswirken (Hu *et al.*, 2009; Riot *et al.*, 1997).

Für den weiteren Verlauf einer Infektion ist die Adhäsion an und Invasion in Wirtszellen maßgeblich. Neben dem plasmidkodierten Membranprotein YadA werden diese Prozesse von dem chromosomalkodierten Membranprotein Invasin bewirkt. Beide Moleküle besitzen eine hohe direkte bzw. indirekte Bindungsaffinität zu β_1 -Integrinen (Zelladhäsionsproteine der M-Zellen), wodurch die Bindung und das Eindringen in die Wirtszellen begünstigt wird (Uliczka *et al.*, 2009). Zusätzlich zu den Membranproteinen Invasin und YadA kann die Zelladhäsion durch das Antigen pH6, eine Typ IV-Pilus-ähnliche Struktur, unterstützt werden. Das Antigen pH6 wird von dem *pil*-Genkomplex kodiert und kann zusätzlich zur Adhäsion an Wirtszellen eine Agglutination der Erythrozyten vermitteln (Yang *et al.*, 1996). Der *pil*-Lokus ist nicht in allen Spezies-Vertretern vorhanden, nur 41 Prozent der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate humanen und tierischen Ursprungs besitzen diesen Genkomplex (Collyn *et al.*, 2004). Das Membranprotein Ail (Attachment and Invasion Locus) von *Y. pseudotuberculosis* scheint nicht wie bei *Y. enterocolitica* den Anheftungs- und Invasionsprozess zu vermitteln, eher ist es hier für die Serumresistenz verantwortlich (Yang *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 2001).

Während einer *Y. pseudotuberculosis*-Infektion sind zwei chromosomale Virulenzfaktoren von besonderer Bedeutung. Das Superantigen YPM („*Y. pseudotuberculosis*-derived mitogen“) und die Pathogenitätsinsel HPI („High-Pathogenicity Island“).

Y. pseudotuberculosis ist das einzig bekannte gram-negative Bakterium, welches ein Superantigen produziert (Goubard *et al.*, 2015). Superantigene sind Proteine, die an der Immunsystem-Aktivierung beteiligt sind, indem sie in eine direkte Interaktion mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex und den T-Zellen treten. YPM ist verantwortlich für die vermehrte Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen, die zu einem toxischen Schock und Gewebeschädigungen führen können (Abe *et al.*, 1997). Scharlach-ähnliches

Fieber und andere Allgemeinstörungen treten in diesem Zusammenhang häufig in fernöstlichen Ländern wie Russland und Japan auf (Amphlett, 2016; Yoshino *et al.*, 1995). Nicht in allen *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen sind die *ypm*-Gene (*ypmA*, *ypmB*, *ypmC*) vorhanden. Während in fernöstlichen Isolaten eine hohe Prävalenz vorherrscht, besitzen nur wenige Isolate aus dem europäischen Raum diesen Virulenzfaktor (Fukushima *et al.*, 2001).

Pathogenitätsinseln (HPI) sind große zusammenhängende Sequenzen der chromosomalen DNA, die für eine Vielzahl von Virulenzfaktoren kodieren (Hacker *et al.*, 1997). In der Gattung *Yersinia* kommen HPI lediglich bei *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und bei hochpathogenen *Y. enterocolitica*-Stämmen des Biotyps 1B vor (Carniel, 2001). Die Gene der HPI kodieren für Proteine, die an der Biosynthese, Regulation und dem Transport des Siderophors Yersiniabactin beteiligt sind und steuern somit die Eisenaufnahme (Gehring *et al.*, 1998; Rakin *et al.*, 1999). Eisen ist ein lebenswichtiges Element für praktisch alle Lebensformen. Der Bedarf an Eisen beruht auf seiner Rolle in zellulären Prozessen, die von der Energieerzeugung und DNA-Replikation bis zum Sauerstofftransport und dem Schutz vor oxidativem Stress reichen (Skaar, 2010). In Wirtsorganismen ist Eisen zumeist an Proteine wie Hämoglobin, Ferritin, Transferrin und Lactoferrin gebunden, um das Niveau von freiem verfügbarem Eisen möglichst gering zu halten. Die hohe Eisen-Affinität der Siderophore ermöglicht es den Bakterien jedoch, bereits gebundenes Eisen von den Wirtsproteinen zu lösen und aufzunehmen (Carniel, 2001).

2.5 Epidemiologie

Enteropathogene Yersinien konnten bereits auf allen Kontinenten isoliert werden. Ein wichtiges Reservoir für *Y. pseudotuberculosis* scheinen Wildtiere zu sein. Dennoch sind die Übertragungswege nicht immer klar erkennbar. Häufig ist kein Zusammenhang zwischen menschlichen Erkrankungen und Kontaminationsquellen zu erkennen. Zugleich gestaltet sich die Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* aus Lebensmittel- und Umgebungsproben schwierig, was eine lückenlose Datenerfassung erschwert.

2.5.1 Vorkommen beim Menschen

In Deutschland ist am 25.07.2017 das „Gesetz zur Modernisierung der epidemiologischen Überwachung übertragbarer Krankheiten“ in Kraft getreten. Dieses Gesetz umfasst eine umfangreiche Änderung des Infektionsschutzgesetzes (IfSG, Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, 2018) (Robert Koch Institut, 2017b). Die Meldepflicht von *Y. enterocolitica* wurde ausgedehnt auf andere darmpathogene Yersinien wie *Y. pseudotuberculosis*. Eine Meldung von *Y. pseudotuberculosis* war in der Vergangenheit erst Pflicht, wenn eine zeitliche und örtliche Häufung von Infektionen auf eine schwerwiegende Gefahr für die Allgemeinheit hinwies (Ausbruchsgeschehen). Mit der IfSG-Änderung besteht nun eine Meldepflicht bereits bei einem direkten oder indirekten Nachweis, soweit dieser auf eine akute Infektion hindeutet. Eine länderübergreifende, einheitliche Nachweismethodik ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vorhanden. Die DIN EN ISO 10273:2003, die auf den kulturellen Nachweis von pathogenem *Y. enterocolitica* abzielt, wurde kürzlich überarbeitet, aber die beiden Arten sind zu unterschiedlich, um diese Methode zur Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* zu verwenden (International Organisation for Standardization, 2017). Diese Punkte erschweren einen länderübergreifenden Vergleich der Yersiniose-Inzidenzen erheblich.

In den USA werden bestätigte Yersiniose-Fälle vom Centers for Disease Control and Prevention (CDC) zusammengetragen. Im Jahr 2016 lag die Inzidenz (Krankheitsfälle je 100.000 Einwohner) bei 0,42. Dies ist eine Steigerung um 29 Prozent im Vergleich zu den durchschnittlichen Inzidenzwerten von 2013-2015 (Marder *et al.*, 2017). Die Inzidenzrate in den USA ist allerdings deutlich geringer als in der EU. Hier wurde für 2016 eine Inzidenz von 1,82 ermittelt, was einer Fallzahl von 6.908 entspricht. Im Vergleich zu den Vorjahren sind nur geringe Schwankungen erkennbar (European Food Safety Authority und European Centre for Disease Prevention and Control, 2017). Der höchste Inzidenzwert für 2016 wurde in Finnland mit 7,42 ermittelt. In Deutschland ist das Robert Koch-Institut (RKI) die zentrale Einrichtung der Bundesregierung auf dem Gebiet der Krankheitsüberwachung

und –prävention. Hier werden u. a. gemeldete Yersiniose-Fälle zusammengetragen. Für das Jahr 2016 wurden 2.774 Yersiniose-Fälle gemeldet, was einer Inzidenz von 3,4 entspricht (Robert Koch Institut, 2017a). Mehr als 40 Prozent der gemeldeten Fälle innerhalb der EU kamen somit aus Deutschland. Die durchschnittliche Inzidenz in der Bundesrepublik hat sich gegenüber dem Vorjahr nicht geändert. Der nahezu stetig fallende Trend der Erkrankungszahlen seit 2002 hat sich damit nicht weiter fortgesetzt. Seit 2012 ist die Anzahl der jährlich gemeldeten Erkrankungen in etwa gleich geblieben (zwischen 2.500 und 2.800 Erkrankungen) (Abb. 2). Ebenfalls ohne Veränderung ist die demografische Verteilung der Krankheitsfälle. Die höchsten Inzidenzwerte wurden bei Kindern unter 5 Jahren und insbesondere bei 1-2 Jahre alten Kindern ermittelt (Robert Koch Institut, 2017a).

Unterschiede zwischen *Y. enterocolitica*-Inzidenzen und *Y. pseudotuberculosis*-Inzidenzen stehen im Kontrast zu den auftretenden Ausbruchsgeschehen von *Y. pseudotuberculosis*-Infektionen, besonders in den nordeuropäischen Ländern (Long *et al.*, 2010). Möglicherweise wird die Zahl von durch *Y. pseudotuberculosis* hervorgerufenen Yersiniosen deutlich unterschätzt. Gründe hierfür könnten der fehlende routinemäßige Nachweis dieser Spezies, die schwierige Isolierung sowie eine fehlende einheitliche kulturelle Nachweismethodik sein (Frederiksson-Ahomaa und Wacheck, 2011).

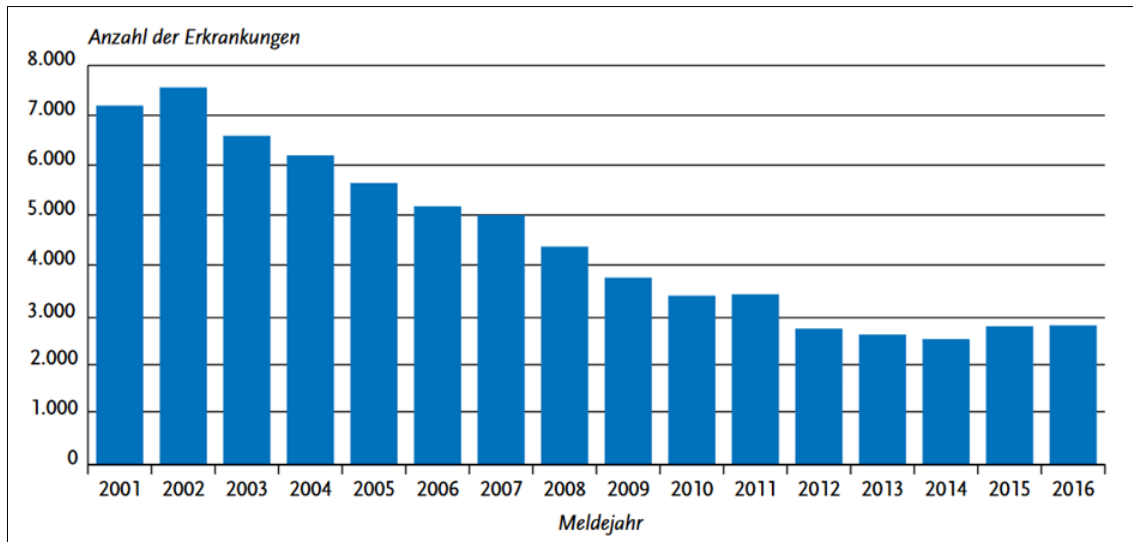


Abbildung 2: Gemeldete Yersiniosen in Deutschland, 2001-2016 (Robert Koch-Institut, 2017). Gezeigt ist die Anzahl der gemeldeten Yersiniose-Erkrankungen in Deutschland von 2001 bis 2016.

2.5.2 Vorkommen beim Tier

Obwohl sich *Y. pseudotuberculosis* durch ein weites Wirtsspektrum auszeichnet, sind Prävalenzstudien mit kulturellem Nachweis des Erregers nur von einigen Tierarten bekannt (Tab. 1). Neben Wildtieren konnten enteropathogene Yersinien auch in Schlachtschweinen und produktionsbeteiligten Betrieben nachgewiesen werden. Dies gilt in besonderem Maße für *Y. enterocolitica* mit einer Nachweisrate von 30 bis 90 Prozent (Martinez *et al.*, 2011). Interessanterweise scheint *Y. enterocolitica* bei konventionellen Haltungssystemen häufiger vorzukommen, wohingegen ein Vorkommen von *Y. pseudotuberculosis* mit unkonventioneller Haltung (z. B. Freilandhaltung) in Zusammenhang zu bringen ist (Nowak *et al.*, 2006; Laukkanen *et al.*, 2008).

Tabelle 1: Isolierungsraten von *Y. pseudotuberculosis* bei verschiedenen Tieren (ergänzt, nach Frederiksson-Ahomaa und Wacheck, 2011).

Tier	Anzahl der Proben	Anzahl der Positiven	%	Land	Referenz
Feldhase	139	2	1,4	Japan	Fukushima und Gomyoda, 1991
Fledermaus	200	1	0,5	Deutschland	Mühldorfer <i>et al.</i> , 2010
Haussperling	329	8	2	Belgien	Rouffaer <i>et al.</i> , 2017b
Hund	252	16	6,3	Japan	Fukushima <i>et al.</i> , 1985
Kaninchen	148	4	2,7	China	Zheng <i>et al.</i> , 1995
Katze	318	4	1,3	Japan	Fukushima <i>et al.</i> , 1985
Maus	107	9	8,4	China	Zheng <i>et al.</i> , 1995
Ratte	237	4	1,7	Japan	Kageyama <i>et al.</i> , 2002
	1051	3	0,7	Belgien	Rouffaer <i>et al.</i> , 2017a
Rind	2639	185	7,0	Australien	Slee <i>et al.</i> , 1988
Schaf	449	21	4,7	Australien	Slee und Skilbeck, 1992

Tier	Anzahl der Proben	Anzahl der Positiven	%	Land	Referenz
Vögel	259	2	0,8	Japan	Fukushima und Gomyoda, 1991
	468	3	0,6	Schweden	Niskanen <i>et al.</i> , 2003
	471	0	0	Iran	Jamali <i>et al.</i> , 2014
Wildschwein	153	4	2,6	Schweiz	Fredriksson- Ahomaa <i>et al.</i> , 2009

2.5.3 Vorkommen in Lebensmitteln und Lebensmittelinfektionsausbrüche

Gegenwärtig gibt es in der Europäischen Union keine harmonisierte Überwachung von *Yersinia* in Lebensmitteln oder Tieren. Gemeldete Daten werden von der European Food Safety Authority (EFSA) gesammelt und erlauben eine Übersicht auf EU-Ebene. Trend-Analysen und -Beobachtungen sind auf dieser nicht harmonisierten Datengrundlage allerdings nicht möglich (European Food Safety Authority, 2017).

Y. pseudotuberculosis gehört zu den lebensmittelhygienisch relevanten Bakterien. Aufgrund seines weiten Wirtsspektrums und dem damit verbundenen diversen Vorkommen sind die genauen Übertragungswege bis heute nicht vollständig geklärt. Nur in einigen Fällen konnte ein Nachweis aus Lebensmitteln erbracht werden (Tab. 2). Lebensmittelbedingte Ausbrüche wurden in der Vergangenheit besonders häufig in Finnland und Russland gemeldet (Tab. 2). Dabei waren vorwiegend Kinder aus Schulen und Kindertagesstätten mit gemeinschaftlicher Kantinenküche betroffen.

Insbesondere frische Produkte wie Gemüse sind von großer Bedeutung für die Übertragung von *Y. pseudotuberculosis* auf den Menschen. Die Produktion und Lagerung dieser Lebensmittel beruht oft auf einer temperaturüberwachten Kühlkette, die dazu beiträgt, die Haltbarkeit zu verlängern, da viele Lebensmittelpathogene bei Kühltemperaturen nicht wachsen können oder zumindest ihr Wachstum wesentlich verzögert wird. *Y. pseudotuberculosis* zeigt jedoch ein psychrotrophes Wachstumsverhalten, welches ein Wachstum bei einer Temperatur bis zu 0 °C ermöglicht (Keto-Timonen *et al.*, 2018). Im Gegensatz dazu ist *Y. pseudotuberculosis* wie die meisten Yersinien empfindlich gegenüber hohen Temperaturen, wobei die maximale Wachstumstemperatur zwischen 42-44 °C liegt (Keto Timonen *et al.*, 2018). Davon ausgehend sind thermische Prozesse in der Lebensmittelproduktion von enormer Wichtigkeit hinsichtlich der Abtötung von Yersinien und anderen Enteritiserregern.

Die Kontamination von Lebensmitteln mit *Y. pseudotuberculosis* wird in Zusammenhang mit dem direkten Kontakt zu fäkalen Ausscheidungen wildlebender Tiere gesehen. Aber auch durch Kot kontaminiertes Trink- und Bewässerungswasser scheinen eine wichtige Rolle im Übertragungsweg einzunehmen (Nuorti *et al.*, 2004; Fukushima *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2003).

Tabelle 2: Lebensmittelassoziierte Infektionen durch *Y. pseudotuberculosis* in den letzten Jahrzehnten (ergänzt und verändert, nach Frederiksson-Ahomaa und Wacheck, 2011)

Land	Jahr	Anzahl der Fälle	Vermutete Quelle	Referenz
Finnland	1998/99	47	Eisbergsalat	Nuorti <i>et al.</i> , 2004
	2001	89	Eisbergsalat	Jalava <i>et al.</i> , 2004
	2003	111	Karotten	Jalava <i>et al.</i> , 2006
	2004	469	Karotten	Rimhanen-Finne <i>et al.</i> , 2009
	2006	58	Karotten	Rimhanen-Finne <i>et al.</i> , 2009
	2008	>30	Karotten	Vasala <i>et al.</i> , 2014; Evira, 2008
	2014	43	Rohmilch	Pärn <i>et al.</i> , 2015
Japan	1998	3	Quellwasser	Sunahara <i>et al.</i> , 2000
Kanada	1998	74	Milch	Nowgesic <i>et al.</i> , 1999
Korea	2001	1	Brunnenwasser	Han <i>et al.</i> , 2003
Neuseeland	2014	217	Gemüse	MPI, 2014
Russland	2005	33	Kohl, Zwiebeln	ProMED: 2005427.1169
	2007	121	Gemüse	ProMED: 20071001.3240
	2008	141	Gemüse	ProMED: 20080718.2184

ProMED (www.promedmail.org) Archivnummer

2.6 Wildbret als Lebensmittel

Wildbret ist die deutsche Bezeichnung für Fleisch von frei lebenden Tieren, die dem Jagdrecht unterliegen. Wildfleisch ist aufgrund seiner Genusswerte wie Zartheit, Feinfaserigkeit und leichte Verdaulichkeit und seiner Zusammensetzung ein hochwertiges Lebensmittel (Haider, 2000). Es zeichnet sich im Vergleich zum Rindfleisch durch niedrigere Gehalte an Fett und einen höheren Gehalt an Gesamteiweiß aus und kann somit Verwendung in der Diätküche oder als charakterbestimmende Komponente in hochwertigen Fleischerzeugnissen finden (Bandick und Ring, 1996). Den höchsten Gehalt an essentiellen Aminosäuren unter den einheimischen Wildarten weist das Fleisch von Wildschweinen mit 8,17 g/ 100 g auf. Leucin und Lysin, beides essentielle Aminosäuren, sind beim Wild am stärksten vertreten (Uherová *et al.*, 1992). Da nicht nur der Genusswert, sondern immer mehr auch ethische und ökologische Aspekte in die Verbraucher-Entscheidung einfließen, erlangt das Wildbret als Lebensmittel aus unkonventioneller Produktion zunehmend an Bedeutung.

Der Pro-Kopf-Verbrauch von Wilderzeugnissen betrug in der Bundesrepublik Deutschland 1,4 Kilogramm für das Jahr 2016 (BVDF, 2018, Statistisches Bundesamt, 2017). Dies macht bei einem gesamten Fleischverbrauch von ca. 88 Kilogramm pro Kopf ca. 1,6 Prozent am Gesamtfleischverbrauch aus. Dieser Wert wird deutlich überschritten bei Vielverzehrern wie z. B. in Jäger-Haushalten, dort liegt der jährliche Pro-Kopf-Verzehr bei durchschnittlich 13 Kilogramm (Hoffmann, 2013).

Im Jagdjahr 2016/ 2017 wurde in Deutschland ein Gesamtwildbretaufkommen (ohne Decke/Schwarte und Knochen) von ca. 18.138 Tonnen mit der Erlegung von Rot-, Dam-, Reh- und Schwarzwild erzeugt (Deutscher Jagdverband, 2018). Der größte Teil des Wildbretaufkommens stammt mit ca 47 Prozent vom Schwarzwild. Zusätzlich zu den 8.544 Tonnen Wildbret vom heimisch erlegten Schwarzwild wurden ca. 2.816 Tonnen Wildschweinfleisch im Jahr 2016 aus Ländern wie Polen, Australien und den USA in die Bundesrepublik Deutschland importiert (Deutscher Jagdverband, 2018, persönliche Korrespondenz Fr. Schmitz, DJV-Service).

Einen besonderen Stellenwert nimmt der Jäger hinsichtlich der Lebensmittelsicherheit ein. Denn das EU-Lebensmittelrecht („EU-Lebensmittelhygienepaket“) umfasst alle Stufen der Lebensmittelherstellung nach dem Prinzip „from stable to table, from farm to fork“ (Apelt, 2007). Damit wird die Verantwortung für die Sicherheit der hergestellten Futter- und Lebensmittel auf allen Stufen der Produktion auf den „Lebensmittelunternehmer“, u. a. den Jäger übertragen (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2006). Die Lebensmittelsicherheit wird maßgeblich durch die Arbeit des Jägers bestimmt, denn die Wildbrethygiene beginnt bereits bei der Lebendbeschau, beim sogenannten „Ansprechen“ des Wildes. Dabei wird vor dem Schuss ermittelt, um welche Wildart und Altersklasse es sich handelt, unter Berücksichtigung der Abschussfreigabe (Beachtung der Schonzeiten und Hegerichtlinien). Zusätzlich ist das Erkennen von bedenklichen Merkmalen wie z. B. abnorme Verhaltensweisen, Störungen des Allgemeinzustandes, Knochenbrüche und Wucherungen von hoher Wichtigkeit (Heintges, 2015). Erst nach einem korrekten Ansprechen des Wildes wird das Wild unter Berücksichtigung tierschutzrelevanter und wildbrethygienischer Aspekte mit einem präzisen Schuss erlegt. Durch die richtige Platzierung des Schusses und der daraus resultierenden Minimierung des Oberflächenkeimgehalts wird ein großer Einfluss auf die hygienische Qualität, Lagerfähigkeit und weitere Verarbeitungsmöglichkeiten des Wildfleisches ausgeübt (Bauschulte, 2017). Nach der Erlegung ist ein zeitnahes Bergen und Versorgen des Wildes sowie Prüfen auf weitere bedenkliche Merkmale, wie z. B. Verklebungen an Organen, Abweichungen von der Muskulatur oder Organen in Farbe, Geruch und Konsistenz und fremder Inhalte in Körperhöhlen erforderlich, um die Sicherheit des Wildbrets als Lebensmittel zu gewährleisten (Heintges, 2015). Diese Besonderheiten verdeutlichen die Bedeutung des Jägers und einer Qualifikation als „kundige Person“ hinsichtlich der Lebensmittelhygiene und Lebensmittelsicherheit (Giuggioli *et al.*, 2017).

2.6.1 Mikrobiologischer Status von Wildfleisch

Der mikrobiologische Status ist bei der Einschätzung der Fleischhygiene unerlässlich. Es wird davon ausgegangen, dass alle Körperteile von Tieren, die mit der Umwelt unmittelbar in Kontakt stehen, und alle Organe, die in der Immunabwehr eine wichtige Rolle spielen, am lebenden Tier mikrobiologisch belastet sind. Das Muskelfleisch ist dagegen bei einem gesunden und ausgeruhten Tier meist keimarm (Wacheck, 2008; Fehlhaber und Janetschke, 1992; Holzapfel, 1996; Krämer, 2002). Eine Kontamination des Fleisches erfolgt größtenteils auf dem sekundären Weg, bei dem das Fleisch während des Schlachtvorganges/ Erlegens, der Fleischgewinnung und –verarbeitung mit Mikroorganismen aus seiner Umwelt kontaminiert wird (Wacheck, 2008). Mehrere Studien wurden über die Bedeutung des hygienischen und mikrobiologischen Status von Wildfleisch veröffentlicht (Coburn *et al.*, 2005; Lillehaug *et al.*, 2005; Casoli *et al.*, 2005; Deutz *et al.*, 2000). Nach ordnungsgemäßer Erlegung und zügiger Versorgung des Wildes befindet sich das Wildfleisch in einem guten hygienischen Zustand, der Keimgehalt des Wildbrets ist relativ gering und die Werte liegen in den meisten Fällen innerhalb des gesetzlichen Rahmens für geschlachtete Haustiere gemäß der Verordnung über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel (VO (EG) 2073/2005) (Atanassova *et al.*, 2008; Lenz, 1977; Scherling und Ring, 1989). Die Flora des Wildbrets wird jedoch durch Erlegungsart (Jagdart und Treffersitz), dem Zeitpunkt und der Art des Aufbrechens, dem Transport und der Lagerung sowohl quantitativ als auch qualitativ verändert (Brodowski und Beutling, 1998; Atanassova *et al.*, 2008; Deutz *et al.*, 2006; Ziegenfuss, 2003; Deutz *et al.*, 2000; Schiefer 1996; Lenze 1977; Kappelhoff, 1999). Dabei kommen vor allem, Mikroorganismen der Familien *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae* und *Bacillaceae* vor, wobei die quantitativen Veränderungen vom Anfangskeimgehalt abhängig sind (Riemer und Reuter, 1979; Schiefer, 1996). Die Beeinflussung der mikrobiellen Flora des Wildbrets durch die Erlegungsart (Jagdart und Treffersitz) unterliegt beim Schwarzwild einem zusätzlichen Risiko. Denn lt. BJagdG §19 ist die Nachtjagd zwar u. a. auf Schalenwild verboten, eine Ausnahme gilt jedoch für das

Schwarzwild. Dies erhöht das Risiko von unzureichend angebrachten Schüssen durch widrige Sichtverhältnisse und eventuelle Nachsuchen, die ein ordnungsgemäßes Versorgen des Wildes zeitlich stark verzögern können.

Aktuell liegen nur wenige Arbeiten vor, die Aussagen zur Prävalenz des *Enterobacteriaceae*-Familien-Vertreters *Yersinia pseudotuberculosis* in Wild geben, insbesondere unter Anwendung kultureller Nachweismethoden (Arrausi-Subiza *et al.*, 2016; Sannö *et al.*, 2014; Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2009). Des Weiteren ist ein Vergleich dieser Studien unter Vorbehalt zu tätigen, da häufig verschiedene Versuchskonzepte und vor allem unterschiedliche Nachweismethoden Anwendung fanden. Beispielsweise wurde berichtet, dass 62,6% von 763 Wildschweinen Anti-*Yersinia*-Antikörper enthielten, was darauf hindeutet, dass *Y. pseudotuberculosis* in deutschen Wildschweinen vorkommen kann (Al Dahouk *et al.*, 2005). Eine Prävalenz von 25 % wurde in Spanien mittels PCR ermittelt (Arrausi-Subiza *et al.*, 2016). Eine Kombination aus Kultivierung und PCR-Analyse wurde verwendet, um die Prävalenz (20%) von *Y. pseudotuberculosis* bei Wildschweinen in Schweden zu bestimmen (Sannö *et al.*, 2014). In der Schweiz wurden Tonsillen und Fäkalien von 153 Wildschweinen untersucht. Die Autoren detektierten *Y. pseudotuberculosis* in 20% bzw. 3% der Tiere durch PCR bzw. kulturelle Methoden (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2011). Dies zeigt, dass die Isolierung dieser Art schwierig ist, da eine zuverlässige kulturelle Nachweismethode noch fehlt. Aus diesem Grund wird im folgenden Kapitel (Kap. 2.7) eine kurze Übersicht über die wichtigsten diagnostischen Verfahren gegeben.

2.7 Diagnostik

Bei Feststellung einer Yersiniose werden Yersinien häufig aus Stuhl, Darmbiopsiematerial, Blut oder Probenmaterial aus lokalen Entzündungsherden nachgewiesen. Der Nachweis in Lebensmitteln und Umweltproben gestaltet sich dagegen häufig schwierig (Fredriksson-Ahomaa und Wacheck, 2011).

2.7.1 Kulturelle Nachweismethoden

Ein zuverlässiger Nachweis von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* kann laut BIOHAZ-Gremium nicht alleinig durch molekularbiologische Methoden (z. B. PCR) erbracht werden. Eine Isolierung der Bakterien ist wesentlich für die Bestätigung und die Charakterisierung. Daher sollten beispielsweise positive PCR-Ergebnisse immer durch Kulturmethode untermauert werden (European Food Safety Authority, 2007). Die Isolierung von enteropathogenen Yersinien ist bis heute mit einem hohen zeitlichen Aufwand verbunden, der vor allem durch lang andauernde Inkubationsschritte begründet ist (Fredriksson-Ahomaa und Korkeala, 2003). Des Weiteren gelingt der kulturelle Nachweis bei *Y. enterocolitica* zuverlässiger als bei *Y. pseudotuberculosis*, wobei lediglich für *Y. enterocolitica* ein standardisiertes Verfahren (DIN EN ISO 10273) vorliegt. Obwohl diese Methoden für die Isolierung von *Y. enterocolitica* geeignet sind und nicht optimal für die Isolierung von *Y. pseudotuberculosis*, werden sie derzeit für den Nachweis und zu Überwachungszwecken empfohlen (European Food Safety Authority, 2007). Aus diesem Grund und in Betracht des Schwerpunktes dieser Arbeit soll in diesem Kapitel der kulturelle Nachweis von *Y. pseudotuberculosis* im Vordergrund stehen.

Unverzichtbar für den kulturellen Nachweis von *Y. pseudotuberculosis* ist die Verwendung von selektiven Nährmedien, die die teilweise hohe Begleitflora unterdrücken. Gewöhnlich wird zur Isolierung CIN-Agar (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar) verwendet. Dieser unterdrückt das Wachstum von *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella* und *Proteus* genügend und verleiht den *Yersinia*-Kolonien ein charakteristisches Aussehen, was einen positiven Effekt auf die Wiederfindungsrate haben kann (Schiemann, 1979). Allerdings sind Kolonien von *Citrobacter*, *Serratia* und *Enterobacter* auf diesem Agar nicht eindeutig von *Yersinia*-Kolonien zu unterscheiden (Head *et al.*, 1982). Des Weiterhin ist eine Spezies-Unterscheidung innerhalb der Yersinien nur bedingt möglich (Janda und Abbott, 1998). Nach einer ungefähr 48 stündigen Inkubation bei 28-30 °C bilden sich kleine (<1 mm), rote bis violettfarbene Kolonien, die häufig einen helleren Kranz mit dunklerem Kern, dem sogenannten „Bullseye“ aufweisen. Das Wachstum einiger

Y. pseudotuberculosis-Stämme kann jedoch auch durch CIN-Agar inhibiert werden. Aus diesem Grund wird in einigen Fällen der weniger selektive MacConkey-Agar als zweites Agarmedium verwendet (Fukushima und Gomyoda, 1986; Fredriksson-Ahomaa und Wacheck, 2011).

Um die Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* auf dem Festmedium zu verbessern, ist es von Vorteil, die meist geringe Ausgangskonzentration der Yersinien mit Hilfe einer vorhergehenden Anreicherung zu vervielfachen. Für diesen Schritt stehen verschieden stark selektive Flüssig-Anreicherungsmedien zur Verfügung (z. B. Irgasan-Ticarcillin-Chlorat, Pepton-Sorbitol-Gallensalz, modifizierte Rappaport Bouillon, phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Sorbit und Gallensalzen etc.). Die Anreicherung wird bei einer Inkubationstemperatur von ungefähr 25 °C durchgeführt. Optional kann eine Anreicherung lt. DIN EN ISO 10273 auch bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C erfolgen. Die Inkubationsdauer erhöht sich mit abnehmender Inkubationstemperatur. Dabei wird die psychrotrophe Wachstumseigenschaft der Yersinien als Selektionsvorteil gegenüber Mikroorganismen aus der Begleitflora genutzt (Bundesministerium für Gesundheit, 1999).

Eine anschließende Alkalibehandlung der Anreicherungskultur mit einer 0,25 % igen - 0,5 % igen Kalilauge (KOH-Behandlung) noch vor dem Ausstrich auf das Festmedium wirkt ebenfalls hemmend auf die Begleitflora. Yersinien zeigen im Vergleich zu anderen gramnegativen Bakterien eine höhere Toleranz gegenüber alkalischen Lösungen (Aulisio *et al.*, 1980). Jedoch berichten einige Autoren über eine erhöhte Anfälligkeit von *Y. pseudotuberculosis* gegenüber einer KOH-Behandlung (Aulisio *et al.*, 1980; Fukushima, 1985; 1992).

2.7.2 Molekularbiologische Nachweismethoden

Neben kulturellen Nachweisverfahren stellen molekularbiologische Methoden häufig eine schnelle, empfindliche und spezifische Nachweismöglichkeit dar. Die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) ist dabei eine der gebräuchlichsten Methoden zum Nachweis von pathogenen *Yersinia*-Arten (Arrausi-Subiza *et al.*, 2014). Obwohl bereits eine Vielzahl von verschiedenen PCR-Methoden für den

Nachweis von *Y. enterocolitica* in Lebensmittel- und Umweltproben entwickelt wurden, existieren nur wenige für den speziellen Nachweis von *Y. pseudotuberculosis* (Tab. 3) (Skurnik *et al.*, 2009).

2.7.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)/ Real-Time-PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) beruht auf der gezielten *in vitro* Amplifikation von spezifischen DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Abschnitten, die zur Identifikation des untersuchten Bakteriums beitragen, da diese Abschnitte spezifisch für bestimmte Gattungen, Arten oder Serotypen sein können. Neben der konventionellen PCR, die lediglich eine qualitative Aussage ermöglicht, ist mit der Real-Time-PCR auch eine quantitative Aussage realisierbar. Dazu binden bei der Real-Time-PCR Fluorophor-markierte Gensonden spezifisch an eine komplementäre Sequenz des amplifizierten DNA-Strangs. Die Quantifizierung erfolgt dann über eine fortlaufende Messung in „Echt-Zeit“ der proportional zur Menge der PCR-Produkte ansteigenden Fluoreszenz.

Tabelle 3: PCR-Methoden zum Nachweis von *Y. pseudotuberculosis*

Gen	Probenmaterial	PCR-Methode	Referenz
Plasmid			
<i>virF</i>	Wasser	PCR	Nakajima <i>et al.</i> , 1992
Chromosom			
<i>ail</i>	Fleisch, Milch, Frischware	Real-Time-PCR	Thisted-Lambertz <i>et al.</i> , 2008
<i>inv</i>	Wasser	PCR	Nakajima <i>et al.</i> , 1992
<i>wzz</i>	Reinkultur	Real-Time-PCR	Mateo <i>et al.</i> , 2009
<i>wzz</i>	Reinkultur	PCR	Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003

Nukleinsäure-basierende Methoden sind häufig kosten- und arbeitsintensiv, und der direkte DNA-Nachweis aus klinischen Proben ist anfällig für Verunreinigungen und teilweise schwer standardisierbar (Wieser *et al.*, 2012; Ayyadurai *et al.*, 2010). Nachweistechiken wie die MALDI-TOF-Massenspektrometrie stellen diesbezüglich eine alternative bzw. ergänzende Diagnostik-Technologie zu herkömmlichen PCR-Verfahren dar.

2.7.2.2 MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)

Eine der neueren Nachweistechiken ist die MALDI-TOF-Massenspektrometrie mit schnellen Identifizierungsergebnissen und einem zeitlichen Vorteil gegenüber herkömmlichen biochemischen und molekularbiologischen Methoden. Im Idealfall werden der Nachweis durch mikrobiologische Methoden, PCR-basierende Methoden und MALDI-TOF-MS erbracht. Die Technik basiert auf dem Nachweis von mikrobiellen Proteinmustern und liefert damit ergänzende Informationen zu klassischen mikrobiologischen oder Genotypisierungsmethoden (Lasch *et al.*, 2010). Bei der MALDI-TOF-MS wird Koloniematerial mit einer niedermolekularen Matrix gemischt und anschließend mit einem Laser beschossen. Über die Absorption der Laserstrahlung werden in der Matrix energiereiche Ionen gebildet. Diese geben ihre Energie an die eigentliche Probe ab, die in Fragment-Ionen zerfällt. Letztere werden desorbiert, über ein elektromagnetisches Feld beschleunigt und in einem feldfreien Flugrohr definierter Länge dem Detektor zugeführt. Es erfolgt eine Auftrennung des Ionengemisches, wobei kleinere, leichtere Ionen schneller am Detektor auftreffen (Engelmann und Kugler, 2012). Die ankommenden Signale werden in Abhängigkeit ihrer Flugzeit (Time of Flight) zu einem Finger-print-Massenspektrum umgeschrieben und mit zuvor gesammelten Massenspektren aus einer Datenbank verglichen (Ayyadurai *et al.*, 2010; Lasch *et al.*, 2010). Da sich Mikroorganismen in ihren Massenspektren unterscheiden, bietet dies die Grundlage für eine Keimidentifizierung (Engelmann und Kugler, 2012). In den Untersuchungen von Lasch *et al.* (2010) wurde gezeigt, dass

Massenspektralprofile innerhalb der Gattung *Yersinia* konsistente und relativ homogene Peakmuster enthalten. Einige dieser Peaks wurden in keinem der anderen untersuchten *Enterobacteriaceae*-Vertreter gefunden. Des Weiteren wurden beispielhafte Massenspektren der drei pathogenen Yersinien (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*) gegenübergestellt. Aufgrund einer Detektion von 50-100 diskreten Ionen (Unterscheidung im Verhältnis Masse zur Ladung (m/z)) je Massenspektrum konnten ebenfalls markante Unterscheidungsmerkmale im Peakmuster der Gattungsverteter festgestellt werden (Abb. 3).

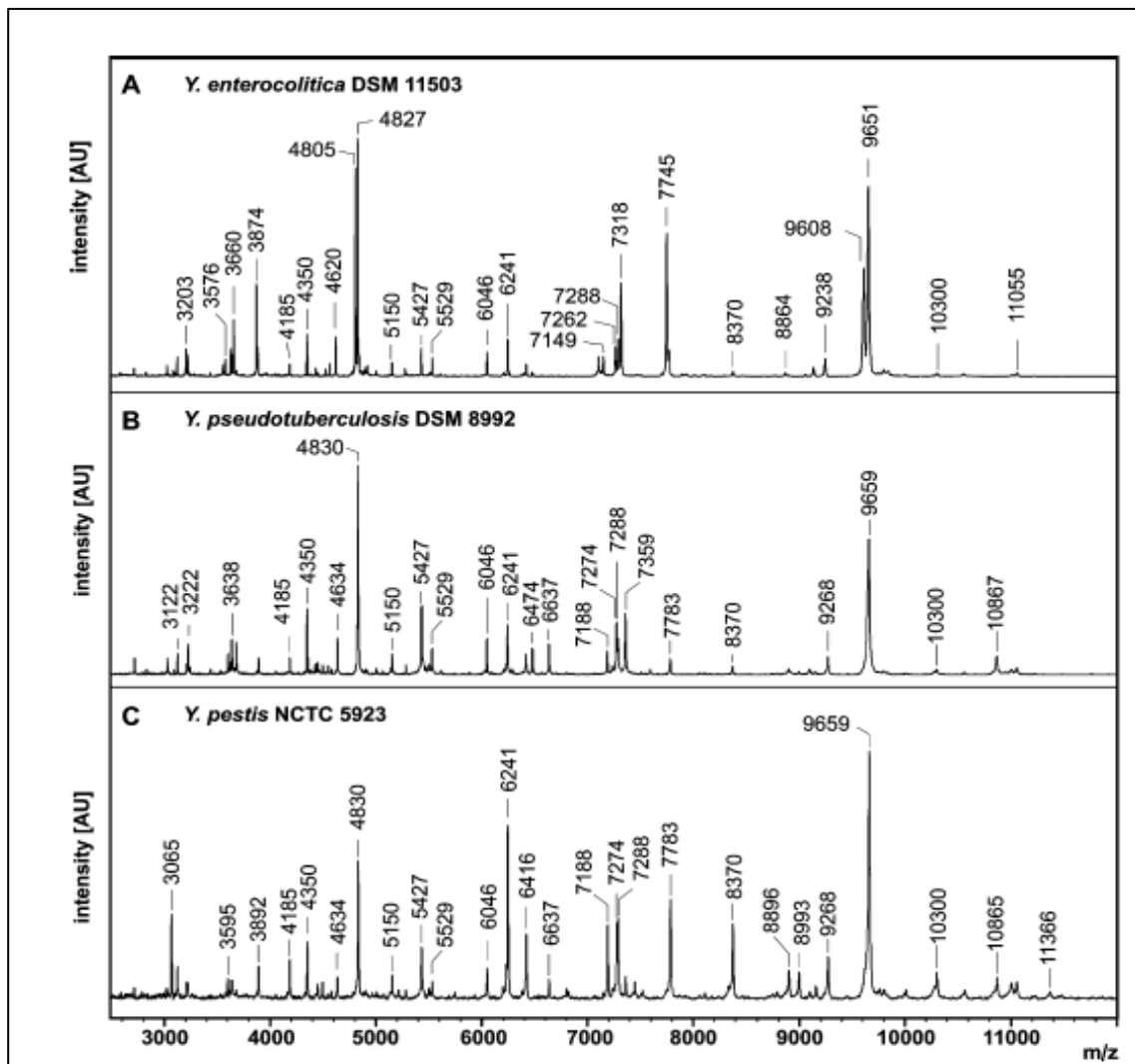


Abbildung 3: Vergleich dreier Massenspektren der pathogenen Yersinien. Gezeigt sind die Massenspektren von *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*, zwischen m/z 2500 und m/z 12000 (Lasch *et al.*, 2010).

2.7.3 Biochemische und serologische Identifizierung

Zur biochemischen Identifizierung von Yersinien sind mehrere kommerzielle Testsysteme erhältlich (z. B. VITEK GNI, API E20 u. a.). Sie alle beruhen auf dem Nachweis biochemischer Eigenschaften der Bakterien und ermöglichen sowohl eine Spezies-Unterscheidung innerhalb der Gattung *Yersinia*, als auch eine Zuordnung zum jeweiligen Biotypen. Anders als bei *Y. enterocolitica* wird

die biochemische Differenzierung in Biotypen aufgrund der unklaren klinischen Relevanz nur selten bei *Y. pseudotuberculosis* angewandt.

Die serologische Identifizierung beruht auf der Unterscheidung von Antigen-Eigenschaften auf der Bakterienzelloberfläche. *Y. pseudotuberculosis* wird in 15 O-Serotypen unterteilt. Zusätzlich werden die Serotypen O: 1 und O: 2 in die Subtypen a, b und c und die Serotypen O: 4 und O: 5 in die Subtypen a und b differenziert, sodass insgesamt zwischen 21 Serotypen unterschieden werden kann (Bogdanovich *et al.*, 2003). Klassischerweise erfolgt die serologische Identifizierung von *Y. pseudotuberculosis* durch die Objektträger-Agglutination mit Serotyp-spezifischen Antiseren. Die Herstellung eines zuverlässigen Satzes spezifischer Antiseren ist jedoch ein langwieriger Prozess. Denn um typspezifische Antiseren zu produzieren, werden eine Reihe von *Y. pseudotuberculosis*-Referenzstämmen verwendet, um Kaninchen zu immunisieren. Die Kaninchen-Immunsereen werden dann an bestimmten Stämmen absorbiert, um kreuzreagierende Antikörper zu entfernen (Tsubokura und Aleksic, 1995). Deshalb werden in mikrobiologischen Laboratorien routinemäßig nur die im Handel erhältliche Antiseren verwendet, um die am häufigsten isolierten Serotypen (O: 1 und O: 3) zu identifizieren. Daher bleibt eine wesentliche Anzahl von Stämmen untypisiert. Des Weiteren ist dieses herkömmliche Serotypisierungsverfahren nicht in der Lage, raue *Y. pseudotuberculosis*-Stämme zu typisieren (Bogdanovich *et al.*, 2003).

Eine Alternative zur herkömmlichen Serotypisierungsmethode stellen die PCR-Assays der Arbeitsgruppe um Bogdanovich (2003) dar. 18 der 21 bekannten Serotypen, einschließlich der am häufigsten zirkulierenden Serotypen können mit einer Multiplex-PCR identifiziert werden. Mit Hilfe einer Doppel-PCR können zwei weitere Serotypen (O: 7 und O: 10) erkannt werden, und der letzte Serotyp (O: 9) kann mit einer dritten, einzelnen PCR bestätigt werden.

2.7.4 Prüfung auf Pathogenität

Die Pathogenität von *Y. pseudotuberculosis* hängt von der Anwesenheit des 70 kb-Virulenzplasmides pYV ab (Kap. 2.4.1) (Gemski *et al.*, 1980; Fukushima *et al.*, 2001; European Food Safety Authority, 2007). Dieses Plasmid ist für die Virulenz essentiell und seine Anwesenheit unterscheidet pathogene von nicht-pathogenen Yersinien (Fukushima *et al.*, 2001). Zusätzlich besitzen fast alle europäischen Stämme von *Y. pseudotuberculosis* Serotyp O: 1 eine Pathogenitätsinsel, die als Hochpathogenitätsinsel (HPI) bezeichnet wird. Fast alle fernöstlichen Stämme von *Y. pseudotuberculosis* produzieren ein superantigenes Toxin, das als *Y. pseudotuberculosis*-abgeleitetes Mitogen (YPM) bezeichnet wird (Kap. 2.4.2).

Eine einfache kulturelle Nachweismethode, um die Anwesenheit von pYV zu überprüfen, ist das von Riley und Toma (1989) beschriebene Verfahren. Dafür wird ein spezifisches Nährmedium, der CR-MOX (Kongorot- Magnesium-Oxalat) Agar verwendet, der die Detektion der Kongorot-Bindungsfähigkeit und des calciumabhängigen Wachstums pathogener Yersinien bei 37°C auf derselben Platte erlaubt. Durch diese zwei plasmidkodierte Eigenschaften können auf dem CR-MOX-Agar anhand der Koloniemorphologie plasmidtragende und plasmidlose Isolate unterschieden werden. Plasmidlose Zellen bilden farblose Kolonien, wohingegen plasmidtragende Kolonien klein und rot sind (Cox, 2016).

Des Weiteren ist eine Vielzahl von PCR-Verfahren entwickelt worden, um sowohl chromosomale als auch plasmidlokalisierte Zielgene zu detektieren, die von Bedeutung bei der Ausprägung der Pathogenität sind (Tab. 4).

Tabelle 4: PCR-Methoden zum Nachweis pathogenitätsrelevanter Gene für *Y. pseudotuberculosis*

Zielgen	Detektion von	Referenz
<i>inv</i>	Inv	Nakajima <i>et al.</i> , 1992; Thoerner <i>et al.</i> , 2003
<i>virF</i>	pYV	Nakajima <i>et al.</i> , 1992; Fukushima <i>et al.</i> , 2001
<i>yadA</i>	pYV	Thoerner <i>et al.</i> , 2003
<i>virF/lcrF</i>	pVY	Thoerner <i>et al.</i> , 2003
<i>ypmA</i>	YPMa	Fukushima <i>et al.</i> , 2001
<i>ypmB</i>	YPMb	Fukushima <i>et al.</i> , 2001
<i>IS100, psn, yptE, irp1, irp2, ybtP- ybtQ, ybtX-ybtS, int, asnT-int</i>	HPI	Fukushima <i>et al.</i> , 2001

3 Ziel der Arbeit

Wie oben dargestellt ist *Y. pseudotuberculosis* neben *Y. enterocolitica* Verursacher der Yersiniose, der dritthäufigsten bakteriellen Magen-Darm-Erkrankung in Deutschland und Europa. Über das Vorkommen von *Y. pseudotuberculosis* ist nur wenig bekannt. Ein Grund hierfür ist die Schwierigkeit, diese Spezies zu isolieren. Methoden, die für die Isolierung von *Y. enterocolitica* entwickelt wurden, sind für *Y. pseudotuberculosis* nicht gut geeignet. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Methodik zur Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* zu optimieren. Mit Hilfe eines neu entwickelten Protokolls sollten dann Prävalenz-Studien zum Vorkommen von *Y. pseudotuberculosis* in Wildschwein-Tonsillen durchgeführt werden. Dazu wurden ca. 500 Wildschweine aus Regionen mit besonders hohem Schwarzwild-Vorkommen in Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern untersucht. Die gewonnenen Isolate sollten eingehend charakterisiert und hinsichtlich ihres pathogenen Potenzials untersucht werden. Abschließend sollte die Verwandtschaft der Isolate analysiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Bakterienstämme

Y. pseudotuberculosis-Stämme, die für die Untersuchung verwendet wurden, wurden der Stammsammlung des *Yersinia*-Konsiliarlabors des BfR entnommen.

Tabelle 5: Verwendete *Y. pseudotuberculosis* Referenz- und Kontrollstämme

Stammbezeichnung	Serotyp	Herkunft
PS 11	O:1a	unbekannt
PS 12	O:1a	unbekannt
PS 24	O:1b	Birkhuhn
PS 27	O:1b	Kanarienvogel
PS 28/ IP 32953	O:1b	Mensch
PS 14	O:2a	unbekannt
PS 6	O:2a	Rebhuhn
PS 43	O:2b	unbekannt
PS 21	O:3	unbekannt
PS 57	O:3	unbekannt
PS 65	O:3	Braunohrassari
PS 16	O:4b	unbekannt
PS 3	O:5a	unbekannt
PS 58	O:5a	unbekannt
PS 15	O:6	unbekannt
PS 44	O:6	unbekannt

4.1.2 Probenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gaumensegelmandeln (*Tonsilla veli palatini*) von insgesamt 503 Stücken Schwarzwild auf das Vorhandensein von *Y. pseudotuberculosis* untersucht. Die Zusammensetzung der untersuchten Wildschweinstrecke ist in Tabelle 6 aufgelistet. Eine genauere Unterteilung der Schwarzwildstrecke ist im Kaptitel 5.4.1 aufgeführt.

Tabelle 6: Zusammensetzung der untersuchten Wildschweinstrecke nach Geschlecht

Anzahl der beprobten Stücke	
männlich	weiblich
248 (49,3 %)	255 (50,7 %)
Gesamt 503 (100 %)	

4.1.3 Enzyme

Tabelle 7: Verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller
Lysozym	Thermo Fisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
NotI	Thermo Fisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Proteinase K	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
XbaI	Thermo Fisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland

4.1.4 Reaktionskits, Antibiotika-Testkits

Tabelle 8: Verwendete Reaktionskits

Reaktionskit	Hersteller
MSB® Spin PCRapace	STRATEC Molecular GmbH, Deutschland
Nextera XT DNA sample preparation kit	Illumina, San Diego, USA
PureLink genomic DNA minikit	Invitrogen, Carlsbad, USA
RTP® Bacteria DNA Mini Kit	STRATEC Molecular GmbH, Deutschland
Sensititre™ Gram-negative MIC-Platte EUVSEC	Thermo Fisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Sensititre™ Gram-negative MIC-Platte EUVSEC2	Thermo Fisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland

4.1.5 Genomsequenzen

Tabelle 9: Herkunft der verwendeten Referenz-Genomsequenzen

Accession-Number/ Locus tag	Target-Gen
A7056092	<i>yadA</i>
HE805268	<i>virF</i>
AF335466	<i>ypmA</i>
NC_006155	<i>ail, inv</i>
AF418982	<i>ypmB</i>
AF414083	<i>ypmC</i>
BX936398	IS100, <i>psn, yptE, irp1, irp2, ybtP-ybtQ, ybtX-ybtS, int, asnT-int</i>

4.1.6 DNA-Längenstandards, Nukleotide

Tabelle 10: Verwendete DNA-Längenstandards

DNA-Längenstandard, Nukleotide	Hersteller
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland

4.1.7 Chemikalien

Tabelle 11: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
GelRed™	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HCCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic-acid-Matrix)	Bruker Daltonik GmbH
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
peqGold Universal Agarose	peqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
SEAKem GTG Gold Agarose	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Thioharnstoff	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

4.1.8 Primer

Tabelle 12: Verwendete Primer

Primer	Target-Gen	Sequenz 5'→3'	Referenz
Ypf 20210 Ypr 20538	<i>wzz</i>	GGTGATGAGCAAGTTCAAG GCTAAATCCACTGCTCGCTG	Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003
9A-ail 10A-ail	<i>ail</i>	TTATCAATTGCGTCTGTTAATGT GTA ATCGAGTTTGGAGTATTCATATG AAG	Novoslavskij <i>et al.</i> , 2010
Inv-F Inv-R	<i>inv</i>	CGGTACGGCTCAAGTTAATCTG CCGTTCTCCAATGTACGTATCC	Thoerner <i>et al.</i> , 2003
11A-virF 12A-virF	<i>virF</i>	GGCAGAACAGCAGTCAGACATA GGTGAGCATAGAGAATACGTCG	Thoerner <i>et al.</i> , 2003
Ypf-14159 Ypr-15549	<i>gmd- fcl</i>	TCAAGATCGCCATGAGAC AGGTTCAATTCGTTGGTTC	Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003
Ypf-5270 Ypr-6342	<i>ddhC-prt</i>	CGCATAGAAGAGTTTGTG CTTTCGCCTGAAATTAGAC	Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003

Primer	Target-Gen	Sequenz 5'→3'	Referenz
Ypf-18740 Ypr-19703	<i>manB</i>	GCGAGCCATAACCCAATAGAC GCCACCCATCAAATTCCATAC	Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003
Abe1 Abe2	<i>abe</i>	AGAATAGTTCTGACTGGAGGAA G TCAGGAGCCATTACCTCATC	Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003
Ypf-17770 Ypr-18414	<i>wbyL</i>	TTGGAGAAACAAACCTATCTGG TTTGCATAAAAACGACATAGGC	Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003
Ypf-7170 Ypr-7698	<i>wbyH</i>	CGTTATCCCAAAAAAGAGG ATGGGAGACGCTTGTGATG	Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003
Ypf-3057 Ypr-3464	<i>ddhA-B</i>	TGTCGCCTAAAGTTATCG CGAATATCACCGATTTCC	Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003
Ypf-13231 Ypr-13538	<i>wbyK</i>	CCGATTACCAGATTTTGAC CAAATTCTTATAACCACCACG	Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003
Ypf-8576 Ypr-8681	<i>wzx</i>	GAAATTCGCATGTAAAAGCTATT G GAACCTAGACTTACCACCCCA AC	Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003
Ypf-20511 Yerfb2	<i>wzz-gsk</i>	GAAAAATACAGCGAGCAG GAYTTGCGYTTACCAGGAAATTT CATTG	Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003
Ypf-913 Ypr-1094	<i>hemH-ddhD</i>	CAATCCAATGAAGAGTCAG CCCTATGACATAAAAACCC	Bogdanovich <i>et al.</i> , 2003

Primer	Target-Gen	Sequenz 5'→3'	Referenz
YPMa-F YPMa-R	<i>ypmA</i>	CACTTTTCTCTGGAGTAGCG GATGTTTCAGAGCTATTGTT	Fukushima <i>et al.</i> , 2001
YPMb-F YPMb-R	<i>ypmB</i>	TTTCTGTCATTACTIONGACATTA CCTCTTTCCATCCATCTCTTA	Fukushima <i>et al.</i> , 2001
YPMc-F YPMc-R	<i>ypmC</i>	ACACTTTTCTCTGGAGTAGCG ACAGGACATTTTCGTCA	Fukushima <i>et al.</i> , 2001
IS100-F IS100-R	IS100	ATTGATCCACCGTTTTACTC CGAACGAAAGCATGAAACAA	Fukushima <i>et al.</i> , 2001
psn-F psn-R	<i>psn</i>	CTTCCACCAACACCATCC AAACCGCCACTTCGCTTC	Fukushima <i>et al.</i> , 2001
yptE	<i>yptE</i>	CCCTTACCCATTGCCGAAC TCCCCACCTCATCCAGCC	Fukushima <i>et al.</i> , 2001
irp1-F irp1-R	<i>irp1</i>	AGAAACCGATGCTCACCC TCCTCTCCTGACGTAGCC	Fukushima <i>et al.</i> , 2001
irp2-F irp2-R	<i>irp2</i>	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC TCGTCCGGGCAGCGTTTCTTCT	Fukushima <i>et al.</i> , 2001
ybtP-ybtQ-F ybtP-ybtQ-R	<i>ybtP- ybtQ</i>	GCCGGGAACGTCAAAGAA AGGTGAGCTTTCATGTGCCT	Fukushima <i>et al.</i> , 2001
ybtX-ybtS-F ybtX-ybtS-R	<i>ybtX- ybtS</i>	TCAGTCGAATGTGAAACCGC GCAGCCGTGCCTGGCACCCCTT	Fukushima <i>et al.</i> , 2001

Primer	Target-Gen	Sequenz 5'→3'	Referenz
int-F int-R	<i>int</i>	TGCGCCATGCGGTCCATC GGTGCATAAGATTCTCGG	Fukushima <i>et al.</i> , 2001
asnT-int-F asnT-int-R	<i>asnT-int</i>	ATCGCTTTGCGGGCTTCTAGGT GAACGGCGGACTGTTAAT	Fukushima <i>et al.</i> , 2001
mdh-9091F mdh-9171R	<i>mdh</i>	CCCAGCTTCCTTCAGGTT AGCACTCAGTTTACCGAT	Ch'ng <i>et al.</i> , 2011
gyrB-9169F gyrB-9170R	<i>gyrB</i>	TGGTATTCGAGGTTGTGG TTCAGGGTACGGGTCATC	Ch'ng <i>et al.</i> , 2011
fumC-9167F fumC-9168R	<i>fumC</i>	GATGATGTCAATAAAAAGCC GCAGTGCTCATTA AAAACC	Ch'ng <i>et al.</i> , 2011
sucA-9173F sucA-9174R	<i>sucA</i>	TTCAATGTCGGTTCTTTT CGCGCATCCAGTGGGTTT	Ch'ng <i>et al.</i> , 2011
pgi-9144F pgi-9145R	<i>pgi</i>	TTTGCCAAGGACGACCAG CAACCGACAAGGCGATAG	Ch'ng <i>et al.</i> , 2011
recA-9172F recA-9147R	<i>recA</i>	TGTTGAAACCATCTCTAC TGGCATTGGCTTTACCCT	Ch'ng <i>et al.</i> , 2011
aroC-9148F aroC-9166R	<i>aroC</i>	GGCATTCCGATTACCGAG GCCGATTGATAGTTTGCC	Ch'ng <i>et al.</i> , 2011

Tabelle 13: Generierte Sequenzierungsprimer, Synthese erfolgte durch Metabion international AG

Primer	Target- genbereich	Sequenz 5'→3'
irp2_77F irp2_841R	<i>irp2</i>	AGCGGCTCATACAGGAACTG GGAAATCATAGCGGGTGTC
irp2_740F irp2_1602R	<i>irp2</i>	TGCTGATTATGGATGCCTC TTCGTCATCGCAGAGTTGG
irp2_1499F irp2_2268R	<i>irp2</i>	TCTGGCTACAATGGGACAGC AAAATGTAGGGCGGAGAGG
irp2_2160F irp2_2894R	<i>irp2</i>	AGGGGTAGTCATTTCTCACC ACTTTGACCTGCTTGTCGC
irp2_2722F irp2_3269R	<i>irp2</i>	TTATGGATTGGCGGCATTGGGG AATGCTAACCAGCGTTCCACCAG
irp2_upF irp2_360R	<i>irp2</i>	AGTTTGGCGTAACCCCTTCG TACTGGCGTCAATGGGAAGG
inv_M91_upF inv_M91_605R	<i>inv</i>	TGATGCTAACGCACCGCAAC ACGGCATAAGGGTTGCGTTG
inv_M129_824F inv_M129_1558R	<i>inv</i>	TGGAGTATCAGAAACAGCAGG GGTCCCCATAGGTATCCTTC
inv_M129_1800F inv_M129_2328R	<i>inv</i>	TGATGGCACGATGAGTTCC CCACCGATTTGGGTAGAAC
inv_M129_2085F inv_M129_downR	<i>inv</i>	CGCTACGGATAAAGGGTTC TGGCAGTCTTGAATACCCGC

4.1.9 Medien

Die Nährmedien wurden aus der hauseigenen zentralen Nährbodenküche des BfR bezogen. Die Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Medien erfolgte nach DIN EN ISO 10273. Da die Lysogeny-Broth, das Kongorot-Magnesium-Oxalat-Nährmedium und das modifizierte Rappaport-Nährmedium nicht in der DIN EN ISO 10273 aufgeführt sind, wurden diese Medien nach den in der Tabelle 14 genannten Referenzen hergestellt.

Tabelle 14: Verwendete Medien

Medium	Referenz
Kongorot Magnesium Oxalat- Nährmedium (CR-MOX)	Riley und Toma, 1989
Lysogeny Broth (LB)	Bertani, 1951
Modifiziertes-Rappaport-Nährmedium (MRB)	Wauters, 1973
Mueller Hinton II Bouillon	Mueller und Hinton, 1941

4.1.10 Lösungen und Puffer

Tabelle 15: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung	Rezept
1 M TRIS-HCl-Lösung, pH 8	157,6 g TRIS-HCl, ad 1 L Aqua bidest.
20 % SDS-Lösung	20 g SDS, ad 100 ml Aqua bidest.
250 mM EDTA-Lösung, pH 8	93,06 g EDTA, ad 1 L Aqua bidest.
Lysozym-Stammlösung	100 mg Lysozym, ad 10 ml Aqua bidest.
Proteinase K-Lösung	500 mg Proteinase K, ad 25 ml Aqua bidest.
10 % L-Laurylsarcosine-Lösung	10 g L-Laurylsarcosine, ad 100 ml Aqua bidest.
Äquilibrier-Restriktionslösung	220 µl Cut Buffer H, 143 µl BSA (1 mg/ml), 1837 µl Aqua bidest.
1 x TE-Puffer, pH 8	10 ml 1 M TRIS-HCl, 4 ml 250 mM EDTA, ad 1 L Aqua bidest.
Lysis-Puffer	25 ml 1 M TRIS-HCl, 100 ml 250 mM EDTA, 50 ml 10 % L-Laurylsarcosine, 325 ml Aqua bidest.
0,5 x TBE-Puffer	130 ml 10 x TBE, ad 2,6 L Aqua bidest.

4.1.11 Geräte

Im folgenden Kapitel 4.1.11 sind die verwendeten Geräte aufgeführt. Es wurde auf eine Auflistung einer Labor-Standardausrüstung verzichtet.

Tabelle 16: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/ Verbrauchsmaterial	Hersteller
Agarosekammer Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Agarosekammer Agagel Maxi	Biometra GmbH, Deutschland
Blut-Agar-Platten	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Brutschrank Heraeus Typ B5060	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Mastercycler epgradient	Eppendorf AG, Deutschland
GFL Schüttelinkubator 3033	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Sterilwerkbank HERA safe HS 12	Biometra GmbH, Deutschland
UV Stratalinker™ 1800	Stratagene, Californien, USA
Geldokumentationssystem GEL iX20Imager	Intas, Göttingen, Deutschland
MALDI-TOF MS, Mikroflex	Bruker Daltonics, Billerica, USA
Pulsed Field Gel Electrophoresis Systems CHEF-DR® III Variable Angle System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Illumina MiSeq benchtop sequencer	Illumina, San Diego, USA
Densimat	bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich
BagMixer 400	Interscience, Saint Nom, Frankreich

Gerät/ Verbrauchsmaterial	Hersteller
Sensititre Autilnukulator	Thermo Fisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Sensititre Vizion Sytem TREK Diagnostic-Systems	Thermo Fisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Sensititre AIM™ Automated Inoculation Delivery System	Thermo Fisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland

4.1.12 Software

Tabelle 17: Software und Datenbanken

Software	Hersteller
flexControl real-time classification software (version 3.0)	Bruker Daltonics, Billerica, USA
MALDI Biotyper	Bruker Daltonics, Billerica, USA
Lasergene (v 14.0) software package	DNASStar, Madison, USA
Software tool CSI Phylogeny	Center for Genomic Epidemiology
PATRIC database	PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center
ArcGIS® software	Environmental Systems Research Institute Inc., Redlands, USA
Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine
MLST 1.8 analysis pipeline	Center for Genomic Epidemiology, Lyngby, Denmark

4.2 Methoden

4.2.1 Untersuchung einzelner Kultivierungsschritte zur Optimierung der Isolierung von *Yersinia pseudotuberculosis* aus tierischem Probenmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten *Y. pseudotuberculosis*-Stämme, sind in Tabelle 5 aufgelistet. Dabei stellen sie eine Auswahl von *Y. pseudotuberculosis*-Isolaten der bedeutendsten humanpathogenen Serotypen Deutschlands dar. Für den kulturellen Nachweis von *Y. pseudotuberculosis* existiert zurzeit noch keine einheitliche Methode. Die DIN EN ISO 10273, die auf den kulturellen Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* abzielt, enthält keine spezielle Methodik zum Nachweis von *Y. pseudotuberculosis*, wird jedoch zur Isolierung auch dieser Spezies verwendet. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen zum kulturellen Nachweisverfahren für *Y. pseudotuberculosis* in Anlehnung an die DIN EN ISO 10273 durchgeführt .

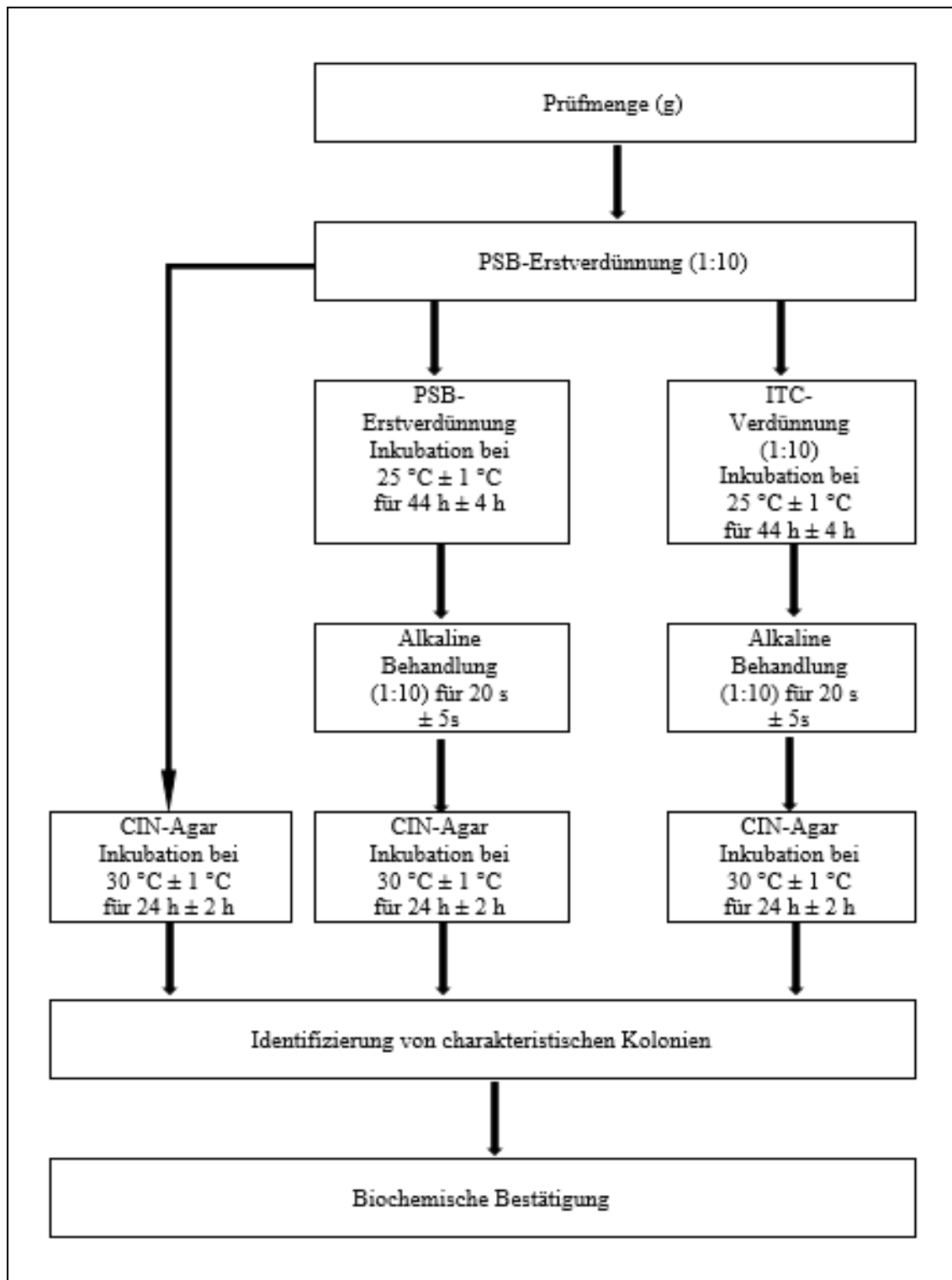


Abbildung 4: Verfahren zum kulturellen Nachweis von *Y. enterocolitica* nach DIN EN ISO 10273:2017-08 (International Organisation for Standardization, 2017)

4.2.1.1 Anreicherungsmedien für die Kälteanreicherung

Die Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* aus Lebensmittel-Matrizes wird aufgrund einer häufig massenhaft auftretenden Begleitflora erschwert. Die Kultivierung bei Kälte (4 °C) soll zu einer Anreicherung von *Y. pseudotuberculosis* und einer Verbesserung des Mengen-Verhältnisses zu den Begleitorganismen führen und basiert auf der psychophilen Lebensweise der Yersinien. Für eine Optimierung des Verfahrens wurde das Wachstumsverhalten von 16 *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen (Serotypen: O:1a, O:1b, O:2a, O:2b, O:3, O:4, O:5a und O:6) bei 4 °C in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (72 h, 168 h und 336 h) und unterschiedlich selektiver Anreicherungsmedien (Pepton-Sorbit-Gallensalz-Bouillon (PSB), Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Nährbouillon (ITC) und modifizierte Rappaport-Bouillon (MRB)) untersucht. Dazu wurden aus LB-Übernachtskulturen Kulturen mit 10^1 KBE/ ml in dem entsprechenden Anreicherungsmedium hergestellt und bei 4 °C für 72 h, 168 h und 336 h inkubiert. Das Ausplattieren auf Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar (CIN-Agar) diente zur Ermittlung der Lebendzellzahl.

Tabelle 18: Flüssig-Anreicherungsmedien und ihre Selektivität

Anreicherungsmedium	Selektivität
ITC (Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat)	hoch
PSB (Pepton-Sorbitol-Gallensalz-Bouillon)	niedrig
MRB (modifizierte Rappaport Bouillon)	hoch

4.2.1.2 Inkubationszeit/ Vorinkubation

Im Anschluss der Untersuchung der Medien für die Kälteanreicherung sollten mögliche Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen den verschiedenen Serotypen in PSB in Abhängigkeit der Inkubationsdauer bestimmt werden.

Dazu wurden aus LB-Übernachtskulturen der 16 *Y. pseudotuberculosis*-Stämme Kulturen mit einer Zellzahl von 10 KBE/ ml hergestellt und bei 4 °C für 72 h, 168 h und 336 h in PSB inkubiert. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte über das Ausplattieren auf CIN-Agar.

Des Weiteren wurde die Wirkung einer Vorinkubation auf das Wachstum der 16 *Y. pseudotuberculosis*-Stämme untersucht. Da *Y. pseudotuberculosis* eher langsam wachsend ist und dadurch von einer begleitenden Flora überwachsen werden kann, sollte herausgefunden werden, ob ein Vorinkubationsschritt bei Raumtemperatur vor der kalten Anreicherung das Wachstum von *Y. pseudotuberculosis* verstärken kann, was dessen Nachweis erleichtern könnte. Dazu wurden auch hier aus LB-Übernachtskulturen der 16 *Y. pseudotuberculosis*-Stämme Kulturen in PSB mit einer Zellzahl von 10 KBE/ ml hergestellt. Die Kulturen wurden erst für 6 h bei Raumtemperatur und anschließend für 10 Tage bei 4 °C inkubiert. Zur Ermittlung der Lebendzellzahl wurde Material der Kulturen mit Vorinkubation und der Kontroll-Kulturen ohne Vorinkubation auf CIN-Agar-Platten ausplattiert.

4.2.1.3 Festmedium

Das CIN-Agar-Medium gilt bei der Isolierung von enteropathogenen Yersinien als Goldstandard. Um zu überprüfen, inwiefern sich die antibiotisch wirkenden Bestandteile des CIN-Agar-Mediums (Cefsulodin, Irgasan und Novobiocin) auf das Wachstum von *Y. pseudotuberculosis* auswirken, wurden LB-Übernachtskulturen der 16 *Y. pseudotuberculosis*-Stämme (Serotypen: O:1a, O:1b, O:2a, O:2b, O:3, O:4, O:5a und O:6) mit einer Konzentration von 10⁷ KBE/ ml auf CIN-Agar-Platten ausplattiert. Der Ausstrich erfolgte auf Platten, die alle drei antibiotisch wirkenden Bestandteile enthielten und auf modifizierte CIN-Agar-Platten, bei denen jeweils eine antibiotisch wirkende Komponente

fehlte. Die Platten wurden für 48 h bei 28 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Lebendzellzahl-Bestimmung.

4.2.1.4 KOH-Behandlung

Die in der DIN EN ISO 10273 vorgesehene Behandlung mit einer Kaliumhydroxid (KOH)-Lösung soll zu einer Verminderung der Begleitflora führen, wohingegen *Yersinien* gegenüber alkalischen Lösungen eine Toleranz aufweisen. Wie das Wachstum von *Y. pseudotuberculosis* von einer KOH-Behandlung beeinflusst wird, ist in der derzeitigen Literatur nicht explizit beschrieben. Aus diesem Grund wurden sieben *Y. pseudotuberculosis*-Stämme (Serotyp O:1 bis O:5) hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens nach einer KOH-Behandlung untersucht.

Dazu wurden LB-Übernachtskulturen der 16 Stämme mit einer 0,25 prozentigen KOH-Lösung in einem Verhältnis von 10:1 versetzt und für 5 s, 10 s und 15 s inkubiert. Zur Bestimmung der Lebendzellzahlen und der anschließenden Ermittlung des Verlustes wurden 100 µl sowohl von der behandelten als auch von der unbehandelten Kultur auf CIN-Agar ausplattiert.

Des Weiteren sollte nicht nur überprüft werden, wie das Wachstum von *Y. pseudotuberculosis* durch eine KOH-Behandlung in Reinkultur beeinflusst wird, sondern auch in einer künstlich kontaminierten Matrix. Dazu wurden Homogenate (Kap. 3.2.2.3) von drei zuvor *Yersinia*-negativ getesteten Tonsillen (PCR und mikrobiologische Untersuchungen) mit LB-Übernachtskulturen von fünf *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen (Serotypen: O:1a, O:1b, O:3, O:4, O:5) kontaminiert. Die Endkonzentrationen betragen 10^6 KBE/ ml, 10^7 KBE/ ml und 10^8 KBE/ ml. Es folgte eine Behandlung mit 0,25 prozentiger KOH-Lösung in einem Verhältnis von 1:10 für 5 s, 10 s und 15 s. Eine Kontrollgruppe ohne KOH-Behandlung wurde ebenfalls mitgeführt. Zur Bestimmung der Wiedergewinnungsrate von *Y. pseudotuberculosis* wurde im Anschluss Kulturmaterial auf CIN-Agar-Platten ausgestrichen und für 48 h bei 28 °C inkubiert. Danach wurden 5 mutmaßliche *Y. pseudotuberculosis*-Kolonien mit

einer sterilen Impföse entnommen und auf LB-Agar-Platten überimpft. Die Identifikation erfolgte über die MALDI-TOF-MS-Analyse (Kap. 3.2.3.1).

4.2.1.5 Praktische Untersuchungen mit künstlich kontaminierten Matrices

Um die Effizienz der zuvor modifizierten Kultivierungsschritte unter Realbedingungen zu bewerten, wurde das entwickelte Isolierungsschema (Abb. 12) an drei künstlich kontaminierten Tonsillen-Homogenaten angewendet und die Wiederfindungsrate der eingesetzten *Y. pseudotuberculosis*-Stämme (O:1 bis O:5) bestimmt. Dazu wurden die PSB-Tonsillen-Homogenate (Kap. 3.2.2.3) von drei zuvor negativ getesteten Tonsillen mit LB-Übernachtskulturen der *Y. pseudotuberculosis*-Stämme beimpft, so dass eine Endkonzentration von 10^6 KBE/ ml, 10^7 KBE/ ml und 10^8 KBE/ ml gegeben war. Die so hergestellten Kulturen wurden erst für 6 h bei Raumtemperatur und anschließend für 7 d bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 500 µl des Ansatzes entnommen, durch zweimaliges Pelletieren (1 min, 11.000 x g) und waschen mit Aqua bidest. gereinigt und mittels thermischer Lyse (95 °C, 7 min) die DNA extrahiert. Für die Untersuchung des DNA-Materials auf Vorhandensein von *Y. pseudotuberculosis* wurde die von Bogdanovich *et al.* (2003) beschriebene wzz-PCR-Methode angewandt. 100 µl des jeweiligen Homogenats wurden in einer seriellen Verdünnungsreihe auf CIN-Agar-Platten ausplattiert und bei 28 °C für 48 h inkubiert. Von jeder Platte wurden bis zu 20 mutmaßliche *Y. pseudotuberculosis*-Kolonien, die das typische „Bulls-Eye“-Aussehen aufwiesen, entnommen und auf LB-Agar-Platten überimpft. Nach einer Inkubation von 24 h bei 28 °C erfolgte die Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS-Analyse.

4.2.2 Prävalenzuntersuchung

4.2.2.1 Probenakquisition

Das Probenmaterial wurde in dem Zeitraum vom 23.02.2015 – 10.12.2016 entnommen. Es handelte sich dabei um die Gaumensegelmandeln (*Tonsilla veli palatini*) von 503 Stücken Schwarzwild. Die genaue Zusammensetzung der untersuchten Wildschweinstrecke nach Alter und Geschlecht ist in Tabelle 31 (Kap. 5.4.1) aufgeführt. Ein großer Teil der Probenmenge (ca. 67 %) wurde auf insgesamt 18 sogenannten Ansitzdrückjagden gewonnen. Die übrigen Proben wurden Wildschweinen entnommen, die auf Einzelansitz- oder Pirschjagden erlegt wurden. Alle Tiere stammten aus freier Wildbahn und wurden von zahlreichen Jägern erlegt.

4.2.2.1.1 Probengebiet

Insgesamt konnten Proben aus 13 Revieren in zwei Bundesländern innerhalb Deutschlands akquiriert werden. In Summe beträgt die Gesamtfläche aller Reviere 10.031 Ha. Ein Großteil der Reviere befindet sich im Landkreis Uckermark, während jeweils ein Revier im Landkreis Barnim und im Landkreis Rostock liegt. Zwischen den einzelnen beprobten Wildschweinpopulationen bestehen zum Teil Barrieren, wie Autobahnen, Bundesstraßen und Entfernungen von bis zu 200 Kilometern (Abb. 4).

Tabelle 19: Übersicht zur Lage der Reviere und dem dazugehörigen Probenaufkommen

Landkreis, Bundesland	Anzahl Reviere	Anzahl Proben
Uckermark, Brandenburg	11	480
Barnim, Brandenburg	1	8
Rostock, Mecklenburg-Vorpommern	1	15

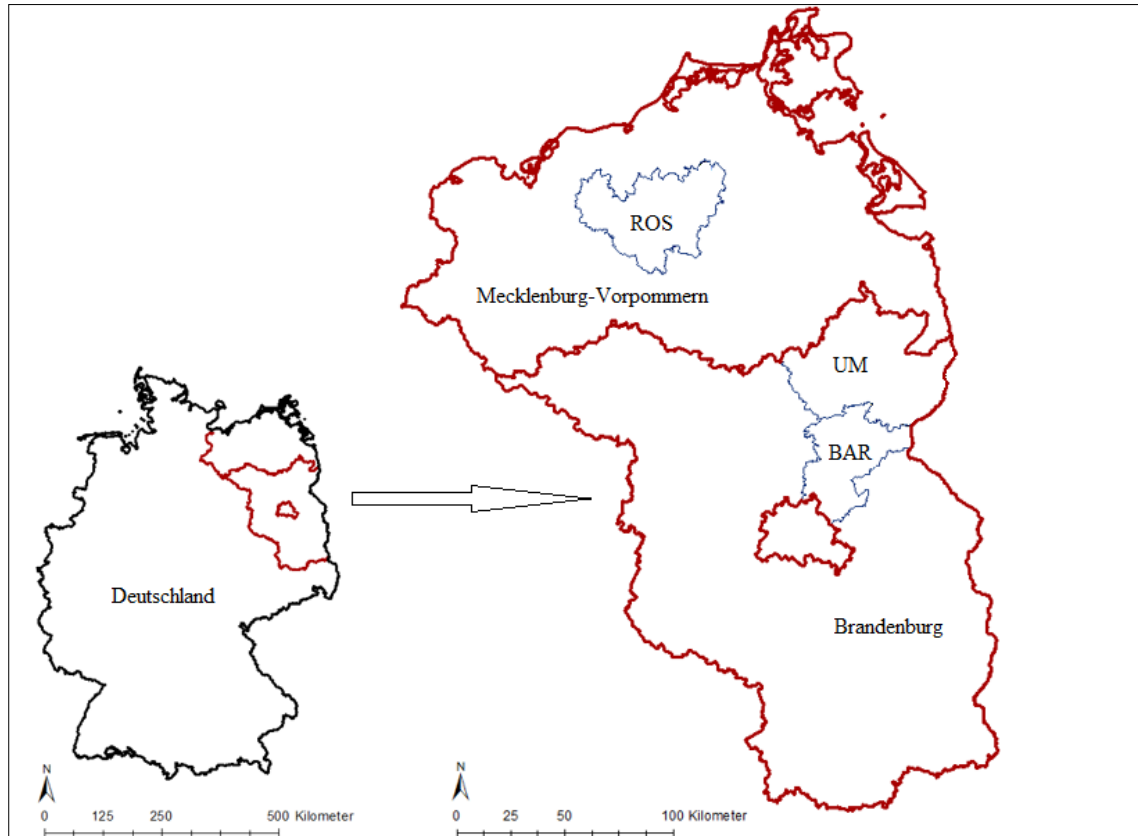


Abbildung 5: Übersichtskarte der Probeneinzugsgebiete. Gezeigt ist ein ArcGIS-Übersichtskarte zur Lage der Landkreise innerhalb Deutschlands, in denen die Proben-Reviere liegen. ROS: Rostock, UM: Uckermark und BAR: Barnim.

4.2.2.1.2 Durchführung der Probennahme

Die Entnahme der Tonsillen erfolgte am Streckenplatz unmittelbar nach der Jagd oder wenige Stunden nach der Erlegung in der jeweiligen Wildkühlzelle. Für jedes zu beprobende Stück wurde ein neues Paar Latex-Laborhandschuhe, ein steriles Einmal-Skalpell und ein neues Kunststoffgefäß mit Schraubdeckel-Verschluss verwendet. Für die Gewinnung der Tonsillen wurde vom Kinnwinkel (*Pars molaris* der Mandibula) bis zum Halsansatz (*Regio praesternalis*) ein tiefer Schnitt angelegt. Der Kehlkopf (Larynx) diente als Orientierungspunkt. Im Bereich des Kehldeckels (Epiglottis) wurde durch Zuhilfenahme von zwei Fingern die nötige Zugspannung im darunter befindlichen Gewebe aufgebaut, um die sich caudodistal vom hartem Gaumen (Palatum durum) befindlichen

Tonsillae veli palatini herauszutrennen (Abb. 6). Das Probenmaterial wurde sofort in ein Kunststoffgefäß überführt und bis zur Aufarbeitung im Labor bei 4 °C gelagert.

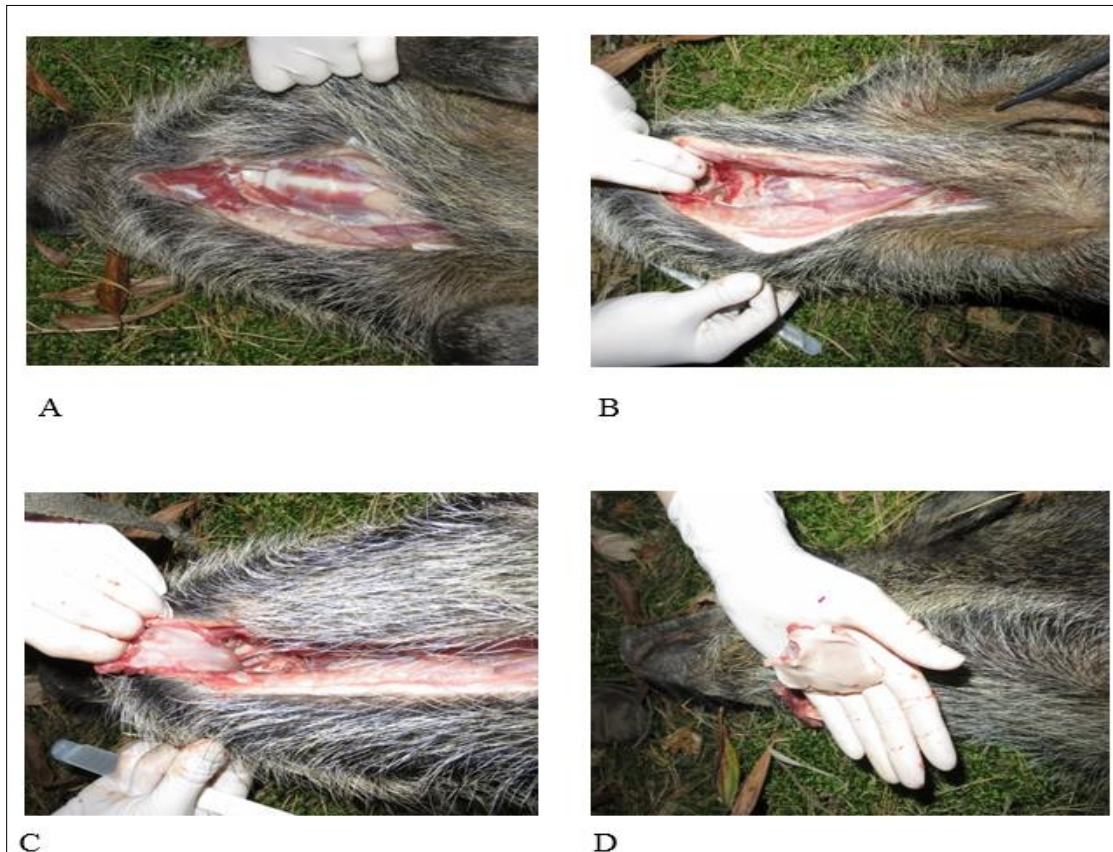


Abbildung 6: Probennahme. Gezeigt ist die Entnahme der *Tonsillae veli palatini* in vier Schritten. **A:** Schnitt vom Kinnwinkel bis zum Halsansatz, **B:** Aufbau von Zugspannung im Bereich des Kehldeckels und dem darunter befindlichen Gewebe, **C:** Herauslösen der Zunge und den anheftenden Tonsillen, **D:** Herausgelöste *Tonsillae veli palatini*.

4.2.2.1.3 Probenaufarbeitung/ Stamm-Isolierung

Im Labor wurden die Tonsillen gewogen, mit einem sterilen Einmal-Skalpell in ca. 1 cm² große Stücke geschnitten und in einem Verhältnis von 1:10 mit dem flüssigen Nährmedium PSB (DIN EN ISO 10273, Kap. B1) in einen Stomacher-Filterbeutel gegeben. Zum Herauslösen der Bakterien aus der Matrix wurde bei höchster Intensität und geringstem Plattenabstand 2 min homogenisiert. Im Anschluss wurden 10 ml des Homogenats mit 90 ml frischem PSB-Medium vereint und erst für 6 h bei Raumtemperatur und anschließend für 7 Tage bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 500 µl des Ansatzes entnommen, durch zweimaliges Pelletieren (1 min, 11.000 x g) und Waschen mit Aqua bidest. gereinigt und mittels thermischer Lyse (95 °C, 7 min) die DNA extrahiert. Für die Untersuchung des DNA-Materials auf Vorhandensein von *Y. pseudotuberculosis* wurde die von Bogdanovich *et al.* (2003) beschriebene wzz-PCR-Methode angewandt. Um das Ergebnis der PCR zu bewerten, wurde eine Gelelektrophorese mit einem 1,2 %igem Agarosegel durchgeführt. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer gelöst und GelRed wurde als DNA-Färbemittel dazugegeben. Die DNA-Proben wurden mit Bromphenolblau gemischt und zusammen mit einem Größenstandard (GeneRuler 100 bp) aufgetragen. Zur Trennung der DNA wurde ein elektrisches Feld von 110 V angelegt. Von den PCR-positiven Tonsillen-Proben wurden 100 µl des jeweiligen Homogenats in einer Verdünnung von 10⁻⁵, 10⁻⁶ and 10⁻⁷ auf CIN-Agar-Platten (DIN EN ISO 10273, Kap. B3) ausplattiert und bei 28 °C für 48 h inkubiert. Von jeder Platte wurden bis zu 20 mutmaßliche *Y. pseudotuberculosis*-Kolonien, die das typische „Bulls-Eye“-Aussehen aufwiesen, entnommen und auf LB-Agar-Platten (Tab. 14) überimpft. Nach einer Inkubation von 24 h bei 28 °C erfolgten die weiteren Analysen zur Stamm-Identifizierung.

4.2.2.1.4 Stamm-Haltung und -Rekultivierung

Zur Konservierung der Bakterienstämme wurde eine entsprechende Menge einer LB-Übernachtskultur mit Glycerin (Endkonzentration 20 %), durch

vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Die Haltung erfolgte in Kryoröhrchen bei – 80 °C.

Des Weiteren wurden zur Konservierung der Bakterienstämme CIN-Agar-Platten verwendet. Dazu wurde Zellmaterial auf CIN-Agar-Platten ausgestrichen und bei 28 °C für 48 h inkubiert. Die Platten konnten anschließend ca. vier Wochen bei 4 °C gelagert werden. Danach erfolgte eine Überimpfung der Bakterien auf frische Nährböden.

Für die Rekultivierung der Bakterienstämme wurde mit einer sterilen Impföse Zellmaterial aus dem Glycerin-Kryoröhrchen entnommen und in LB-Flüssigmedium überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 28 °C in einem Schüttelinkubator (200 rpm).

4.2.2.2 Identifizierung der gewonnenen Isolate

4.2.2.2.1 MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization — Time of Flight Mass Spectrometry)

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie bietet mit schnellen Identifizierungsergebnissen einen zeitlichen Vorteil gegenüber herkömmlichen biochemischen und molekularbiologischen Methoden (Engelmann und Kugler, 2012). Die Diagnostik beruht auf der Analyse des Proteinprofils mehrheitlich von ribosomalen Proteinen (Wieser *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurde die MALDI-TOF Massenspektrometrie als Ergänzung zu anderen molekularbiologischen und mikrobiologischen Identifizierungsmethoden verwendet. Bei der Bearbeitung des Bakterien-Materials wurden die Protokoll-Vorschriften des Herstellers (Microflex LT, Bruker Daltonics, Billerica, USA) eingehalten. Dafür wurde von 20 mutmaßlichen *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen je Positiv-Probe etwas Kolonie-Material mit einem sterilen Holzstäbchen auf die Target-Platte aufgetragen (Fournier *et al.*, 2012). Dabei wurde das Material einer Kolonie immer auf zwei Positionen der Targetplatte verstrichen, um für jede Kolonie eine doppelte Messung zu erhalten. Das aufgetragene Kolonie-Material wurde für wenige Minuten bei Raumtemperatur auf der Targetplatte getrocknet und anschließend mit 1,5 µl der HCCA-

Matrixlösung überschichtet und erneut getrocknet. Die Messungen erfolgten mit der flexControl real-time classification Software (version 3.0) von Bruker Daltonics und wurden mit der MALDI biotyper Database abgeglichen. Bei jeder Messung wurden der Referenzstamm IP32935 (Institut Pasteur, Frankreich) und Aqua bidest. als Kontrollen mitgeführt. Ab einem Score von 2,3 wurde die Analyse als sichere Spezies-Bestimmung gewertet.

4.2.2.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Eine erste Identifizierung der gewonnenen Isolate erfolgte mittels der PCR-Methode nach Bogdanovich *et al.* (2003). Dabei ist das *wzz*-Gen das Ziel-Gen. Das Wzz-Protein determiniert die O-Antigen-Kettlänge und ist bis heute lediglich in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* nachgewiesen worden. Für den PCR-Nachweis wurden 500 µl einer LB-Übernackkultur des zu untersuchenden Stammes durch zweimaliges Pelletieren (1 min, 11.000 x g) und Waschen mit Aqua bidest. gereinigt und mittels thermischer Lyse (95 °C, 7 min) die DNA extrahiert. Um das Ergebnis der PCR zu bewerten, wurde eine Gelelektrophorese mit einem 1,2 %igem Agarosegel durchgeführt. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer gelöst und GelRed wurde als DNA-Färbemittel dazugegeben. Die DNA-Proben wurden mit Bromphenolblau gemischt und zusammen mit einem Größenstandard (GeneRuler 100 bp) aufgetragen. Zur Trennung der DNA wurde ein elektrisches Feld von 110 V angelegt. Um die von Bogdanovich *et al.* (2003) publizierte PCR-Methode hinsichtlich ihrer Sensitivität im Voraus zu überprüfen, wurden von der DNA des *Y. pseudotuberculosis*- Referenzstammes IP32953 unterschiedlich konzentrierte Ansätze erzeugt und mittels *wzz*-PCR überprüft.

Tabelle 20: Pipettierschema für *die* wzz-PCR-Methode (nach Bogdanovich *et al.*, 2003)

Komponente	Konzentration
dNTPs	0,3 mM
Puffer	10 x
MgCl ₂	1,2 mM
Taq-DNA-Polymerase	1 U
Primer:	
Ypf 20210	25 pmol
Ypr 20538	
DNA	100 ng
Aqua bidest.	ad 50 µl

Tabelle 21: Temperaturprofil der wzz-PCR-Methode (nach Bogdanovich *et al.*, 2003)

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
Initial-Denaturierung	94 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	} 40 Zyklen
Annealing	60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Synthesephase	72 °C	6 min	

4.2.2.2.3 Biochemische Identifizierung der Isolate

Die biochemische Identifizierung von *Y. pseudotuberculosis* beruht auf dem Nachweis von Enzymen, die die Bakterien zu spezifischen Stoffwechselreaktionen befähigen. Die Stoffwechselleistungen wurden unter anderem über einen induzierten spezifischen Farbumschlag auf Grundlage der Säure-Basen-Indikatoren in der Suspension angezeigt oder durch Farbstoffbildung nach Zugabe von Reagenzien nachgewiesen. Dabei ist eine Spezies-Unterscheidung innerhalb der Gattung *Yersinia* möglich (Tab. 22a und 22b). Für die einzelnen Tests wurden je 25 µl einer LB-Übernachtskultur eines Stammes in ein Reagenzröhrchen mit entsprechendem Medium überführt. Nach einer Inkubation von 24 h bei 28 °C erfolgte die Auswertung der Tests. Lediglich beim Voges-Proskauer Test und dem Indol-Nachweis erfolgte nach der 24 stündigen Inkubation noch keine Auswertung. Beim Voges-Proskauer-Test wurde nach der Inkubation 1 ml der Bakteriensuspension entnommen und mit 600 µl α-Naphthol vermischt. Das α-Naphthol bewirkt eine Rotfärbung des Acetoin-Keratin-Komplexes, wobei Acetoin bei der bakteriellen Verstoffwechslung von Glucose entsteht und Keratin im Pepton des Mediums vorhanden ist. *Y. pseudotuberculosis* ist zu dieser Stoffwechselleistung nicht fähig und zeigt somit keine Rotfärbung. Beim Indol-Nachweis soll das Enzym Tryptophanase, welches Tryptophan zu Indol, Pyruvat und Ammoniak spaltet, nachgewiesen werden. Dazu wurde nach der 24 stündigen Inkubation 100 µl Kovac-Reagenz zur Bakterien-Suspension hinzugefügt. Da *Y. pseudotuberculosis* zu dieser Stoffwechselreaktion nicht fähig ist, erfolgt nach Zugabe des Kovac-Reagenz kein roter Farbumschlag.

Tabelle 22a: Gegenüberstellung biochemischer Eigenschaften verschiedener *Yersinia* Spezies (nach Frederikssn-Ahoma und Wacheck, 2011)

Biochemischer Test (25-30 °C)	Voges-Proskauer	Indol	Zitrat	Sorbitol	Sucrose	Rhamnose	Melibiose	Urease
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+
<i>Y. enterocolitica</i>	+	+/-	-	+	+	-	-	+
<i>Y. aldovae</i>	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>Y. aleksiciae</i>	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Y. bercovieri/ Y. molaretii</i>	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Y. frederiksenii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Y. intermedia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Y. kristensenii</i>	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>Y. massiliensis</i>	-	+	+/-	+	+	-	-	+
<i>Y. pekkanenii</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Y. rohdei</i>	-	-	+	+	+	-	+	+
<i>Y. similis</i>	-	-	-	-	-	+	-	+

+: positiv, -: negativ, +/-: variabel

Tabelle 22b: Differenzierung von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* (nach Frederikssn-Ahomaa und Wacheck, 2011)

Biochemischer Test (25-30 °C)	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
Voges-Proskauer	+	-
Sorbitol	+	-
Äskulin	- ^a	+

^a: apathogene Stämme sind Äskulin-positiv

4.2.2.3 Charakterisierung der Stämme

Nach Identifizierung der gewonnenen Isolate als *Y. pseudotuberculosis* (Kap. 4.2.2.2) folgte die genaue Charakterisierung der Stämme.

4.2.2.3.1 Bestimmung der Kolonie- und Zellmorphologie

Zur Bestimmung der Koloniemorphologie wurde Material der LB-Übernachtskulturen der isolierten Stämme auf CIN-Agar-Platten so ausgestrichen, dass Einzelkolonien gut erkennbar waren. Eine optische Bestimmung erfolgte nach einer Inkubation bei 28 °C nach 48 h. Zur Bestimmung der Zellmorphologie wurde Material der LB-Übernachtskultur der isolierten Stämme genutzt und durch die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Jochen Reetz (Abteilung Biologische Sicherheit, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) mittels Transmission-Elektronen Mikroskop optisch erfasst.

4.2.2.3.2 Biochemische Typisierung

Die biochemische Variabilität unter den *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen ist wenig ausgeprägt. Dennoch besteht die Möglichkeit, durch ein einfaches biochemisches Schema *Y. pseudotuberculosis* in vier Biotypen zu

unterscheiden. Diese Differenzierungsmethode wird jedoch aufgrund der unklaren klinischen Relevanz nur selten angewandt (Frederiksson-Ahomaa und Wacheck, 2011) (Tab. 23). In dieser Arbeit wurde der Vollständigkeit halber die Unterscheidung der isolierten Stämme in die jeweiligen Biotypen vorgenommen. Die Differenzierung erfolgt hier über den Nachweis von Enzymen, die sie zu spezifischen Stoffwechselreaktionen befähigen. Die Herstellung und Anwendung der Medien erfolgte nach der DIN EN ISO 10273, Anhang B sowie Tsubokura und Aleksic (1995).

Tabelle 23: Biochemische Eigenschaften von *Y. pseudotuberculosis* zur Biotyp-Differenzierung (nach Tsubokura und Aleksic, 1995)

Biochemischer Test (25-30 °C)	Biotyp			
	1	2	3	4
Melibiose	+	-	-	+
Zitrat	-	-	+	-
Raffinose	-	-	-	+

+: positiv, -: negativ

4.2.2.3.3 Serotypisierung

Eine weitere Differenzierungsmöglichkeit ist die Bestimmung des Serotyps beruhend auf dem Nachweis der Oberflächen (O-) -Antigene. Da nur für wenige Serotypen kommerzielle Agglutinationsseren zur Verfügung stehen, wurde ergänzend eine Serotypisierung mit Hilfe der von Bogdanovich *et al.* (2003) entwickelten PCR-Methode vorgenommen. Dadurch war es möglich, die isolierten Stämme auf alle 21 bekannten Serotypen zu testen. Eine Multiplex-PCR (Tab. 24) in Kombination mit einer Duplex-PCR (Tab. 25) diente zur Unterscheidung der Serotypen. Eine Übersicht der jeweiligen Bandenmuster der PCR-Methode nach Bogdanovich *et al.* (2003) ist in Tabelle 27 erfasst.

Für die klassische Serotypisierung standen Antiseren der Serotypen O:1 – O:7 zur Verfügung. Es wurden 25 µl des Serums (1:50) auf einen Objektträger gegeben, Koloniematerial mit einer sterilen Impföse hinzugefügt und vermischt. Anschließend erfolgte die Auswertung unter dem Binokular. Zeigte sich eine Ausflockung (Agglutination), galt dies als positiv hinsichtlich des untersuchten Serotyps. Als Negativkontrolle diente eine NaCl-Lösung. Zeigte sich auch hier eine Ausflockung des Koloniematerials, wurde der untersuchte Stamm als „rau“ identifiziert.

Tabelle 24: Pipettierschema für die Multiplex-PCR-Methode (Bogdanovich *et al.*, 2003)

Komponente	Konzentration	
dNTPs	0,4 mM	
Puffer	10 x	
MgCl ₂	2,4 mM	
Taq-DNA-Polymerase	2 U	
Primer:	Target-Gen	
Ypf-14159	<i>gmd-fcl</i>	10 pmol
Ypr-15549		
Ypf-5270	<i>ddhC-prt</i>	12,5 pmol
Ypr-6342		
Ypf-18740	<i>manB</i>	3 pmol
Ypr-19703		
Abe1	<i>abe</i>	7,5 pmol
Abe2		
Ypf-17770	<i>wbyL</i>	7,5 pmol
Ypr-18414		
Ypf-7170	<i>wbyH</i>	5 pmol
Ypr-7698		
Ypf-3057	<i>ddhAB</i>	12,5 pmol
Ypr-3464		
Ypf-13231	<i>wbyK</i>	7,5 pmol
Ypr-13538		
Ypf-8576	<i>wzx</i>	10 pmol
Ypr-8681		
DNA	100 ng	
Aqua bidest.	ad 50 µl	

Tabelle 25: Pipettierschema für die Duplex-PCR-Methode (Bogdanovich *et al.*, 2003)

Komponente		
dNTPs		0,3 mM
Puffer		10 x
MgCl ₂		1,2 mM
Taq-DNA-Polymerase		1 U
Primer:	Target-Gen	
Ypf-20511	<i>wzz-gsk</i>	15 pmol
Yerfb2		
Ypf-913	<i>hemH-ddhD</i>	15 pmol
Ypr-1094		
DNA		100 ng
Aqua bidest.		ad 50 µl

Tabelle 26: PCR-Programm für die Multiplex- und Duplex-PCR-Methode (nach Bogdanovich *et al.*, 2003)

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
Initial-Denaturierung	94 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	15 s	} 35 Zyklen
Annealing	54 °C	30 s	
Elongation	72 °C	90 s	
Synthesephase	72 °C	5 min	

Material und Methoden

Serotyp	Multiplex-PCR							Duplex-PCR			wzz-PCR	
	Target-Gen											
	<i>gmd</i> <i>-fcl</i>	<i>ddhC</i> - <i>prt</i>	<i>manB</i>	<i>abe</i>	<i>wbyL</i>	<i>wbyH</i>	<i>ddhAB</i>	<i>wbyK</i>	<i>wzx</i>	<i>wzz</i> <i>-gsk</i>	<i>hemH</i> <i>-ddhD</i>	<i>wzz</i>
O:8			+				+					+
O:9												+
O:10										+	+	+
O:11	+		+					+				+
O:12	+		+		+							+
O:13	+		+		+		+					+
O:14	+		+		+	+		+	+			+
O:15	+	+	+			+	+		+			+

+: positiv

4.2.2.3.4 Untersuchung von Antibiotika-Resistenzen

Um die *Y. pseudotuberculosis*-Isolate auf mögliche Antibiotika-Resistenzen zu untersuchen, wurde die Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika getestet. Dazu wurde der Bouillon-Mikrodilutionstest nach den Richtlinien des Clinical and Laboratory Standards Institute (M07-A10) durchgeführt.

Für die Herstellung des Inokulums wurden 1-5 Einzelkolonien von einer Blut-Agar-Platte in steriler NaCl-Lösung (5 %) homogenisiert, bis eine homogene Suspension von 0,5 McFarland erreicht wurde. Anschließend wurde ein Teil der Bakteriensuspension entnommen und in ein Röhrchen mit Mueller DHinton II Bouillon gegeben und gut gemischt. Die Mikrotiterplatten (Sensititre™ Gram-negative MIC-Platten EUVSEC und EVSEC2) wurden innerhalb der folgenden 15 min mit der Suspension im Autoinokulator beschichtet und danach für 24 und 48 h bei 28 °C inkubiert. Das Ablesen der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Sensititre Vizion Sytem TREK Diagnostic-Systems nach 24 und 48 h. Die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) wurden in Anlehnung an Stock und Wiedemann (1999) bewertet. Insgesamt wurde die Empfindlichkeit der Isolate gegenüber 21 verschiedenen Antibiotika getestet (Tab. 28).

Tabelle 28: Eingesetzte Antibiotika zur Überprüfung möglicher Antibiotika-Resistenzen der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate

Sulfamethoxazol	Ceftazidim	Cefepim
Ceftazidim/ Clavulansäure	Colistin	Temocillin
Cefotaxim/ Clavulansäure	Ampicillin	Trimethoprim
Tetracyclin	Gentamicin	Ciprofloxacin
Meropenem	Cefoxitin	Cefotaxim
Azithromycin	Ertapenem	Chloramphenicol
Nalidixinsäure	Imipenem	Tigecyclin

4.2.2.3.5 Bestimmung des Multi-Lokus-Sequenz-Typs (MLST)

Für die Bestimmung des Multi-Lokus-Sequenz-Typs der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate wurden die entsprechenden DNA-Regionen aus dem Datensatz der Gesamtgenom-Sequenzierung herangezogen und unter Verwendung der Software MLST 1.8 analysis pipeline vom Center for Genomic Epidemiology analysiert (Larsen *et al.*, 2012). Zusätzlich wurden die Ergebnisse mittels PCR gestützt. Die verwendeten Loci sind im Kapitel 3.1.8 in Tabelle 12 unter der Referenz Ch'ng *et al.*, 2011 aufgeführt. Die Gesamtgenom-Sequenzierung sowie die Bestimmung des Multi-Lokus-Sequenz-Typs anhand der Gesamtgenom-Daten wurde freundlicherweise durchgeführt von Herrn Dr. Jens-André Hammerl (Abteilung Biologische Sicherheit, Fachgruppe Epidemiologie, Zoonosen und Antibiotikaresistenz, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin).

4.2.2.3.6 Pathogenitätsnachweis

Die gewonnenen *Y. pseudotuberculosis*-Isolate sollten auf ihr pathogenes Potenzial untersucht werden. Dazu wurden chromosomale, als auch plasmidkodierte Virulenz-Gene auf ihre Anwesenheit überprüft. Dies erfolgte sowohl mit mikrobiologischen (MOX-Test), als auch mit molekularbiologischen Verfahren (PCR, Gesamtgenom-Sequenzierung).

4.2.2.3.6.1 Mikrobiologische Untersuchungen

Die von Riley und Toma (1989) publizierte Methode stellt ein mikrobiologisches Nachweisverfahren dar, um das Vorhandensein des Virulenzplasmides (pYV) pathogener *Yersinia*-Spezies zu überprüfen. Bei Anwesenheit des Virulenzplasmides sind Yersinien in der Lage, den Azofarbstoff Kongorot zu binden. Des Weiteren sind plasmidhaltige Yersinien unter Calcium-Mangel bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C in ihrem Wachstum gehemmt („low calcium response“). Der für den MOX-Test verwendete Kongorot-Magnesium Oxalat- Agar erlaubt den Nachweis dieser beiden Eigenschaften auf einer Agar-Platte. Plasmidlose Zellen bilden farblose, größere Kolonien, wohingegen

plasmittragende Zellen kleine, rote Kolonien bilden. Für die Durchführung des MOX-Tests wurde Material einer LB-Übernachtskultur des jeweiligen *Y. pseudotuberculosis*-Isolates auf einer MOX-Platte ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 24 h und 48 h, wobei anhand der Koloniemorphologie die Isolate in plasmidtragend oder plasmidlos eingeteilt wurden.

4.2.2.3.6.2 Molekularbiologische Untersuchungen

4.2.2.3.6.2.1 PCR

Da die wesentlichen Pathogenitätsdeterminanten auf dem Virulenzplasmid (pYV) lokalisiert sind und es dementsprechend hinsichtlich der Ausprägung der Pathogenität von Bedeutung ist (Cornelis *et al.*, 1998), sollte zusätzlich zum mikrobiologischen Nachweis die Anwesenheit von pYV mit Hilfe einer PCR überprüft werden. Dazu wurde das in der Tabelle 29 stehende Pipettierschema verwendet und die PCR-Produkte mittels Gel-Elektrophorese analysiert.

Des Weiteren wurden Negativ-Ergebnisse der *in silico* durchgeführten Virulenzgen-Untersuchungen mittels PCR überprüft. Dazu wurden die Primer aus der Tabelle 12 (Kap.: 3.1.8) gemäß Fukushima *et al.*, 2001 sowie die generierten Primer aus Tabelle 13 (Kap.: 3.1.8) für die betroffenen Isolate verwendet und das publizierte PCR-Programm genutzt.

Tabelle 29: Pipettierschema für die *virF*-PCR-Methode (nach Thoerner *et al.*, 2003)

Komponente		
dNTPs		0,2 mM
Puffer		10 x
MgCl ₂		3 mM
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase		1 U
Primer:	Target-Gen	
11A- <i>virF</i>	<i>virF</i>	1 µM
12A- <i>virF</i>		
DNA		100 ng
Aqua bidest.		ad 50 µl

Tabelle 30: PCR-Programm für die *virF*-PCR-Methode (nach Bogdanovich *et al.*, 2003)

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
Initial-Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	15 s	} 25 Zyklen
Annealing	63 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Synthesephase	72 °C	10 min	

4.2.2.3.6.2.2 Gesamtgenom-Sequenzierung/ In silico Virulenzgen-Untersuchungen

Für den Nachweis von Virulenzgenen im Genom der Bakterien wurden bioinformatische Untersuchungen (*in silico*) anhand der Gesamtgenomsequenzen der *Yersinia pseudotuberculosis*-Isolate durchgeführt. Bei der „Short-Read“ Gesamtgenom-Sequenzierung wird das Genom durch die Sequenzierung der Basenabfolge einer großen Anzahl zufällig platzierter „Reads“ bestimmt. Da die Reads ungeordnet über das Genom verteilt sind und eine Nicht-Sequenzierung einzelner Bereiche vermieden werden soll, ist es erforderlich, eine hohe Abdeckung bzw. Sequenziertiefe („coverage“) zu erreichen. Im Anschluss an die Sequenzierung wurden die einzelnen Reads anhand ihrer Überlappungen zu möglichst großen Sequenzabschnitten (Contigs) zusammengesetzt.

Für die Gesamtgenom-Sequenzierung wurde aus einer LB-Übernachtskultur (28 °C) des jeweiligen Isolates die DNA mit dem PureLink genomic DNA minikit nach Herstellerangaben extrahiert und aufgereinigt. Es wurde eine „Short-Read-Sequenzierung“ mit 2 × 251 Zyklen unter Verwendung des MiSeq V3-Reagenzkits auf einem Illumina MiSeq Benchtop-Sequenzierer (Illumina, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Die Sequenzierungsbibliotheken wurden unter Verwendung des Illumina Nextera XT DNA-Probenvorbereitungskits entsprechend der vorgegebenen Herstellerprotokolle erstellt. Raw-Read-Daten wurden für die De-novo-Genom-Assemblierung unter Verwendung des Spades-Algorithmus der PATRIC-Datenbank (<https://patricbrc.org>) (Wattam *et al.*, 2018) verwendet.

Die Genom-Bereiche, welche die Gene beinhalten, die für ausgesuchte Virulenzfaktoren kodieren, wurden von den Gesamtgenom-Sequenzierungsdatensätzen der Isolate unter Verwendung des Software-Pakets Lasergene (v14.0) (DNASar, Madison, Wisconsin, USA) analysiert. Im Besonderen wurden Gene, welche für das Superantigen YPM („*Y. pseudotuberculosis*-derived mitogen“) und die Pathogenitätsinsel HPI („High-Pathogenicity Island“) (Fukushima *et al.*, 2001) kodieren, gesucht.

Weiterhin sollten Virulenz-Gene, die bereits von Thoerner *et al.* (2003) publiziert wurden auf Anwesenheit überprüft werden (*ail*, *virF*, *yadA*). Die Abwesenheit der gesuchten Virulenz-Gene wurde mit Hilfe von PCR-Untersuchungen bestätigt, wie bereits in Kapitel 4.2.4.6.2.1 beschrieben.

Die Durchführung der Gesamtgenom-Sequenzierung und die Bearbeitung der Gesamtgenom-Datensätze für die *in silico* Virulenzgen-Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Jens A. Hammerl (Abteilung Biologische Sicherheit, Fachgruppe Epidemiologie, Zoonosen und Antibiotikaresistenz, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) unterstützt.

4.2.2.4 Phylogenetische Untersuchungen

Um die phylogenetische Beziehung zwischen den Isolaten zu ermitteln, wurde sowohl eine Puls-Feld-Gel-Elektrophorese (PFGE)-Analyse, als auch eine Stammbaumerstellung mittels Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP = Single Nucleotide Polymorphism) durchgeführt. Während die PFGE-Analysen einen guten Überblick über das Restriktionsmuster des Gesamtgenoms bieten, beinhaltet die SNP-Phylogenie die höchste Auflösung für die Bestimmung der Verwandtschaft der Genome. Berücksichtigt werden muss hierbei jedoch, dass keine Aussagen zur Organisation der Genome bzw. zur eventuellen An-/Abwesenheit nicht sequenzierter Teilbereiche des Genoms getroffen werden können.

4.2.2.4.1 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ist ein Verfahren zur Subtypisierung für eine Vielzahl von Erregern. Dabei wird das Bakterien-Chromosom mit einer selten schneidenden Restriktionsendonuklease in eine informative Zahl von 20-60 Fragmenten zerlegt, die im Anschluss in der Pulsfeld-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Miteinander verwandte Stämme einer Spezies werden anhand ihrer Fragmentlängenmuster erkannt.

Für die Subtypisierung der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate wurde die PFGE basierend auf dem Protokoll vom CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) durchgeführt (Graves und Swaminathan, 2001). Dafür wurden die Isolate bei 28 °C über Nacht in LB-Medium inkubiert. Die DNAs aller Stämme wurden in 1,2 %ige Agaroseblöckchen extrahiert und 5 Stunden lang bei 37 °C mit 40 U *NotI* (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) verdaut. Die Elektrophorese wurde in einem elektrischen Feld von 6 V / cm und einem Winkel von 120 ° durchgeführt. Das Pulsfeld-Agarosegel (0,8%) wurde bei 14 °C in 0,5 × TBE-Puffer laufen gelassen, dabei lagen die Pulszeiten bei einer Gesamtlaufzeit von 21 h zwischen 4 und 40 s. Als Standardmarker wurde *Salmonella Braenderup* H9812 mit dem Restriktionsenzym *XbaI* verwendet. Für die optische Analyse des Gels wurde eine 0,1 M NaCl-Lösung mit GelRed™ (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) versetzt und das Agarosegel unter leichtem Schwenken für 25 min darin gefärbt. Im Anschluss wurden überschüssige Farbpartikel aus dem Gel durch ein Wasserbad für 45 min entfernt. Das Gel wurde abschließend mittels UV Stratalinker™ (Stratagene, Californien, USA) und dem Geldokumentationssystem GEL iX20Imager (Intas, Göttingen, Deutschland) fotografiert und analysiert.

4.2.2.4.2 Stammbaumerstellung anhand von Einzelnukleotid-Polymorphismen

Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP= ist die Bezeichnung für die Variation eines einzelnen Basenpaares in einem komplementären DNA-Doppelstrang. Eine Variation eines Basenpaares kann in einem nicht-kodierenden oder kodierenden Genabschnitt liegen. Dabei kann unterschieden werden, ob diese Variation die Nukleotidsequenz zwar verändert, aber die davon abgeleitete Aminosäuresequenz nicht ändert, oder ob die variierende Nukleotidsequenz zu einem Aminosäurewechsel an dem betreffenden Kodon führt. Zur Erstellung des Stammbaums anhand der Einzelnukleotid-Polymorphismen wurden die Gesamtgenom-Sequenzen der Isolate mit den Bearbeitungsprogrammen des

CSI Phylogeny (Center for Genomic Epidemiology) (Kaas *et al.*, 2014) verarbeitet. Die Stammbaumerstellung wurde von Herrn Dr. Jens-André Hammerl (Abteilung Biologische Sicherheit, Fachgruppe Epidemiologie, Zoonosen und Antibiotikaresistenz, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Entwicklung eines Verfahrens zur Isolierung von *Yersinia pseudotuberculosis* aus tierischem Probenmaterial

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchungen von einzelnen Kultivierungsschritten zur Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* gezeigt. Dazu gehören u. a. die Ergebnisse von Medien-Überprüfungen, Inkubationszeit-Versuchen bis hin zu praktischen Untersuchungen an künstlich kontaminierten Tonsillen-Matrices.

5.1.1 Vergleich der Medien für die Kälteanreicherung

Für eine Optimierung des Verfahrens wurde das Wachstumsverhalten von 16 *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen (Serotypen: O:1a, O:1b, O:2a, O:2b, O:3, O:4, O:5a und O:6) bei 4 °C in Abhängigkeit der Inkubationszeit (72 h, 168 h und 336 h) und des Anreicherungsmediums (Pepton-Sorbit-Galle-Bouillon (PSB), Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Nährbouillon (ITC) und modifizierte Rappaport-Bouillon (MRB)) untersucht.

Auf Grund der geringen bis nicht vorhandenen Unterschiede im Wachstumsverhalten innerhalb der Serotypen, wurden die Daten aller Serotypen zusammengefasst und gemittelt. Alle Isolate zeigten den stärksten Anstieg im Wachstum bei einer Inkubationsdauer zwischen 72 h und 168 h (MRB: 2 Log-Stufen, ITC: 3 Log-Stufen und PSB: 5 Log-Stufen), während das Wachstum zwischen 168 h und 336 h (MRB: 1 Log-Stufe, ITC: 2 Log-Stufen und PSB: 0 Log-Stufen) eine geringere Zunahme zeigte. Nach 168 h Kälteinkubation wurden mit dem Anreicherungsmedium PSB die höchsten Lebendzellzahlen (10^7 KBE/ ml) und mit MRB (10^2 KBE/ ml) die niedrigsten Lebendzellzahlen ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 7 dargestellt. Aus diesem Grund wurde für das kombinierte Verfahren zur Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* PSB für die Kälteanreicherung gewählt.

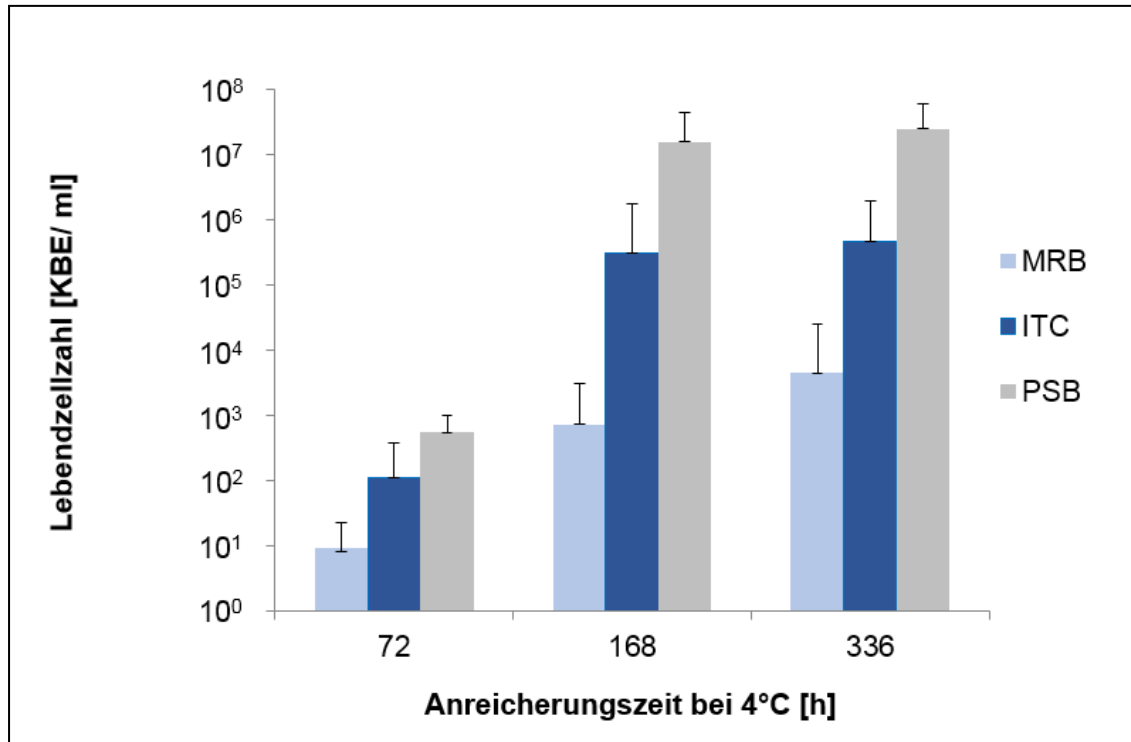


Abbildung 7: Vergleich der Medien für die Kälteanreicherung. Gezeigt ist der Anstieg der Lebendzellzahl von 16 *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen in Abhängigkeit vom Anreicherungsmedium und der Inkubationszeit bei 4 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Stämme aus drei unabhängigen Experimenten. Standardabweichungen werden durch vertikale Balken angezeigt.

5.1.2 Inkubationszeit/ Vorinkubation

Die zur Kälteanreicherung verwendete Pepton-Sorbit-Galle-Bouillon (PSB) führte im Vergleich mit den Anreicherungsmedien MRB und ITC zu den höchsten Lebendzellzahlen. Anschließend mögliche Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen den verschiedenen Serotypen in PSB in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer untersucht werden.

Zwischen den verschiedenen Serotypen waren nur geringfügige Unterschiede im Wachstumsverhalten zu erkennen (Abb. 8). Alle Stämme zeigten den größten Wachstumsanstieg zwischen den Messungen bei 72 h und 168 h (4 bis 5 Log-Stufen), während bei den Messungen zwischen 168 h und 336 h lediglich

ein Wachstum von max. 1 Log-Stufe zu verzeichnen war. Die Lebendzellzahlen der verschiedenen Serotypen lagen nach 168 h in einem Bereich zwischen 10^6 KBE/ ml und 10^7 KBE/ ml.

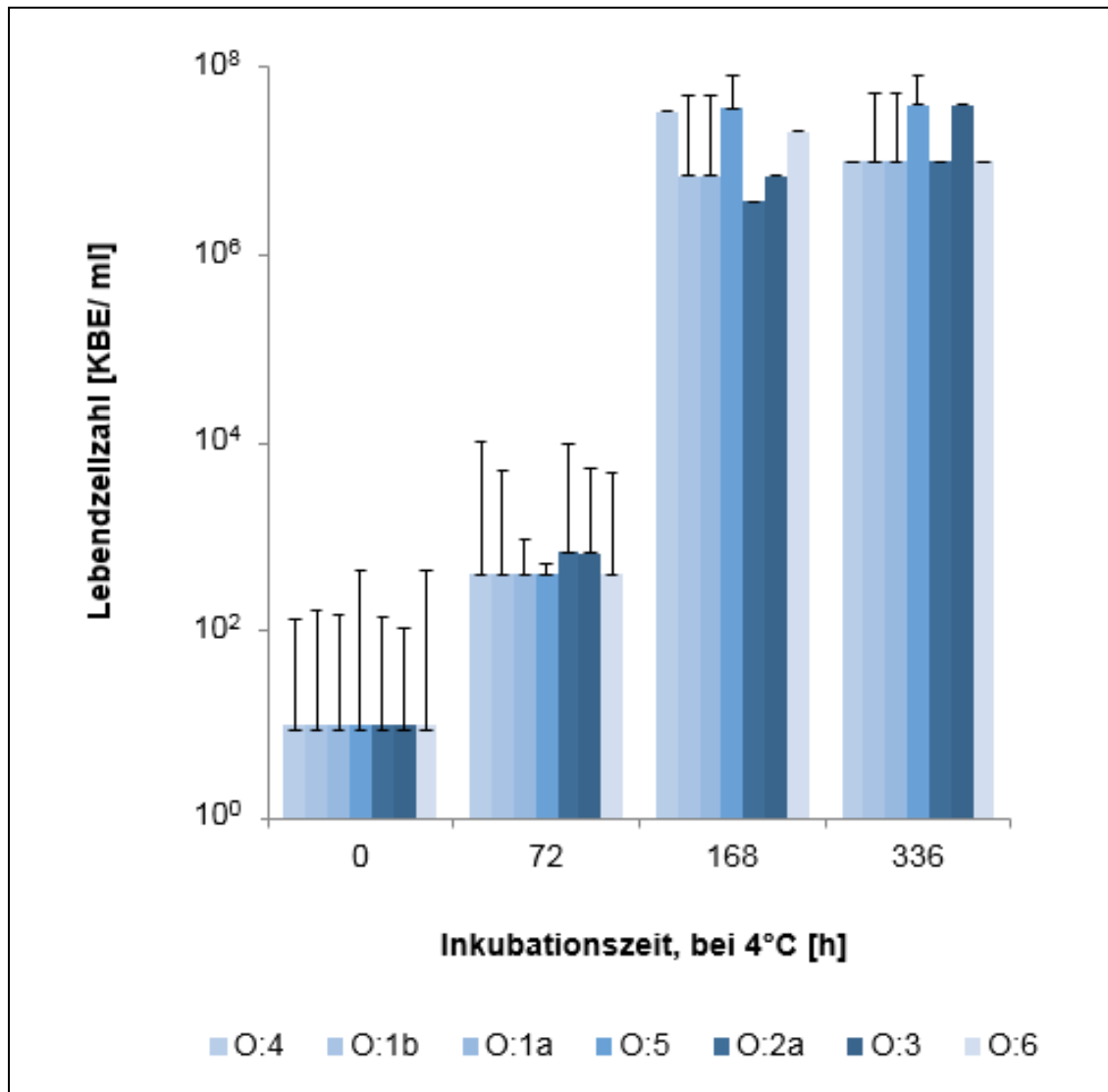


Abbildung 8: Vergleich von Inkubationszeiten für die Kälteanreicherung.

Gezeigt ist der Anstieg der Lebendzellzahl von *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen mit unterschiedlichem Serotyp (O:1 bis O:6) in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei 4 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Stämme mit gleichem Serotyp aus drei unabhängigen Experimenten. Standardabweichungen werden durch vertikale Balken angezeigt.

Des Weiteren wurde die Wirkung einer Vorinkubation auf das Wachstum der 16 *Y. pseudotuberculosis*-Stämme untersucht. Auf Grund der nur geringen Unterschiede im Wachstumsverhalten innerhalb der Serotypen wurden die Daten aller Serotypen zusammengefasst und der Mittelwert zur Darstellung gewählt.

Abbildung 9 zeigt, dass eine Vorinkubation in PSB bei Raumtemperatur für 6 h das Wachstum von *Y. pseudotuberculosis* erheblich förderte. Nach 7 Tagen enthielt die vorinkubierte Kultur ungefähr drei Zehnerpotenzen höhere Zellzahlen als die Kultur ohne Vorinkubation. Ähnlich Unterschiede wurden nach 10 Tagen beobachtet. Daher wurde dieser zusätzliche Schritt in das Schema des Isolierungsverfahrens für die Prävalenzstudie aufgenommen.

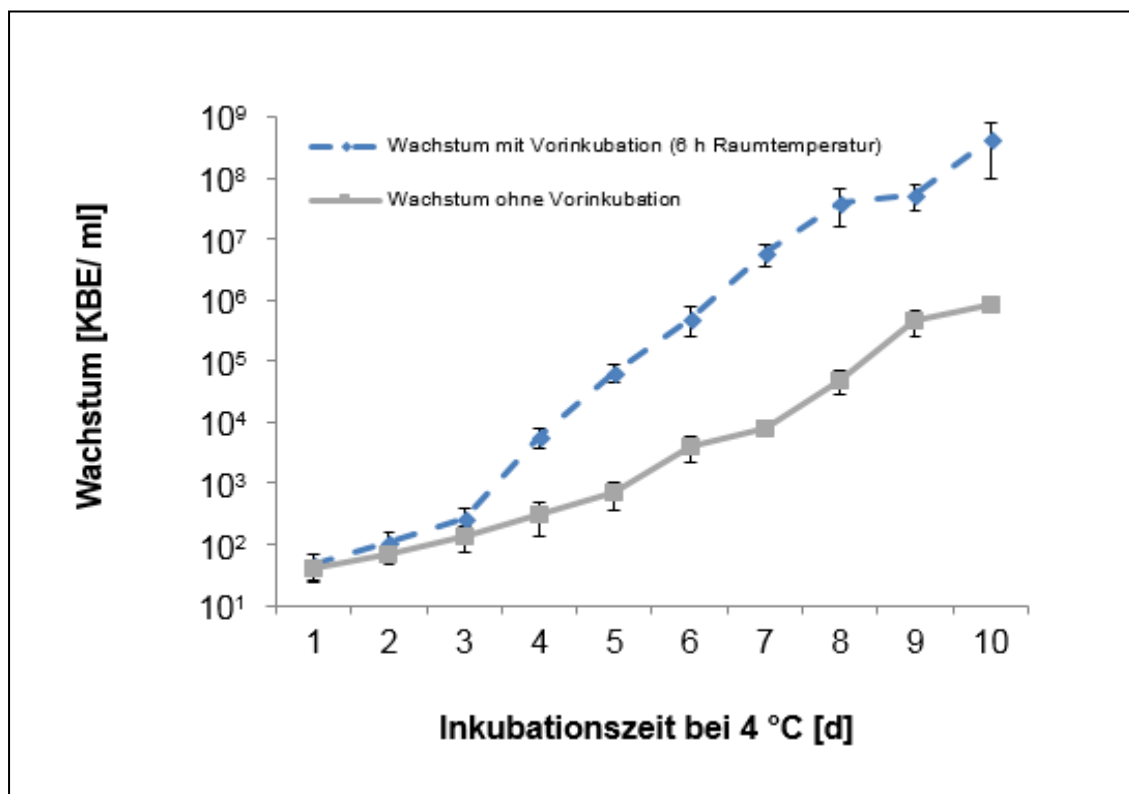


Abbildung 9: Wirkung einer Vorinkubation auf das Wachstum von *Y. pseudotuberculosis*. Gezeigt ist das Wachstum von *Y. pseudotuberculosis* bei 4 °C mit und ohne Vorinkubation bei Raumtemperatur. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Stämme (O:1 bis O:6) aus drei unabhängigen Experimenten. Standardabweichungen werden durch vertikale Balken angezeigt.

5.1.3 Modifizierung des CIN-Agar-Mediums (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar)

Um zu überprüfen, ob sich die antibiotisch wirkenden Bestandteile des CIN-Agar-Mediums (Cefsulodin, Irgasan und Novobiocin) auf das Wachstum von *Y. pseudotuberculosis* auswirken, wurden *Y. pseudotuberculosis*-Stämme (Serotypen: O:1a, O:1b, O:2a, O:2b, O:3, O:4, O:5a und O:6) auf CIN-Agar-Platten ausplattiert, die sowohl alle drei antibiotisch wirkenden Bestandteile enthielten, als auch auf modifizierten CIN-Agar-Platten, denen jeweils eine antibiotisch wirkende Komponente fehlte.

Innerhalb der verschiedenen Serotypen konnten keine Unterschiede im Wachstum in Abhängigkeit der CIN-Agar-Zusammensetzung festgestellt werden. Unabhängig davon, auf welchen antibiotisch wirkenden Bestandteil im Medium verzichtet wurde (Cefsulodin, Irgasan oder Novobiocin), war die Wirkung gleich. Die Lebendzellzahl war bei Verzicht eines Bestandteiles im Medium um 1 Log-Stufe erhöht, im Vergleich zu dem CIN-Agar-Medium, welches alle drei antibiotisch wirkenden Bestandteile enthielt. Während auf den modifizierten CIN-Agar-Platten eine durchschnittliche Lebendzellzahl von 10^5 KBE/ ml ermittelt werden konnte, betrug die durchschnittliche Lebendzellzahl beim klassischen CIN-Agar-Medium 10^4 KBE/ ml. Daher wurde für das Isolierungsverfahren kein modifiziertes CIN-Medium verwendet.

5.1.4 KOH-Behandlung

Die Kaliumhydroxid (KOH)-Behandlung, wie sie in der DIN EN ISO 10273:2017 für die Isolierung von *Y. enterocolitica* vorgesehen ist, wurde hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Wachstum von *Y. pseudotuberculosis*-Reinkulturen untersucht. In Vorversuchen hatte sich eine überaus starke Empfindlichkeit gegenüber einer Behandlung mit einer 0,5 prozentigen KOH-Lösung gezeigt. Aus diesem Grund wurden die Übernachtskulturen anstelle mit einer 0,5 prozentigen KOH-Lösung, wie sie in der DIN/ISO 10273 beschrieben ist, mit einer 0,25 prozentigen KOH-Lösung versetzt und die Wirkung auf die Wiedergewinnung von *Y. pseudotuberculosis* in Abhängigkeit von der Inkubationszeit betrachtet.

Innerhalb der verschiedenen Serotypen (O:1 bis O:5) konnten keine Unterschiede bei der Wiedergewinnung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit festgestellt werden. Alle verwendeten Stämme zeigten eine ähnliche und starke Empfindlichkeit gegenüber 0,25 prozentiger KOH-Behandlung. Bereits nach einer Inkubationszeit von 5 s betrug der Verlust der Lebendzellzahl mindestens 99 Prozent. Der in Kontrollversuchen praktizierte Austausch von LB-Agar statt CIN-Agar führte zu keiner signifikanten Verringerung des Lebendzellzahlverlustes. Die Wirkung der 0,25% KOH-Behandlung auf die Wiedergewinnung ist in der Abbildung 10 dargestellt.

Zusätzlich wurde die Wirkung einer Inkubation auf das Wachstum von fünf *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen (O:1 bis O:5) in künstlich kontaminierten Wildschwein-Tonsillen untersucht. Nach einer KOH-Behandlung für 5 s, 10 s oder 15 s konnte *Y. pseudotuberculosis* lediglich in wenigen Ansätzen nachgewiesen werden, insbesondere in Ansätzen mit einem hohen Inokulum von 10^8 KBE/ ml. Unterschiede innerhalb der verschiedenen Serotypen konnten nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 31 dargestellt.

Aufgrund der o. g. Ergebnisse wurde eine KOH-Behandlung für die Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* in der Prävalenzstudie weggelassen.

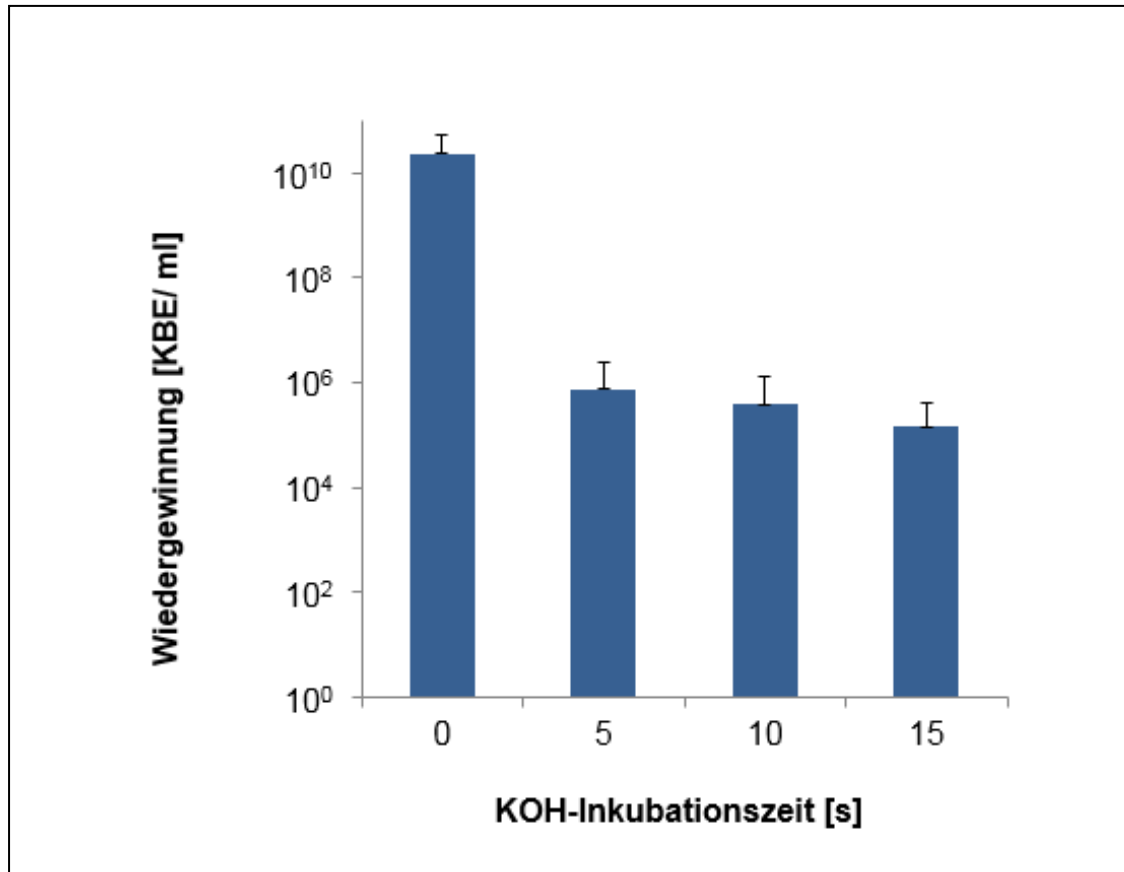


Abbildung 10: Effekt einer KOH-Behandlung auf *Y. pseudotuberculosis*. Gezeigt ist die Wirkung der 0,25%igen KOH-Lösung auf die Wiedergewinnung von *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen. Die Werte von sieben *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen wurden zusammengefasst, die die Serotypen O: 1 bis O: 6 abdeckten. Das Experiment wurde in dreifacher Wiederholung durchgeführt, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung darstellen.

5.1.5 Sensitivitätsprüfung der wzz-PCR

Die von Bogdanovich *et al.* (2003) publizierte PCR-Methode sollte bei dem Verfahren zur Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* aus tierischem Probenmaterial als erster molekularbiologischer Prüfschritt verwendet werden. Aus diesem Grund wurde die Sensitivität dieser PCR-Methode mit dem *Y. pseudotuberculosis*-Referenzstamm IP32953 überprüft.

Die PCR-Methode wurde mit unterschiedlich hohen DNA-Mengen des Referenzstammes IP32953 durchgeführt. Die wzz-spezifische Bande (418 bp)

konnte bis zu einer Menge von 65,5 fg nachgewiesen werden (Abb. 11). Dies entspricht ungefähr einer Bakterienzelle (Bogdanovich *et al.*, 2003). Aufgrund dessen wurde die *wzz*-PCR nach Bogdanovich *et al.* (2003) als erster molekularbiologischer Prüfschritt im modifizierten Nachweisverfahren zur Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* verwendet.

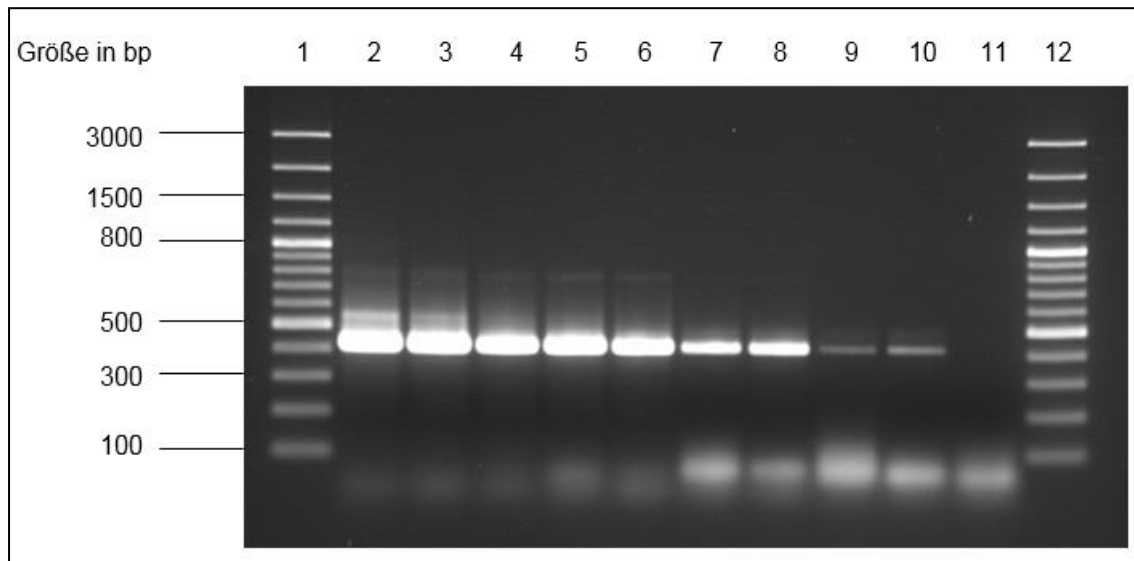


Abbildung 11: Agarosegel zur Sensitivitätsprüfung der *wzz*-PCR (Kunz, 2016). Gezeigt ist das 1,5 %ige Agarosegel der PCR-Produkte (*wzz*) des *Y. pseudotuberculosis*-Referenzstammes IP32953. Spuren: 1 und 12: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; 2: 100 ng; 3: 10 ng; 4: 1 ng; 5: 100 pg; 6: 100 pg; 7: 1 pg; 8: 500 fg; 9: 250 fg; 10: 125 fg und 11: 65,5 fg.

5.2 Modifiziertes Verfahren zur Isolierung von *Yersinia pseudotuberculosis* aus tierischem Probenmaterial

Die Untersuchungsergebnisse aus den vorangegangenen Kapitel wurden zusammengefasst und zur Erstellung eines modifizierten Verfahrensschemas zur Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* aus tierischem Probenmaterial verwendet (Abb. 12). Im Gegensatz zur Methodik der DIN EN ISO 10273:2017 wurde dabei auf das stark selektive Anreicherungsmedium ITC und die KOH-Behandlung verzichtet. Die Vorinkubation für 6 h bei Raumtemperatur ist ein

Verfahrensschritt, der speziell für die Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde und anschließend im modifizierten Verfahrensschema integriert worden ist. Während die Kälteanreicherung in der DIN EN ISO 10273:2017 lediglich im Anhang als ergänzendes Verfahren aufgeführt ist, ist diese Methodik im modifizierten Verfahrensschema ein wesentlicher Punkt. Des Weiteren wurden CIN-Agar-Platten statt 24 h ± 2 h für 48 h bei 28 °C inkubiert. Die wzz-PCR diente in diesem kombinierten Verfahren als erster molekularbiologischer Prüfschritt, der Auskunft über An- oder Abwesenheit von *Y. pseudotuberculosis* geben sollte. In Hinblick auf die Prävalenzstudie mit einem erhöhten Probenaufkommen diente dieser Schritt der Selektion von weiter zu bearbeitenden und nicht weiter zu bearbeitenden Proben.

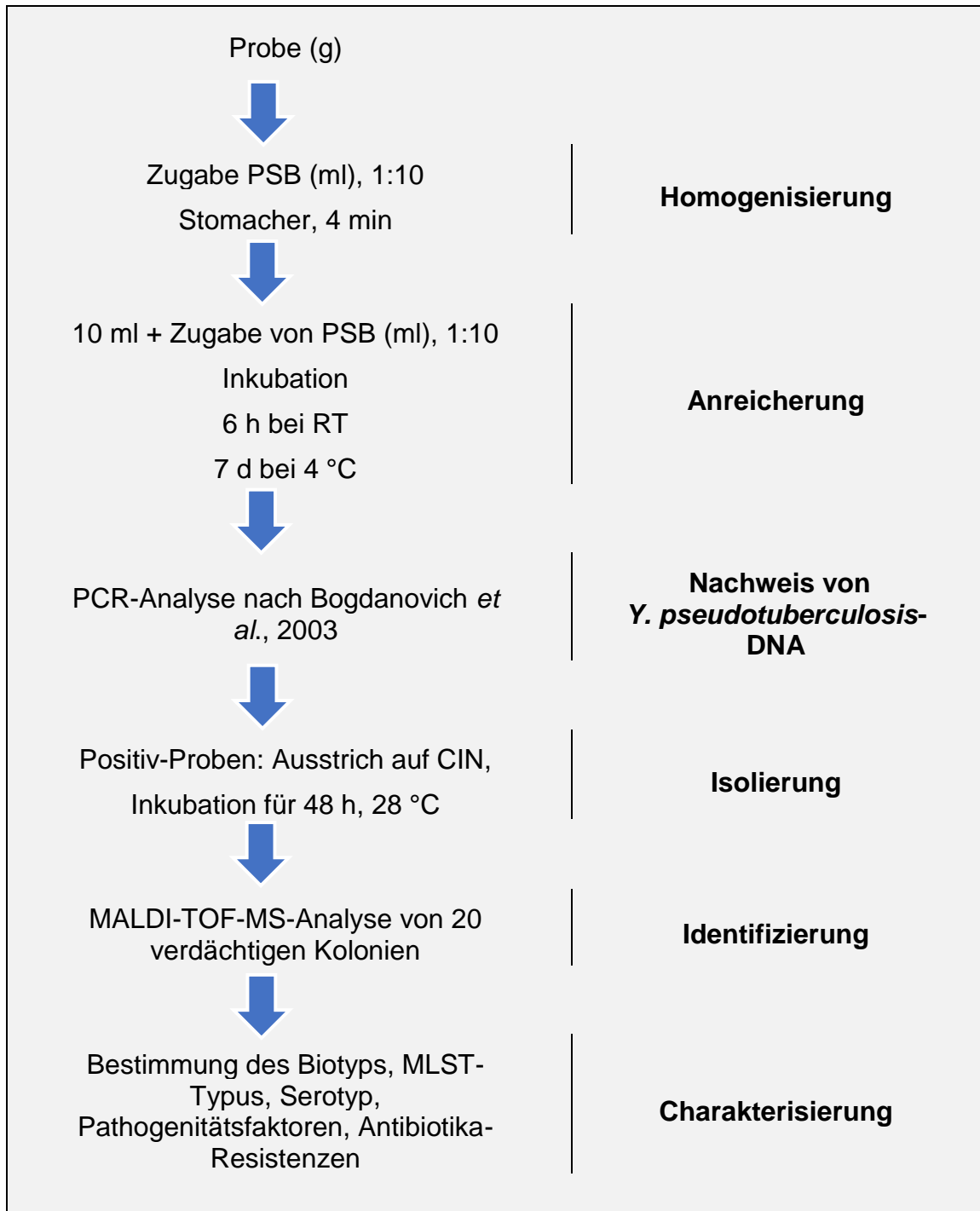


Abbildung 12: Modifiziertes Verfahrensschema zur Isolierung von *Yersinia pseudotuberculosis* aus tierischem Probenmaterial in Anlehnung an die DIN EN ISO 10273. Gezeigt ist das entwickelte modifizierte Schema für die Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* aus spezifischen tierischen Probenmaterial.

5.3 Testung des modifizierten Verfahrens mit künstlich kontaminierten Matrices

Um die Wirkung der zuvor modifizierten Kultivierungsschritte in der Praxis zu überprüfen, wurde das entwickelte Isolierungsschema (Abb. 12) an künstlich kontaminierten Tonsillen-Homogenaten angewendet und die Wiedergewinnung der eingesetzten *Y. pseudotuberculosis*-Stämme (O:1 bis O:5) erfasst. Das Experiment wurde parallel mit drei Tonsillen-Präparationen durchgeführt. In Tabelle 31 sind die Ergebnisse des modifizierten Isolierungsverfahrens im Vergleich mit und ohne KOH-Behandlung dargestellt. Ohne KOH-Behandlung konnten alle Serotypen unabhängig vom Initial-Inokulum wiedergewonnen werden. Im Vergleich dazu konnte nach einer KOH-Behandlung nur in wenigen Ansätzen *Y. pseudotuberculosis* nachgewiesen werden, insbesondere in Ansätzen mit einem hohen Inokulum von 10^8 KBE/ ml.

Tabelle 31: Wiedergewinnung von *Y. pseudotuberculosis* aus künstlich kontaminierten Wildschwein-Tonsillen unter Anwendung des modifizierten Isolierungsverfahrens im Vergleich mit und ohne KOH-Behandlung

Serotyp	Initial-Inokulum [KBE/ ml]	KOH-Behandlung [s]			
		0 s	5 s	10 s	15 s
O:1a	10 ⁶	+	(+)	-	(+)
	10 ⁷	+	-	-	-
	10 ⁸	+	+	+	(+)
O:1b	10 ⁶	+	-	-	-
	10 ⁷	+	(+)	(+)	(+)
	10 ⁸	+	+	(+)	(+)
O:3	10 ⁶	+	-	-	-
	10 ⁷	+	(+)	(+)	(+)
	10 ⁸	+	+	+	-
O:4	10 ⁶	+	-	(+)	(+)
	10 ⁷	+	+	-	-
	10 ⁸	+	+	-	(+)
O:5	10 ⁶	+	-	-	-
	10 ⁷	+	+	-	-
	10 ⁸	+	(+)	+	-

-: Keine Wiedergewinnung, (+): Wiedergewinnung in einer Tonsillen-Präparation, +: Wiedergewinnung in mehr als einer Präparation

5.4 Untersuchung der Prävalenz von *Yersinia pseudotuberculosis* in Schwarzwild im Nordosten Deutschlands

Mit Hilfe des neu entwickelten Isolierungsprotokolles wurde eine Prävalenz-Studie zum Vorkommen von *Y. pseudotuberculosis* in Wildschwein-Tonsillen durchgeführt. Dazu wurden Wildschweine aus Regionen mit besonders hohem Schwarzwild-Vorkommen in Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern untersucht. Die gewonnenen Isolate wurden charakterisiert und hinsichtlich ihres pathogenen Potenzials untersucht. Abschließend wurde die Verwandtschaft der Isolate analysiert.

5.4.1 Probenakquise

Insgesamt konnten Proben von 503 Stücken Schwarzwild entnommen werden. Die genaue Zusammensetzung der Strecke nach Alter und Geschlecht zeigt Tabelle 32.

Tabelle 32: Zusammensetzung der untersuchten Wildschweinstrecke nach Alter und Geschlecht

Altersklassen (AK)	Anzahl der beprobten Stücke	
	männlich	weiblich
0 (ca. 0-12 Monate)	116 (23,1 %)	121 (24 %)
1 (ca. 12-24 Monate)	100 (19,9 %)	95 (18,9 %)
2 (> 24 Monate)	32 (6,3 %)	39 (7,8 %)
Gesamt	503 (100 %)	

97 % der Proben stammten aus den Revieren Brandenburgs, die restlichen 3 % wurden im Bundesland Mecklenburg-Vorpommern genommen (Kap. 4.2.2.1.1, Tab. 19). Aus diesem Grund werden sich vergleichende Aussagen im Folgenden auf die aus Brandenburg stammende Probenmasse beziehen. Die Regionen

sollten so gewählt werden, dass ein hohes Probenaufkommen gewährleistet ist. Das Bundesland Brandenburg führt im Ländervergleich mit 76.512 Stücken die Jahresjagdstrecke 2016/ 2017 für das Schwarzwild an. Ebenso ist der Landkreis Uckermark, in dem 11 der 14 beprobten Reviere liegen, der Landkreis im Bundesland Brandenburg mit der höchsten Jahresjagdstrecke 2016/ 2017 für das Schwarzwild (9.794 Stücke) (Jagdbericht des Landes Brandenburg 2016/ 2017). Damit ist die o. g. Voraussetzung erfüllt worden. Betrachtet man die Streckenzusammensetzung der Probenmenge, so ist diese mit der Zusammensetzung des Landkreises Uckermark und des Landes Brandenburg vergleichbar (Abb. 13). Der größte Anteil bestand aus Stücken der Altersklasse 0, wohingegen der geringste Anteil durch Altersklasse 2 abgedeckt wurde.

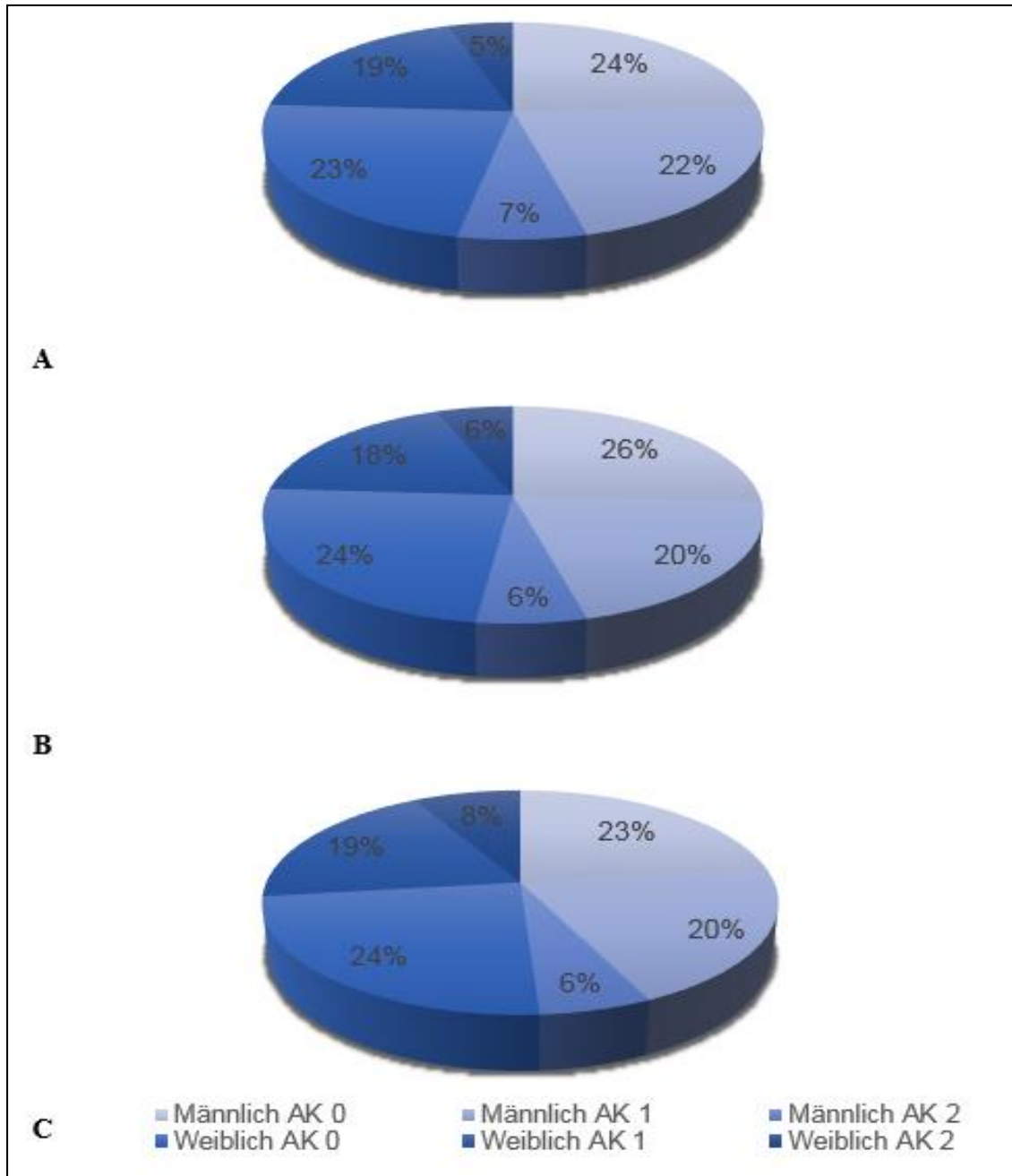


Abbildung 13: Streckenzusammensetzung beim Schwarzwild. A: Bundesland Brandenburg 2016/ 2017, **B:** Landkreis Uckermark 2016/ 2017 und **C:** Probenmenge in dieser Studie. AK: Altersklasse.

5.4.2 Prävalenz von *Yersinia pseudotuberculosis* im Schwarzwild

Insgesamt wurden 503 Wildschwein-Tonsillen auf das Vorkommen von *Y. pseudotuberculosis* untersucht. Dazu wurde die wzz-PCR-Methode von Bogdanovich *et al.* (2003) verwendet.

In 32 Proben (6,4 %) konnte das Produkt für das Zielgen wzz (418 bp) nachgewiesen werden. Bei allen positiven Proben wurde das modifizierte Verfahrensschema (Kap. 5.2) zur Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* angewandt, welches zur Gewinnung von 10 Isolaten führte (Tab. 33). Das entspricht einer Prävalenz von 2 %. Dabei stammen sieben Isolate von männlichen Wildschweinen. Ein Großteil der Isolate (n = 6) konnte aus Stücken der Altersklasse null gewonnen werden, während drei Isolate aus Wildschweinen der Altersklasse eins stammen (Tab. 33). Lediglich ein Isolat konnte aus der Altersklasse zwei, welche den geringsten Anteil der Schwarzwildstrecke ausmacht, isoliert werden.

Tabelle 33: Herkunft und Bezeichnung der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate

Isolat- Bezeichnung	Wildschwein- Geschlecht	Wildschwein -Alter	Datum Proben- Gewinnung
M66	♀	0	05.12.2015
M68	♀	0	05.12.2015
M69	♂	0	05.12.2015
M89	♂	0	11.12.2015
M91	♂	1	11.12.2015
M102	♂	0	12.12.2015
M126	♂	0	31.01.2016
M129	♀	1	31.01.2016
M207	♂	1	23.08.2016
M489	♂	2	10.12.2016

♀: Weiblich, ♂: Männlich

Tabelle 34: Prävalenz von *Y. pseudotuberculosis* im Schwarzwild aus dem Nordosten Deutschlands

Altersklassen	Anzahl der positiven Tiere			
	Kultur		PCR-Methode	
	♀	♂	♀	♂
0 (ca. 0-12 Monate)	2	4	9	8
1 (ca. 12-24 Monate)	1	2	3	10
2 (> 24 Monate)	0	1	0	2
Gesamt	3	7	12	20
Prozentsatz (%) von Gesamtanzahl 503	0,6	1,4	2,4	4

‰: Prozent, ♀: Weiblich, ♂: Männlich

5.5 Identifizierung der gewonnenen Isolate

Die in Tabelle 33 aufgeführten Isolate wurden im Vorfeld unter Verwendung der wzz-PCR-Methode, der MALDI-TOF Massenspektrometrie und der biochemischen Nachweisreihe identifiziert. Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse der verschiedenen Methoden gezeigt.

5.5.1 Identifizierung durch wzz-PCR

Eine erste Identifizierung der gewonnenen Isolate erfolgte mittels der PCR-Methode nach Bogdanovich *et al.* (2003). Diese Methode erlaubt die Unterscheidung zwischen der *Y. pseudotuberculosis*-*Y. pestis*-Gruppe und

anderen *Yersinia spp.* sowie Vertretern der Familie *Enterobacteriaceae*. Dabei ist das chromosomal lokalisierte *wzz*-Gen als Ziel-Gen bestimmt.

Für alle 10 Isolate konnte ein *wzz*-spezifisches Produkt von 418 bp im Agarosegel detektiert werden (Abb. 14).

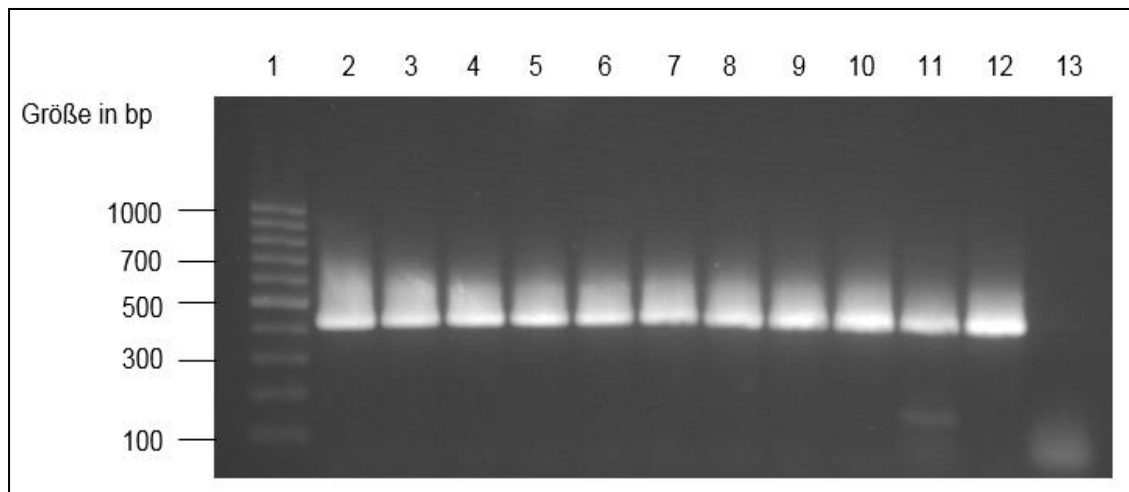


Abbildung 14: Agarosegel zur Identifizierung der gewonnenen Isolate durch die *wzz*-PCR (Kunz, 2016). Gezeigt ist ein 1,5 %ige Agarosegel mit den PCR-Produkten (*wzz*) der zehn *Y. pseudotuberculosis*-Isolate. Spuren: 1: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder; 2: Isolat M66; 3: Isolat M68; 4: Isolat M69; 5: Isolat M89; 6: Isolat M91; 7: Isolat M102; 8: Isolat M126; 9: Isolat M129; 10: Isolat M207; 11: Isolat M489; 12: Positivkontrolle und 13: Negativkontrolle.

5.5.2 Identifizierung durch MALDI-TOF Massenspektrometrie

Als Ergänzung zur *wzz*-PCR-Methode und der biochemischen Identifizierung wurde die MALDI-TOF Massenspektrometrie als weitere Identifizierungsmethode angewandt. Dabei wurde anhand des Proteinprofils der Isolate, im Abgleich mit der MALDI biotyper Database, die Identität der Isolate bestimmt. In Vorversuchen zeigte sich bezüglich der Ergebnis-Qualität („Score“) kein Unterschied zwischen einer Präparation der Proben mittel Ameisensäure-Ethanol-Extraktion und Direkt-Ausstrich. Aus diesem Grund wurde der zeitsparende und kostengünstige Direkt-Ausstrich angewandt. Alle Isolate

wurden mit einer Doppelmessung identifiziert. Laut Hersteller (Bruker Daltonics, Billerica, USA) ist bei einem Score von unter 1,70 eine Organismus-Identifikation nicht möglich. Ab 1,70-1,99 ist eine Identifizierung auf Gattungsebene möglich, eine Spezies-Erkennung jedoch unzuverlässig. Erst ab einem Score von 2,0 (-3,0) ist eine verlässliche Identifikation der Spezies möglich. In Tabelle 35 sind die Score-Werte der Isolate aufgelistet. Alle Isolate konnten mit einem Score größer als 2,3 identifiziert werden. Das entspricht einer verlässlichen Spezies-Identifikation.

Tabelle 35: MALDI-TOF MS-Score-Werte der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate aus Wildschweintonsillen

Isolat-Bezeichnung	Maldi-TOF MS-Score	
	1. Messung	2. Messung
M66	2,48	2,48
M68	2,37	2,38
M69	2,49	2,55
M89	2,55	2,44
M91	2,54	2,46
M102	2,54	2,48
M126	2,43	2,47
M129	2,54	2,44
M207	2,44	2,50
M489	2,49	2,51

5.5.3 Biochemische Identifizierung

Durch die Untersuchung von bestimmten biochemischen Reaktionen ist es möglich, innerhalb der Gattung *Yersinia* zwischen den Spezies zu differenzieren.

Bei der Betrachtung der gewonnenen Isolate ließen sich folgende biochemische Eigenschaften beobachten (Tab. 36):

Alle Isolate waren in der Lage, Harnstoff zu spalten. Aus diesem Grund konnten die Spezies *Y. pestis*, *Y. ruckeri* und *Y. nurmii* ausgeschlossen werden. Insbesondere die Reaktionen zur Unterscheidung der Yersiniose-
verursachenden Spezies *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* waren von Interesse, da hier eine Verwechslungsgefahr besteht. Alle Isolate waren hinsichtlich der Tests Voges-Proskauer und Sorbitol-Fermentation negativ. Äskulin hingegen konnte von allen Isolaten gespalten werden. Diese Eigenschaften sind typisch für *Y. pseudotuberculosis* und sind bei *Y. enterocolitica* genau entgegengesetzt ausgeprägt. Des Weiteren war kein Isolat in der Lage, Tryptophan zu Indol, Pyruvat und Ammoniak zu spalten sowie Citrat als Energiequelle zu verwenden. Die Verstoffwechslung von Rhamnose war allen Isolaten möglich. Hingegen wurde Melibiose lediglich von den Isolaten M66 M68 und M69 umgesetzt. Zur Geißelbildung waren von den 10 Isolaten nur M68, M69 und M102 befähigt.

Tabelle 36: Übersicht der biochemischen Eigenschaften der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate aus Wildschweintonsillen

Biochemischer Test (28 °C)	Isolat-Bezeichnung									
	M66	M68	M69	M89	M91	M102	M126	M129	M207	M489
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zitrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Äskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Beweglichkeit	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-

-: Negativ, +: Positiv

5.6 Charakterisierung der gewonnenen Isolate

Nach der Identifizierung der Isolate aus den Wildschweintonsillen als *Y. pseudotuberculosis* folgen in diesem Kapitel die Ergebnisse der Isolat-Charakterisierung. Dazu gehört die Feststellung der Kolonie- und Zellmorphologie, die Bestimmung des Sero- und Biotyps sowie des MLST-Typs und die Ermittlung von möglichen Antibiotika-Resistenzen und Pathogenitätsfaktoren.

5.6.1 Kolonie- und Zellmorphologie der gewonnenen Isolate

Die 10 *Y. pseudotuberculosis*-Isolate wurden untersucht auf die Ausprägung ihrer Zellmorphologie und Koloniemorphologie.

Zusammenfassend ist zur Zellmorphologie zu sagen, dass es sich um *Enterobacteriaceae* typische eiförmige oder stäbchenförmige Zellen handelte (Abb. 15). Die Zellen hatten eine Länge von 1-3 μm und eine Breite von 0,5-0,8 μm . Exemplarisch für alle Isolate sind in Abbildung 15 elektronenmikroskopisch die Isolate M129 (A) und M91 (B) dargestellt.

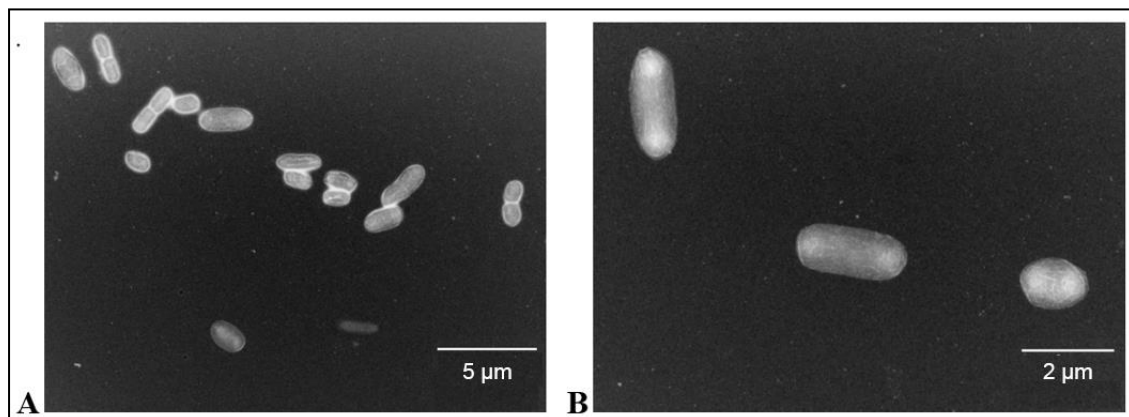


Abbildung 15: Zellmorphologie der *Y. pseudotuberculosis*- Isolate. Gezeigt sind die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von den *Y. pseudotuberculosis*-Isolaten M129 (A) und M91 (B) exemplarisch für alle zehn *Y. pseudotuberculosis*-Isolate aus Wildschweintonsillen (Aufnahmen bereitgestellt von Herrn Dr. J. Reetz, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin).

Hinsichtlich der Koloniemorphologie verhielten sich alle Isolate insofern gleich, als dass sie auf dem CIN-Agar-Medium, die für Yersinien typischen „bull’s eye“-Kolonien bildeten. Die Isolate M68 und M102 formten kleine runde Kolonien mit einem glatten Rand und fester bis krustiger Konsistenz, die zum Teil schwer von der Agar-Platte zu lösen waren (Abb. 16A). Im Gegensatz dazu waren die Kolonien der Isolate M126, M129, M207 und M489 größer mit einem welligem bis unregelmäßigem Rand und weicher bis schleimiger Konsistenz (Abb. 16C). Eine Besonderheit zeigte sich bei den Isolaten M66, M69, M89 und M91. Hier wurden bei ein und demselben Isolat zwei Kolonieformen beobachtet. Die Isolate hatten sowohl kleine runde Kolonien mit glattem Rand und fester Konsistenz, als auch große Kolonien mit unregelmäßigem Rand und weicher Konsistenz (Abb. 16B).

Die morphologisch unterschiedlichen Kolonien der Isolate M66, M69, M89 und M91 wurden nachfolgend auf Anwesenheit des Virulenzplasmids pYV untersucht. Dazu wurde die DNA von je einer kleinen und einer großen Kolonie eines jeden Isolates mittels der *virF*-PCR-Methode überprüft. Es zeigte sich, dass unabhängig vom Isolat kleine Kolonien das Plasmid pYV enthielten, während die größeren Kolonien plasmidlos waren und kein *virF*-PCR-Produkt (700 bp) nachgewiesen werden konnte (Abb. 17).

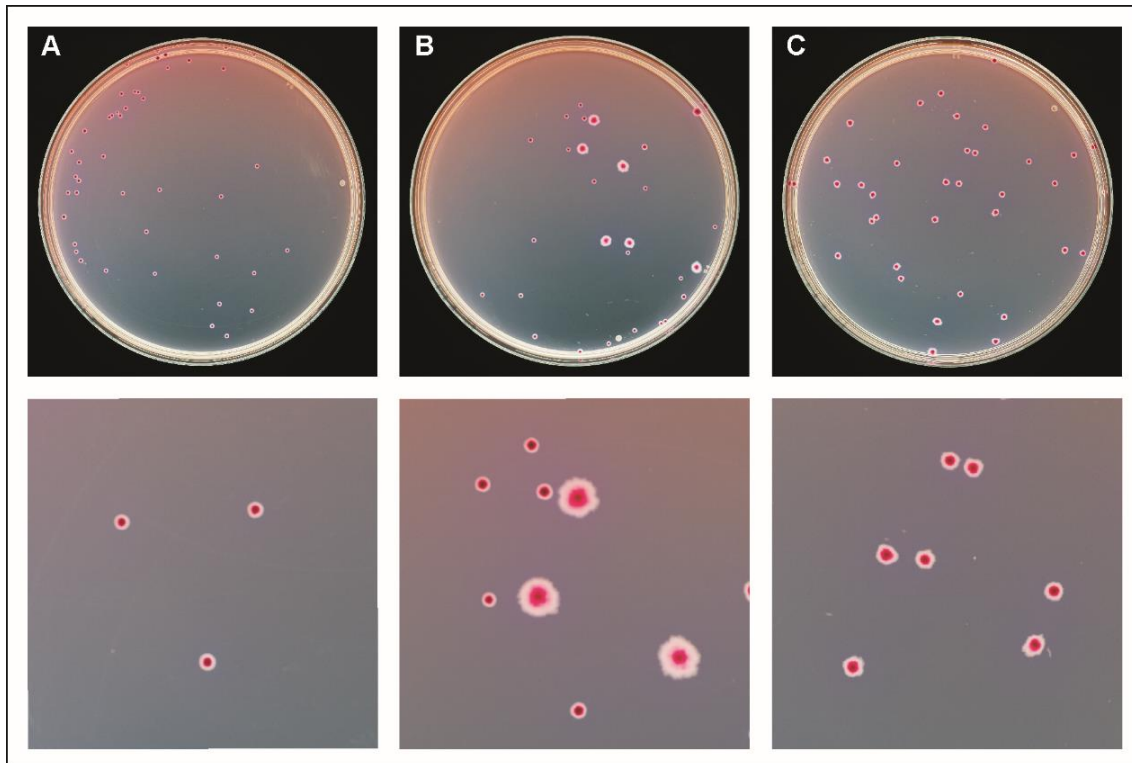


Abbildung 16: Koloniemorphologien der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate aus Wildschweintonsillen (Kunz, 2016). Gezeigt werden die unterschiedlichen Koloniemorphologien der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate auf CIN-Agar-Platten. Dabei zeigt die obere Abbildung jeweils die Agar-Platte und die darunter liegende Abbildung den dazugehörigen vergrößerten Ausschnitt. **A** Isolat M68 repräsentativ für kleine, runde Kolonien mit einem glatten Rand und fester bis krustiger Konsistenz. **B** Isolat M89 repräsentativ für kleine runde Kolonien mit glattem Rand und fester Konsistenz sowie auch große Kolonien mit unregelmäßigen Rand und weicher Konsistenz. **C** Isolat M126 repräsentativ für große Kolonien mit unregelmäßigen Rand und weicher bis schleimiger Konsistenz.

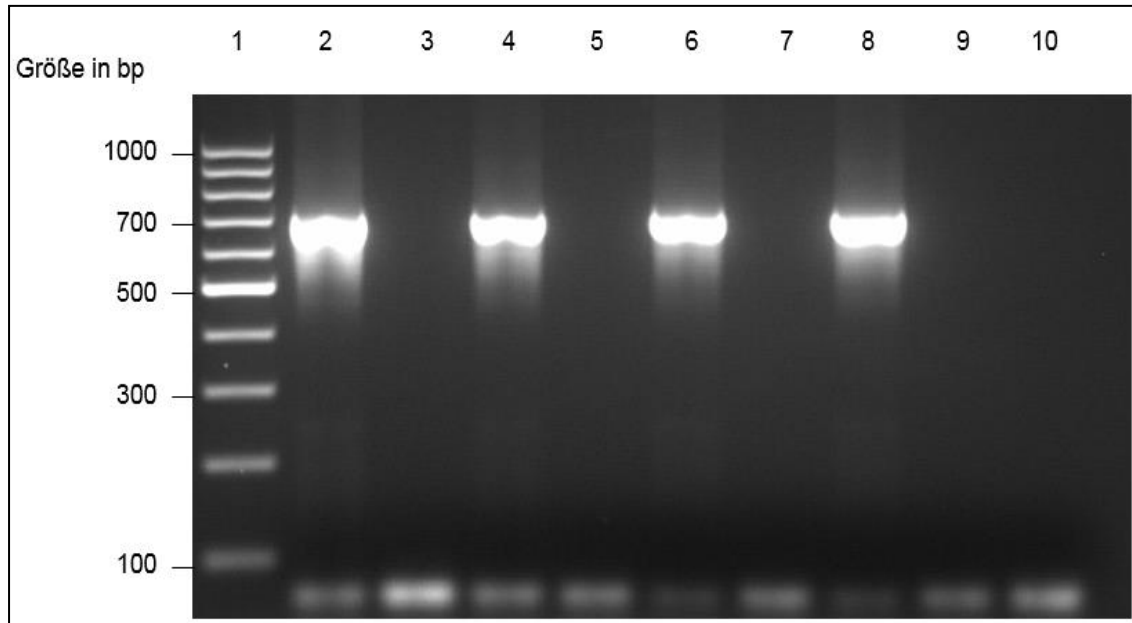


Abbildung 17: Agarosegel der *virF*-PCR der morphologisch unterschiedlichen Kolonien (Isolat M66, M69, M89 und M91) (Kunz, 2016). Gezeigt ist das 1,5 %ige Agarosegel der PCR-Produkte (*virF*) der vier *Y. pseudotuberculosis*-Isolate M66, M69, M89 und M91. Spuren: 1: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder; 2: Isolat M66 kleine Kolonie; 3: Isolat M66 große Kolonie; 4: Isolat M69 kleine Kolonie; 5: Isolat M69 große Kolonie; 6: Isolat M89 kleine Kolonie; 7: Isolat M89 große Kolonie; 8: Isolat M91 kleine Kolonie; 9: Isolat M91 große Kolonie; 10: Negativkontrolle.

5.6.2 Biotyp der gewonnenen Isolate

Die 10 *Y. pseudotuberculosis*-Isolate wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Citrat, Melibiose und Raffinose zu verwerten. Anhand dieser Eigenschaften kann *Y. pseudotuberculosis* in Biotypen unterteilt werden (Kap. 4.2.2.3.2, Tab. 23).

Die Isolate M89, M91, M102, M126, M129, M207 und M489 waren nicht in der Lage, Citrat, Melibiose und Raffinose zu verstoffwechseln. Demnach können diese Isolate dem Biotyp 2 zugeordnet werden. Bei den Isolaten M66, M68 und M69 konnte eine Melibiose-Fermentation beobachtet werden, jedoch waren diese Isolate nicht befähigt, Citrat und Raffinose zu verwerten.

Dementsprechend gehören die Isolate M66, M68 und M69 zum Biotyp 1. Die Ergebnisse sind in Tabelle 37 übersichtlich dargestellt.

Tabelle 37: Übersicht der Biotypen und der zugehörigen biochemischen Eigenschaften der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate

Isolat- Bezeichnung	Biochemischer Test (25-30 °C)			Biotyp
	Melibiose	Zitrat	Raffinose	
M66	+	-	-	1
M68	+	-	-	1
M68	+	-	-	1
M89	-	-	-	2
M91	-	-	-	2
M102	-	-	-	2
M126	-	-	-	2
M129	-	-	-	2
M207	-	-	-	2
M489	-	-	-	2

-: Negativ, +: Positiv

5.6.3 Serotyp der gewonnenen Isolate

Eine weitere Differenzierung kann durch die Bestimmung des Serotyps beruhend auf dem Nachweis der Oberflächen (O-)Antigene erfolgen. Die dazu von Bogdanovich *et al.* (2003) entwickelten PCR-Verfahren ermöglichen eine Unterscheidung der 21 bekannten Serotypen von *Y. pseudotuberculosis*. Das Multiplex-PCR-Assay enthielt neun Sätze von spezifischen PCR-Primern, die eine Trennung der Serotypen O:1a-c; O:2a-c; O:3; O:4a, b; O:5a, b; O:6; O:8; O:11; O:12; O:13; O:14 und O:15 ermöglichten. Das Duplex-PCR-Assay erlaubte mit zwei Primer-Paaren eine Unterscheidung der Serotypen O:7, O:9

und O:10. Für die Isolate M66, M68, M69, M89, M91, M102 und M207 konnten die PCR-Produkte *ddhC-prt* (1072 bp), *wbyH* (528 bp), *ddhA-B* (407 bp) und *wzx* (105 bp) nachgewiesen werden. Folglich wurden diese Isolate dem Serotyp O:1a zugeordnet. Bei den Isolaten M126 und M129 wurden PCR-Produkte für die Gene *gmd-fcl* (1370 bp), *ddhC-prt* (1072 bp), *manB* (963 bp), *wbyL* (644 bp), *wbyH* (528 bp), *ddhA-B* (407 bp) und *wbyK* (307 bp) amplifiziert. Anhand der Ergebnisse wurden diese Isolate zu dem Serotyp O:1b zugeordnet. Das Isolat M489 zeigte das Bandenmuster für den Serotyp O:4a mit PCR-Produkten für *manB* (963 bp) und *ddhA-B* (407 bp).

Die Duplex-PCR wurde aufgrund der eindeutigen Ergebnisse der Multiplex-PCR lediglich als Kontrolle durchgeführt und bestätigte o. g. Erkenntnisse. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 18 und Tabelle 36 dargestellt.

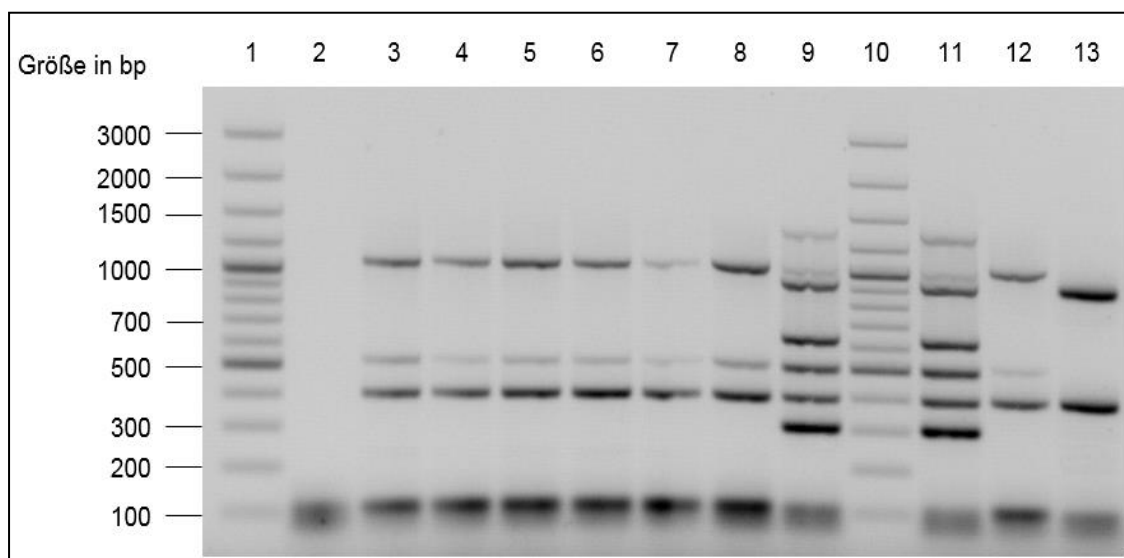


Abbildung 18: Agarosegel der Multiplex-PCR zur Serotyp-Bestimmung der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate. Gezeigt ist ein 1,5 %iges Agarosegel der Multiplex-PCR-Produkte. Spuren: 1: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; 2: Negativkontrolle; 3: Isolat M66; 4: Isolat M68; 5: Isolat M69; 6: Isolat M89; 7: Isolat M91; 8: Isolat M102; 9: Isolat M126; 10: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; 11: Isolat M129; 12: Isolat M207; 13: Isolat 48

Tabelle 38: Überblick über die Zusammensetzung der O-Antigen-Gencluster und dem daraus folgenden Serotypen der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate

Target-Gen	Isolat-Bezeichnung									
	M66	M68	M69	M89	M91	M102	M126	M129	M207	M489
<i>gmd-fcl</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>ddhC-prt</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>manB</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>abe</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>wbyL</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>wbyH</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>ddhA-B</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>wbyK</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>wzx</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>wzz-gsk</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>hemH-ddhD</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serotyp	O:1a	O:1a	O:1a	O:1a	O:1a	O:1a	O:1b	O:1b	O:1a	O:4a

-: Negativ, +: Positiv

5.6.4 Antibiotika-Resistenzen der gewonnenen Isolate

Die *Y. pseudotuberculosis*-Isolate aus den Wildschweintonsillen wurden auf mögliche Antibiotika-Resistenzen untersucht. Dazu wurde die Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika getestet (Kap. 4.2.2.3.4, Tab. 28). Der Bouillon-Mikrodilutionstest wurde nach den Richtlinien des Clinical and Laboratory Standards Institute (M07-A10) durchgeführt.

Zusammenfassend betrachtet zeigten die Untersuchungen, dass die Isolate gegenüber den meisten antimikrobiellen Substanzen sensitiv waren und mit einem gehemmten oder ausbleibenden Wachstum reagierten. Nur in wenigen Fällen unterschieden sich einzelne Isolate von den Restlichen (Tab. 39). Beispielsweise zeigten die Isolate M126 und M129 eine weniger stark ausgeprägte Sensitivität gegenüber Azithromycin (8 µg/ml und 16 µg/ml) als die übrigen acht Isolate (4 µg/ml). Des Weiteren konnte bei allen Isolaten, mit Ausnahme von Isolat M489, ein Wachstum bei einer Colistin- Konzentration von mehr als 16 µg/ml verzeichnet werden. M489 hingegen zeigte ein verringertes Wachstum bereits bei einer Colistin- Konzentration von ≤ 1 µg/ml. Betrachtet man die minimalen Hemmkonzentrationen der Isolate gegenüber Ampicillin, besitzt das Isolat M92 die am geringsten ausgebildete Sensitivität. Während M92 erst bei einer Ampicillin-Konzentration von 2 µg/ml ein gehemmtes Wachstum zeigte, reagierten die übrigen neun Isolate bereits bei ≤ 1 µg/ml Ampicillin. Keine Unterschiede zwischen den Isolaten hinsichtlich ihrer Sensitivität konnte bei den folgenden antimikrobiellen Substanzen beobachtet werden: Sulfamethoxazol, Ceftazidim/ Clavulansäure, Cefotaxim/ Clavulansäure, Tetracyclin, Meropenem, Nalidixinsäure, Ceftazidim, Cefepim, Temocillin, Cefotaxim, Chloramphenicol und Tigecyclin.

Die Suche nach Antibiotika-Resistenzgenen in den Daten der Gesamt-Genom-Sequenzierung der Isolate durch ResFinder 3.0 Analyse (Zankari *et al.*, 2012; <https://cge.cbs.dtu.dk/Services/ResFinder>) führte zu keinen weiteren Treffern.

Ergebnisse

Antibiotikum	Isolat-Bezeichnung									
	M66	M68	M69	M89	M91	M102	M126	M129	M207	M489
	Hemmkonzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]									
Ampicillin	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	2	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Gentamicin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
Cefoxitin	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2
Ertapenem	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
Imipenem	0,25	0,25	0,25	0,12	0,12	0,25	0,12	0,12	0,25	0,25
Cefepim	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$
Temocillin	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Trimethoprim	0,5	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0,5	0,5	0,5	2	0,5	1
Ciprofloxacin	0,03	0,03	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$	0,03	0,03	$\leq 0,015$	0,03	0,03	$\leq 0,015$
Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$
Chloramphenicol	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 8
Tigecyclin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$

\leq : kleiner als/ gleich groß; $>$: größer als

5.6.5 Multi-Lokus-Sequenz-Typus (MLST) der gewonnenen Isolate

Bei der Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung werden mehrere verschiedene Loci, sog. „house-keeping“ Gene, aus dem bakteriellen Genom amplifiziert und deren Sequenzen ermittelt. Bei den betrachteten Loci handelt es sich meistens um hochkonservierte Regionen, die am zentralen Stoffwechsel beteiligt sind, aber dennoch eine gewisse Variabilität aufweisen. Anhand dieser Sequenzvariation können verschiedene Isolate der gleichen Spezies unterschieden werden. Für die *Y. pseudotuberculosis*-Isolate wurde der Multi-Lokus-Sequenz-Typ bestimmt, indem die entsprechenden DNA-Regionen (Ch'ng *et al.*, 2011) aus dem Datensatz der Gesamt-Genom-Sequenzierung herangezogen und unter Verwendung der Software MLST 1.8 analysis pipeline vom Center for Genomic Epidemiology analysiert wurden (Larsen *et al.*, 2012).

Insgesamt konnten die 10 *Y. pseudotuberculosis*-Isolate in drei MLST-Typen unterschieden werden. Die größte Gruppe bildet der MLST-Typ 42 mit den Isolaten M66, M68, M69, M102, M126, M129 und M207. Der MLST-Typ 9 wird von den Isolaten M89 und M91 repräsentiert. Der alleinige Vertreter des MLST-Typs 23 ist das Isolat M489.

Tabelle 40: Multi-Lokus-Sequenz-Typus (MLST) der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate

MLST-Typ	Zugehörige Isolate
9	M89 und M91
23	M489
42	M66, M68, M69, M102, M126, M129

5.6.6 Pathogenitätspotenzial der gewonnenen Isolate

Die zehn *Y. pseudotuberculosis*-Isolate wurden auf das Vorhandensein von Virulenzgenen, die auf dem Chromosom oder auf dem Plasmid pYV lokalisiert sind, analysiert. Die Untersuchungen erfolgte sowohl mit mikrobiologischen

(MOX-Test), als auch mit molekularbiologischen Verfahren (PCR, Gesamt-Genom-Sequenzierung).

5.6.6.1 Das Virulenzplasmid pYV

Das Virulenzplasmid pYV kodiert für eine Reihe von *Yersinia-outer membrane proteins* (Yops). Diese schützen die Bakterien vor dem Immunsystem des Wirts und ermöglichen die Vermehrung und Ausbreitung des Erregers. Einige Yops haben eine toxische Wirkung und werden durch ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) sezerniert und dann von eukaryotischen Zellen aufgenommen. YadA ist ebenfalls ein pYV-kodiertes Protein, das durch seine Kollagen bindende Eigenschaft für die Autoagglutination sowie die Serumresistenz wichtig ist und die Adhärenz an die Epithelzellen ermöglicht. VirF ist ein transkriptioneller Aktivator der *yop*-Gene und kontrolliert die Calcium-Abhängigkeit.

Der für den CR-MOX-Test verwendete Kongorot-Magnesium Oxalat- Agar erlaubte den mikrobiologischen Nachweis von pYV. Plasmidlose Zellen bildeten farblose größere Kolonien, wohingegen plasmidtragende Zellen kleine rote Kolonien erzeugten. Sechs *Y. pseudotuberculosis*-Isolate (M66, M68, M69, M89, M91 und M102) zeigten rote winzige Kolonien, was nahelegt, dass das plasmidkodierte VirF vorhanden und funktionell war. Dagegen zeigten sich bei den vier Isolaten M126, M129, M207 und M489 ausschließlich farblose, größere Kolonien (Abb. 19). Auch durch die *virF*-PCR nach Thoerner *et al.* (2003) konnte bei diesen vier Isolaten kein pYV nachgewiesen werden (Abb. 20). Die Daten der Gesamt-Genom-Sequenzierung belegten dieses zusätzlich. Ausschließlich für die Isolate M66 bis M102 konnten die Sequenzen von *yadA* und *virF* detektiert werden.

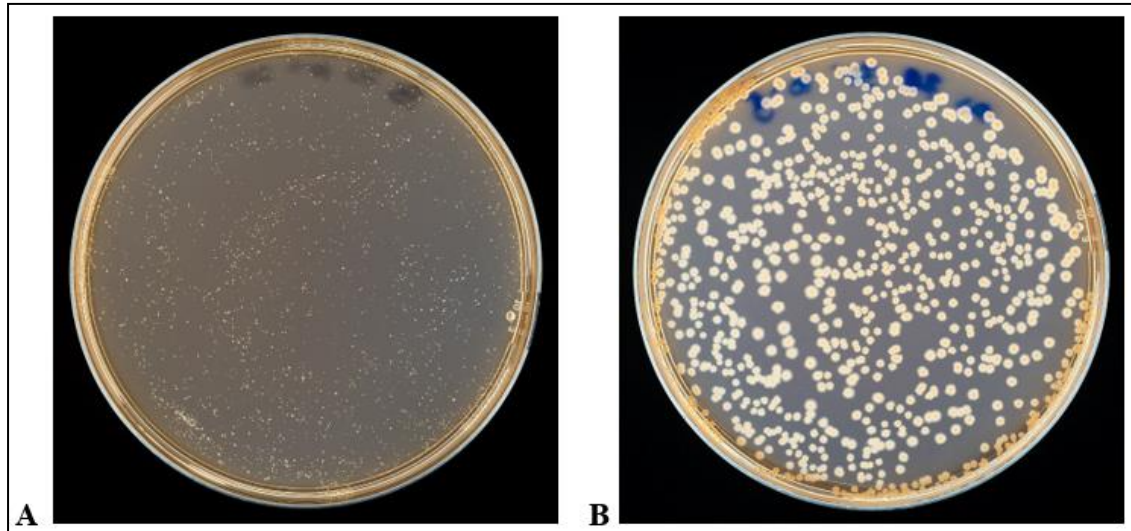


Abbildung 19: Mikrobiologischer Nachweis von pYV anhand des CR-MOX-Tests (Kunz, 2016). Gezeigt sind CR-MOX-Agar-Platten mit *Y. pseudotuberculosis*-Isolaten nach einer Inkubation bei 37 °C für 48 h. **A:** Isolat M66 repräsentativ für kleine, rote und plasmidhaltige Kolonien, **B:** Isolat M489 repräsentativ für große, farblose und plasmidlose Kolonien.

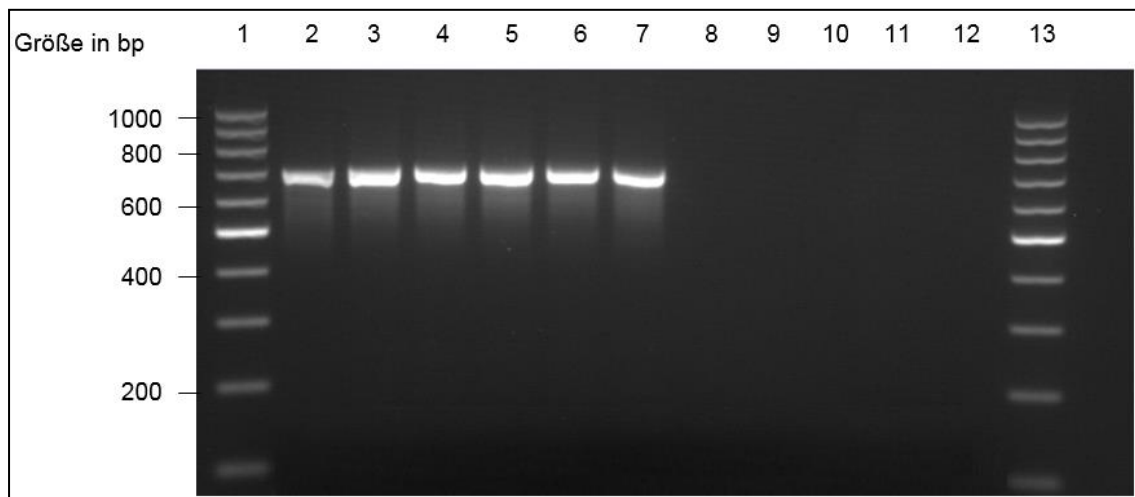


Abbildung 20: Agarosegel der *virF*-PCR der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate (Kunz, 2016). Gezeigt ist ein 1,5 %ige Agarosegel der PCR-Produkte (*virF*) der zehn *Y. pseudotuberculosis*-Isolate. Spuren: 1: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder; 2: Isolat M66; 3: Isolat M68; 4: Isolat M69; 5: Isolat M89; 6: Isolat M91; 7: Isolat M102; 8: Isolat M126; 9: Isolat M129; 10: Isolat M207; 11: Isolat M489; 12: Negativkontrolle; 13: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder.

5.6.6.2 Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren

Neben plasmidkodierten Virulenzfaktoren sind auch chromosomalkodierte Merkmale zur vollständigen Ausprägung der Virulenz bei Yersinien von entscheidender Bedeutung (Atkinson und Williams, 2016).

Enteropathogene Yersinien tragen die Gene *ail* (Attachment Invasion Locus) und *inv* (Invasin) auf ihrem Chromosom, die das Festhalten und Eindringen in eukaryotische Zellen unterstützen sowie für die Serumresistenz verantwortlich sind (Kap. 2.4.2). *Ail* und *inv* wurden in neun Isolaten durch die Daten der Gesamt-Genom-Sequenzierung nachgewiesen, nur einem Isolat (M102) fehlten diese beiden Gene. Auch durch eine Überprüfung mittels PCR nach Novoslavskij *et al.* (2010) und Thoerner *et al.* (2003) konnte kein Nachweis für Isolat M102 erbracht werden. Es ist daher davon auszugehen, dass dieses Isolat keine Gene für die Synthese von Ail und Inv besitzt.

Das Superantigen YPM („*Y. pseudotuberculosis*-derived mitogen“) ist während einer *Y. pseudotuberculosis*-Infektion von Bedeutung. Es führt zur Freisetzung großer Mengen inflammatorischer Zytokine, die zu einem toxischen Schock und Gewebeschäden führen können. Aktuell sind drei Allele des *ypm*-Gens (*ypmA*, *ympB* und *ypmC*) bekannt. *Y. pseudotuberculosis* ist das einzig bekannte gram-negative Bakterium, welches ein Superantigen produziert (Goubard *et al.*, 2015). Jedoch konnte in dieser Studie durch die Daten-Analyse der Gesamt-Genom-Sequenzierung für kein Isolat ein Nachweis hinsichtlich *ypmA*, *ympB* und *ypmC* erbracht werden. Auch die Untersuchungen mit den PCR-Methoden von Fukushima *et al.* (2001) führten zu dem gleichen Ergebnis. Folglich ist anzunehmen, dass kein *Y. pseudotuberculosis*-Isolat aus den untersuchten Wildschweintonsillen die genetischen Voraussetzungen erfüllt, um das Superantigen YPM zu synthetisieren.

Ähnlich wie bei dem Superantigen YPM ist die Hochpathogenitätsinsel (HPI) eng mit den Symptomen einer von *Y. pseudotuberculosis* hervorgerufenen Yersiniose verbunden. Die HPI kodiert Proteine, die an der Biosynthese, Regulation und Transport des Siderophors Yersiniabactin beteiligt sind. Somit ist die Anwesenheit der HPI von Bedeutung für die Aufnahmesteuerung von

Eisen, einem lebenswichtigen Element für fast alle Lebensformen. In sechs Isolaten konnte eine vollständige HPI nachgewiesen werden (M66, M68, M69, M89, M129 und M207). Auffällig war, dass bei dem Isolat M489 kein HPI-assoziiertes Gen detektiert werden konnte. Lediglich die Sequenz für einen *asnT-int*-Lokus, welcher die HPI einrahmt und im Zusammenhang mit der genetischen Mobilität der HPI gebracht wird, konnte detektiert werden. Drei Isolate (M91, M102 und M126) besaßen eine partielle HPI, bei der einige Gene enthalten waren und einige abwesend. Für die Funktionalität der HPI sind insbesondere die vier Gene-Bereiche *psn*, *irp1*, *irp2*, *ybtP-ybtQ* von Bedeutung. In dem Isolat M91 fehlten die Gene *psn*, *irp1* und *irp2*, während in den Isolaten M102 und M126 nur *psn* bzw. *irp1* fehlten.

Zusammenfassend zeigt die Analyse der Virulenzfaktoren der zehn *Y. pseudotuberculosis*-Isolate aus Wildschweintonsillen, dass sie sich hinsichtlich ihres pathogenen Potentials unterscheiden. Nur vier Isolate besaßen sowohl das Virulenzplasmid pYV als auch wichtige chromosomale Virulenz-Gene (*ail*, *inv*, komplette HPI). Gestützt wird dieses Ergebnis durch die kongruierenden Resultate der verschiedenen Methoden (MOX-Test, PCR und Gesamt-Genom-Sequenzierung). Eine Übersicht zu den Virulenz-Eigenschaften der untersuchten Isolate ist in Tabelle 41 aufgeführt.

Ergebnisse

Charakteristikum	Isolat-Bezeichnung									
	M66	M68	M68	M89	M91	M102	M126	M129	M207	M489
HPI										
<i>IS100</i> ^g	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>psn</i> ^g	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>yptE</i> ^g	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>irp1</i> ^g	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>irp2</i> ^g	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>ybtP-ybtQ</i> ^g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>ybtX-ybtS</i> ^g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>int</i> ^g	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>asnT-int</i> ^g	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

+: Positiv, -: Negativ, Referenzsequenzen: ^a: AF056092, ^b: HE805268, ^c: NC_006155, ^d: AF335466, ^e: AF418982, ^f: AF414083, ^g: BX936398

5.7 Phylogenetische Beziehung zwischen den gewonnenen Isolate

Für einen ersten Überblick der Verwandtschaftsverhältnisse der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate wurde eine Puls-Feld-Gel-Elektrophorese (PFGE)-Analyse durchgeführt. Die PFGE-Analyse bietet einen guten Überblick über das Restriktionsmuster des Gesamtgenoms und wurde in dieser Studie mit dem Restriktionsenzym *NotI* realisiert. Als Standardmarker wurde die DNA von *Salmonella Braenderup* H9812 mit dem Restriktionsenzym *XbaI* verdaut. Der Restriktionsverdau verlief für alle Isolate erfolgreich und die Ergebnisse sind in der Abbildung 21 dargestellt. Ein Vergleich der zehn Isolate anhand ihrer Bandenmuster ergab fünf verschiedene Restriktionsmustergruppen. Der Unterschied zwischen den Bandenmustern der Isolate lag zwischen zwei und zehn Fragmenten.

Tabelle 42: PFGE-Restriktionsmustergruppen der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate

PFGE-Restriktionsmustergruppe	Dazugehörige Isolate	Agarosegel-Spuren
1	M66, M68, M69	2, 3, 4
2	M89, M91	5, 6
3	M102, M207	7, 11
4	M126, M129	8, 10
5	M489	12

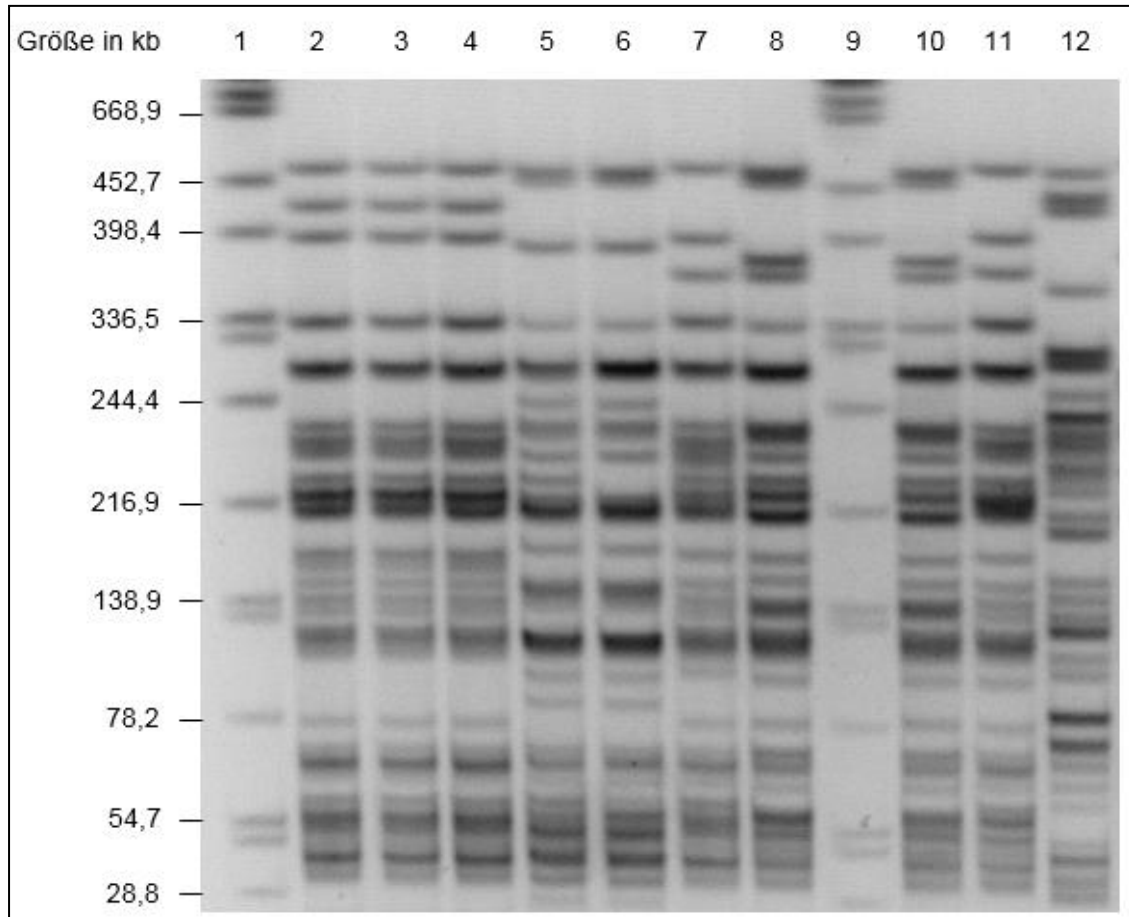


Abbildung 21: Phylogenetische Beziehung der gewonnenen Isolate – Agarosegel der PFGE-Analyse der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate aus Wildschweintonsillen. Gezeigt ist ein 0,8 %iges Agarosegel nach dem Restriktionsverdau der *Y. pseudotuberculosis*-Isolat-DNA mit *NotI* bzw. der *Salmonella Braenderup* H9812-DNA mit *XbaI*. Spuren: 1: DNA-Standardmarker *Salmonella Braenderup* H9812; 2: Isolat M66; 3: Isolat M68; 4: Isolat M69; 5: Isolat M89; 6: Isolat M91; 7: Isolat M102; 8: Isolat M126; 9: DNA-Standardmarker *Salmonella Braenderup* H9812; 10: Isolat M129; 11: Isolat M207; 12: M489.

Für eine feinere Auffächerung der Verwandtschaftsverhältnisse der Isolate wurde das Genom der selbigen mit Hilfe der Einzelnukleotid-Polymorphismus-Analyse und einer Cluster-Analyse untersucht. Für die bioinformatische Betrachtung wurden die Gesamtgenom-Sequenzen der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate (Tab. 43) mit den Bearbeitungsprogrammen des CSI Phylogeny verarbeitet. Bei der Cluster-Analyse konnten die zehn *Y. pseudotuberculosis*-Isolate in vier Cluster unterteilt werden. Cluster A umfasst fünf Isolate, die alle zum Serotyp O:1a und MLST-Typ 42 gehören (Abb. 22). In diesem Cluster befinden sich zwei Biotyp-Gruppen (Biotyp 1 und 2), die im Vorfeld unterschiedliche PFGE-Restriktionsmuster aufwiesen. Mit der Einzelnukleotid-Polymorphismus-Analyse konnte jedoch keine signifikant höhere Anzahl von Einzelnukleotid-Veränderungen (SNPs) gefunden werden (Abb. 23). Cluster B und D enthalten Isolate desselben Biotyps (Biotyp 2), die jedoch unterschiedlich bezüglich ihres Serotyps und MLST-Typs sind. Während in Cluster B ausschließlich Isolate des Serotyps O:1a und des MLST-Typs 9 sind, gehören zu dem Cluster D lediglich O:1b-Isolate des MLST-Typs 42. Die Einzelnukleotid-Polymorphismus-Analyse zeigte ebenfalls nur eine geringe Anzahl von Einzelnukleotid-Veränderungen (30-32) zwischen den Isolaten innerhalb jedes Clusters und eine höhere Anzahl von SNPs (688-692) zwischen den Isolaten der unterschiedlichen Cluster. Ein Isolat (M489) unterschied sich von allen anderen in seinem Serotyp (O: 4) und MLST-Typ (23). Dieses Isolat weist mehr als 5000 Einzelnukleotid-Veränderungen in Bezug zu den restlichen Isolaten auf und ist am entferntesten mit den anderen Isolaten verwandt. M489 ist daher der einzige Vertreter des separaten Clusters C.

Tabelle 43: Accession-Numbers der Gesamtgenom-Sequenzen der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate

Isolat-Bezeichnung	Accession-Number
M66	MNKQ00000000
M68	MNKR00000000
M69	MAKS00000000
M89	NCLA00000000
M91	MAKT00000000
M102	MNKT00000000
M126	MAKU00000000
M129	MAKV00000000
M207	NCKY00000000
M489	NCLF00000000

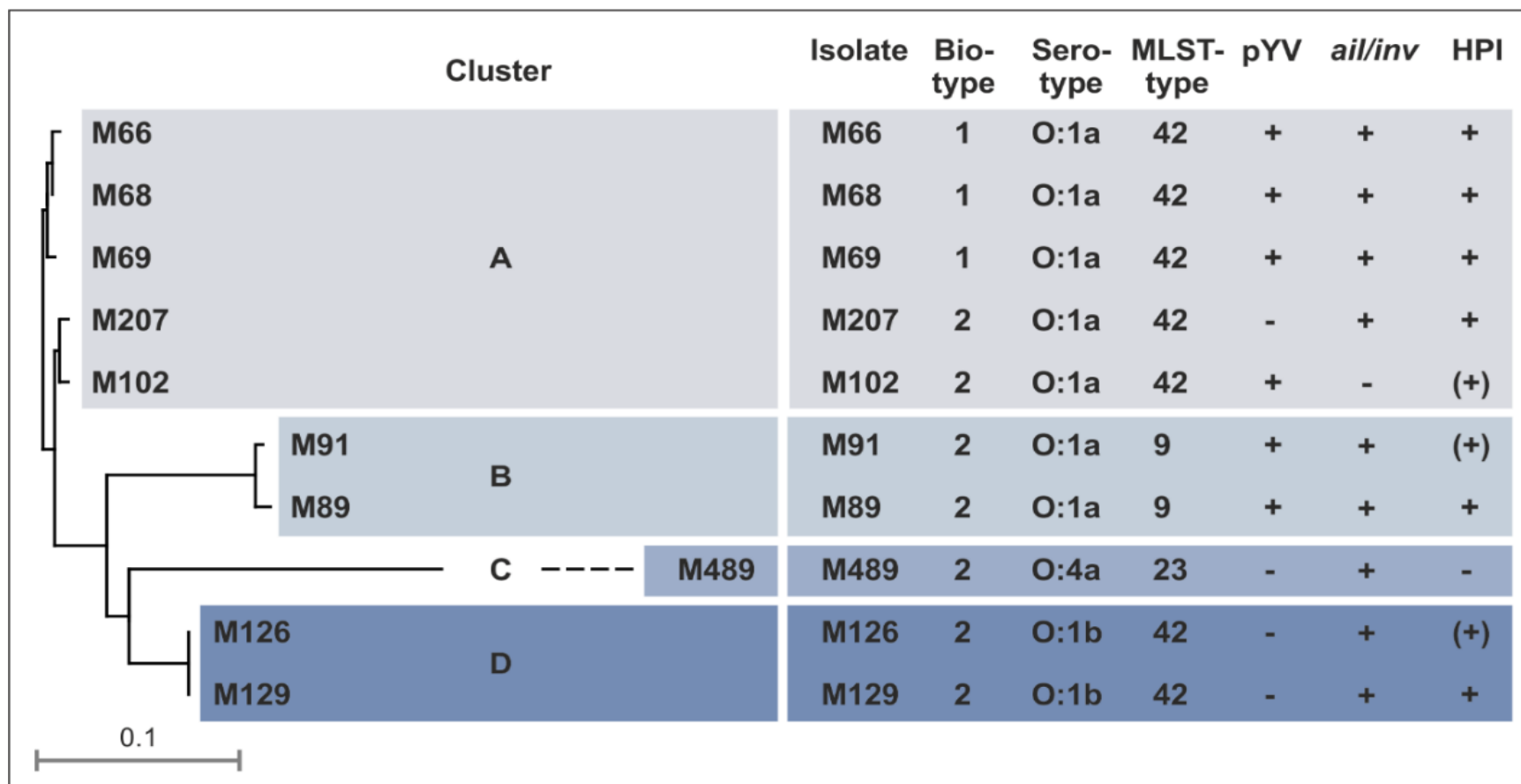


Abbildung 22: Phylogenetische Beziehung der gewonnenen Isolate - Cluster-Analyse der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate auf Basis von Gesamtgenom-Daten. Gezeigt ist die Einteilung der zehn Isolate in fünf Cluster und die dazugehörigen Virulenzfaktoren.

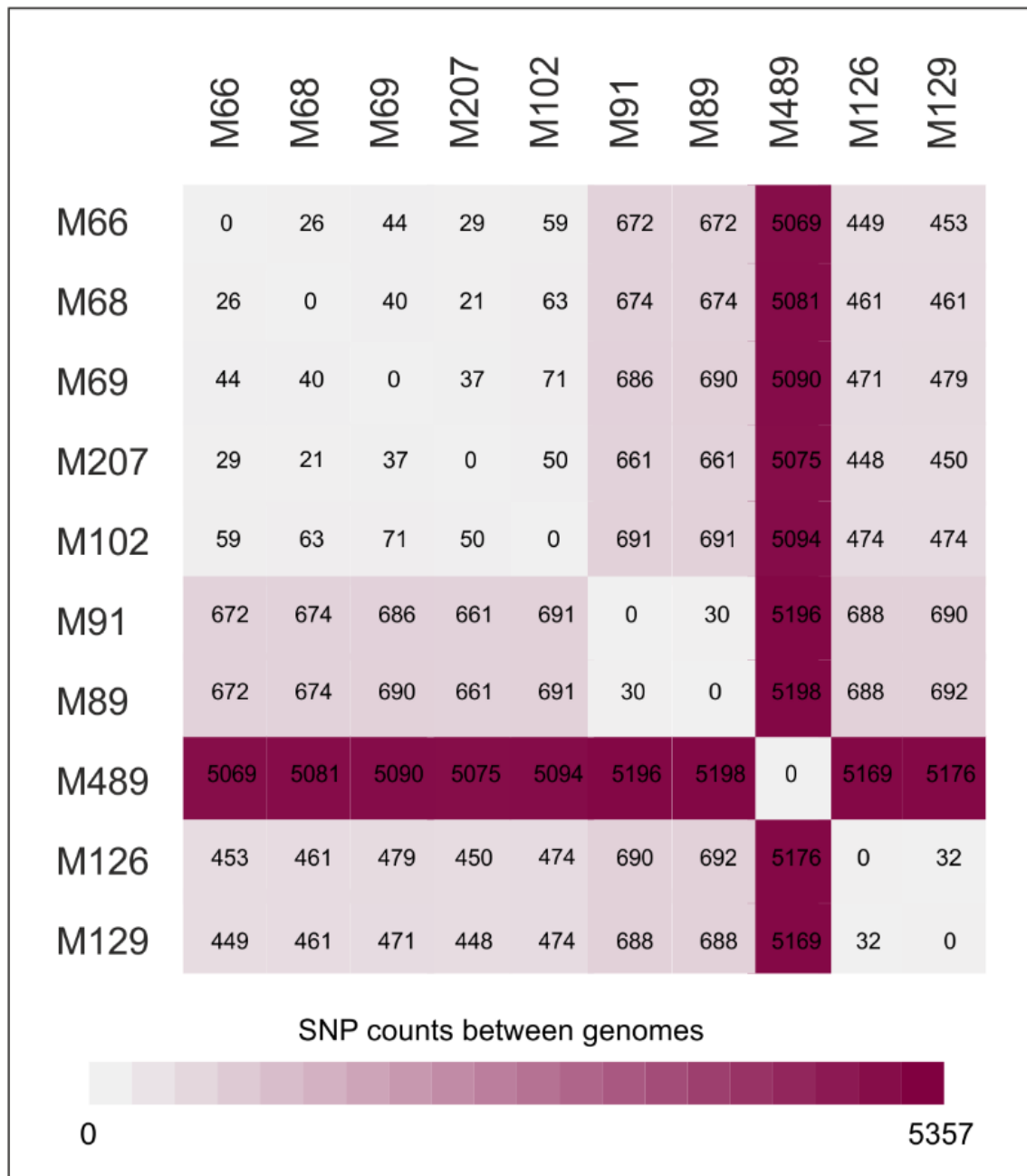


Abbildung 23: Phylogenetische Beziehung der gewonnenen Isolate – Einzelnukleotid-Polymorphismus-Analyse der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate auf Basis der Gesamtgenom-Daten. Gezeigt ist die Zahl der Einzelnukleotid-Abweichungen (SNPs) zwischen den jeweiligen Isolaten.

6 Diskussion

Die Yersiniose, die Infektion des Menschen mit enteropathogenen Yersinien, ist die dritthäufigste Ursache lebensmittelbedingter bakterieller Magen-Darm-Erkrankungen europaweit und wird neben *Yersinia enterocolitica* auch durch *Yersinia pseudotuberculosis* verursacht (Frederiksson-Ahomaa und Wacheck, 2011). Die DIN/ISO-Methode 10273 zum Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln und Tiernahrung enthält keine spezielle Methodik zum Nachweis von *Y. pseudotuberculosis*, wird jedoch auch zur Isolierung dieser Spezies verwendet. Folglich besteht für den kulturellen Nachweis von *Y. pseudotuberculosis* derzeit keine validierte Nachweismethode. In dieser Arbeit sollte daher die Methodik zur Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* untersucht und optimiert werden. In Anbetracht der geringen Informationen möglicher Reservoirs von *Y. pseudotuberculosis* und dem steigenden Interesse an Lebensmitteln aus unkonventioneller Produktion (z. B. Wildfleisch) sollte mit dem neu entwickelten Protokoll eine Prävalenz-Studie zum Vorkommen von *Y. pseudotuberculosis* in Wildschwein-Tonsillen durchgeführt werden. Anschließend sollten die gewonnenen Isolate umfassend charakterisiert und hinsichtlich ihres pathogenen Potenzials untersucht und bewertet werden.

6.1 Entwicklung eines Verfahrens zur Isolierung von *Yersinia pseudotuberculosis* aus tierischem Probenmaterial

Generell ist bei Umweltproben zu beachten, dass Laborsysteme nicht in der Lage sind, ein exaktes Abbild der *in situ* herrschenden Vorgänge darzustellen. Die Isolierung von Mikroorganismen mit künstlich hergestellten Medien führt immer zu einer Selektion und Verschiebung in der Abundanz bestimmter Arten (Ward *et al.*, 1990). Die Isolierung von enteropathogenen Yersinien ist bis heute mit einem hohen zeitlichen Aufwand verbunden und aufgrund der hohen Begleitflora schwierig, sowie auf Verwendung selektiver Nähragarmedien angewiesen (Frederiksson-Ahomaa und Wacheck, 2011). Für den Nachweis von Yersinien werden unter anderem ihre Psychrophilie und Alkalitoleranz als

selektive Faktoren genutzt. Während die Kaliumhydroxid (KOH)-Behandlung (20 s ± 5 s) (0,5 %) nach vorheriger Bebrütung bei ca. 25 C° in der DIN EN ISO 10273:2017 obligatorisch für den Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* ist, gilt die Anreicherung bei Kälte in Verbindung mit einer KOH-Behandlung als fakultatives Verfahren. Obwohl in früheren Arbeiten bereits von einer erhöhten Sensitivität von *Y. pseudotuberculosis* gegenüber einer KOH-Behandlung berichtet wurde (Aulisio *et al.*, 1980; Fukushima, 1985, 1992), wurde in späteren Prävalenzstudien häufig eine Kälteanreicherung mit anschließender KOH-Behandlung angewendet (Laukkanen *et al.*, 2008; Joutsen *et al.*, 2017; Martinez *et al.*, 2009; Rouffaer *et al.*, 2017). Möglicherweise kann dies begründet werden durch den breit gefächerten Untersuchungsbereich dieser Studien, denn häufig sollte nicht nur der Nachweis für eine *Yersinia* Spezies erbracht werden. Nichtsdestotrotz lag der Untersuchungsschwerpunkt in den meisten Studien zur Alkalitoleranz bei *Y. enterocolitica*. Lediglich die Arbeitsgruppe um Aulisio *et al.* (1980) betrachtete sowohl *Y. enterocolitica* als auch *Y. pseudotuberculosis* hinsichtlich ihrer Verträglichkeit gegenüber einer Laugen-Behandlung. In dieser Arbeit wurde die Sensitivität gegenüber einer KOH-Behandlung von *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen der am häufigsten vorkommenden Serotypen Europas (O:1a, O:1b, O:3, O:4 und O:5) (Niskanen *et al.*, 2002) analysiert. Eine Betrachtung in dieser Form ist in der zugänglichen Literatur noch nicht realisiert worden. Alle Stämme zeigten eine ähnliche und starke Empfindlichkeit gegenüber einer KOH-Behandlung mit einer 0,25 prozentigen Kaliumhydroxidlösung. Bereits nach einer Behandlung für 5 s verringerte sich die Zahl der lebensfähigen Zellen um mehr als 4 Log-Stufen (Abb. 10). Um zu überprüfen, ob eine derart stark ausgeprägte Sensitivität lediglich in einer Reinkultur von *Y. pseudotuberculosis* auftritt, wurden Wildschwein-Tonsillen künstlich kontaminiert und einer KOH-Behandlung unterzogen. Es zeigte sich, dass ohne eine KOH-Behandlung *Y. pseudotuberculosis* aus den Tonsillen leicht nachgewiesen werden konnte. Erfolgte jedoch eine KOH-Behandlung für 5 s, 10 s oder 15 s des kontaminierten Tonsillennaterials, wurde *Y. pseudotuberculosis* nur in einigen Proben detektiert, insbesondere in solchen, die mit einer hohen Anzahl von

Bakterien versetzt waren (Tab. 31). Die Empfindlichkeit gegenüber einer KOH-Behandlung wurde nicht signifikant durch den Biotyp, Serotyp oder Multilocus-Sequenztyp der Stämme beeinflusst. Letztendlich zeigte diese Untersuchung, dass neben der Begleitflora auch das nachzuweisende Bakterium durch die alkalische Behandlung reduziert wurde. Nach der DIN EN ISO 10273:2017 muss die Bakterien-Suspension für $20 \text{ s} \pm 5 \text{ s}$ mit einer KOH-Lösung (0,5%) behandelt werden. Die Ergebnisse dieses Versuches weisen jedoch darauf hin, dass die KOH-Behandlung ein kritischer Vorgang ist bei der Isolierung von *Y. pseudotuberculosis*. Anhand der o. g. Ergebnisse wurde eine KOH-Behandlung für die Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* in der Prävalenzstudie weggelassen.

Aufgrund der schwach ausgeprägten bis fehlenden Alkalitoleranz von *Y. pseudotuberculosis* wurde die Psychrophilie als Selektionsvorteil gegenüber der Begleitflora für die Entwicklung eines Isolierungsverfahrens überprüft. Dabei sollte jedoch eine Kälteanreicherung für mehrere Wochen, wie sie in einigen Arbeiten beschrieben ist (Fukushima, 1992; Laukkanen *et al.*, 2008; Novoslavskij *et al.*, 2010; Niskanen *et al.*, 2002), vermieden werden. Eine kürzlich publizierte Studie mit 49 *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen zeigte, dass die untersuchten Bakterien in den ersten 7 Tagen einer Inkubation in LB-Medium bei 1 °C relativ schnell wuchsen, während sich danach das Wachstum zusehends verlangsamte (Keto-Timonen *et al.*, 2018). Da es sich bei LB-Medium um ein Nährmedium mit geringer selektiver Eigenschaft handelt, wurde in dieser Arbeit das Wachstum von 16 *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen (Serotypen O:1 bis O:6) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (3 Tage, 7 Tage und 14 Tage) und des Anreicherungsmediums (Pepton-Sorbit-Galle-Bouillon (PSB), Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Nährbouillon (ITC) und modifizierte Rappaport-Bouillon (MRB)) untersucht. Ähnlich wie in der Arbeit von Keto-Timonen *et al.* (2018) wurde auch hier nach einer Inkubationsdauer von 7 Tagen der höchste Wachstumsanstieg verzeichnet (Abb. 7). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass PSB-Medium besser für die kalte Anreicherung geeignet als MRB- oder ITC-Medium. Alle drei Nährmedien sind Bestandteil der DIN EN ISO 10273:2017-Methode, doch scheinen ITC und MRB besser für eine

Anreicherung von *Y. enterocolitica* geeignet zu sein, als für *Y. pseudotuberculosis* (Laukkanen *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2009; Niskanen *et al.*, 2002; Fredriksson-Ahomaa und Korkeala, 2003; Wauters *et al.*, 1988). Obwohl *Yersinia spp.* in der Lage ist, sich bei einer Temperatur von 4 °C zu vermehren, geschieht dies in einem gemäßigttem Tempo (Schiemann und Olson, 1984). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Wirkung einer Vorinkubation für wenige Stunden bei Raumtemperatur auf das Wachstum von *Y. pseudotuberculosis* betrachtet. Die Abbildung 9 zeigt, dass eine Vorinkubation in PSB bei Raumtemperatur für 6 h das Wachstum von *Y. pseudotuberculosis* deutlich förderte. Nach 7 Tagen enthielt die vorinkubierte Kultur ungefähr drei Größenordnungen höhere Zellzahlen als die Kultur ohne Vorinkubation. Es ist möglich, dass die Vorinkubation die Fitness der Bakterien erhöhte und dass dieser Schritt für die Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* vorteilhaft sein kann. Für die Prävalenzstudie wurde deshalb eine Vorinkubation bei Raumtemperatur für 6 h in das Protokoll zur Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* aus tierischem Probenmaterial übernommen.

Der von Schiemann (1979) entwickelte Selektivagar CIN ist insbesondere für die Isolierung von *Y. enterocolitica* entwickelt worden, er eignet sich aber ebenfalls für die Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* (Weber *et al.*, 1983). Allerdings können sich die antibiotisch wirkenden Bestandteile des CIN-Agar-Mediums (Cefsulodin, Irgasan und Novobiocin) auch inhibierend auf das Wachstum von *Y. pseudotuberculosis* auswirken (Schiemann, 1979; Renaud *et al.*, 2013; Fukushima und Gomyoda, 1986, Savin *et al.*, 2012). Mit einem Versuch in dieser Arbeit wurde überprüft, ob eine Veränderung der Agar-Zusammensetzung sich vorteilhaft auf das Wachstum von *Y. pseudotuberculosis* auswirkt. Unabhängig davon, auf welche antibiotisch wirkende Substanz im Medium verzichtet wurde, konnte keine drastische Erhöhung der koloniebildenden Einheiten von *Y. pseudotuberculosis* festgestellt werden. Aus diesem Grund und in Anbetracht der ausgeprägten Selektionseigenschaft gegenüber der Begleitflora (Head *et al.*, 1982) wurde eine Modifikation des bestehenden CIN-Mediums für die Prävalenzstudie nicht vorgenommen. Erwähnt werden sollte trotzdem, dass eine Diskriminierung von

Y. pseudotuberculosis anhand der Kolonie-Morphologie für das ungeübte Auge nicht leicht möglich ist, da auch andere Mannitol fermentierende Bakterien wie *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas* spp. und *Citrobacter* spp. rote „bull’s eye“-Kolonien bilden (Head *et al.*, 1982; Renaud *et al.*, 2013). Ein erster Schritt zur Verbesserung dieser Problematik ist mit der Entwicklung eines modifizierten CIN-Agars von Tan *et al.* (2014) vollzogen worden.

Für einen zuverlässigen Nachweis von *Y. pseudotuberculosis* ist die Isolierung der Stämme von wesentlicher Bedeutung. Der Nachweis genetischer Merkmale mittels molekularbiologischer Nachweismethoden (z. B. PCR) dient nur zur Ergänzung der kulturellen Methodik für die Bestätigung und die Charakterisierung der Bakterien (Food Safety Authority, 2007). Auch in dieser Arbeit wurde das Verfahren zur Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* aus tierischem Probenmaterial mit Hilfe mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden erstellt. Die *wzz*-PCR nach Bogdanovich *et al.* (2003) diente in diesem kombinierten Verfahren als erster molekularbiologischer Prüfschritt, der Auskunft über An- oder Abwesenheit von *Y. pseudotuberculosis* geben sollte. In Hinblick auf die Prävalenzstudie mit einem erhöhten Probenaufkommen diente dieser Schritt der Selektion von weiter zu bearbeitenden Proben. Hinsichtlich einer sorgfältigen und zeitnahen Bearbeitung jeder einzelnen Probe erwies sich dieser Schritt als besonders vorteilhaft. Das *wzz*-Gen kodiert für das Wzz-Protein, welches die O-Antigen-Kettenlänge im Lipopolysaccharid determiniert und bis heute lediglich in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* nachgewiesen wurde. Ergänzende Untersuchungen in dieser Arbeiten zeigten, dass die Sensitivität der *wzz*-PCR-Methode mit 65,5 fg wesentlich höher war als die Sensitivität in der Publikation von Bogdanovich *et al.* (2003) (250 fg).

Im Überblick kann gesagt werden, dass die Entwicklung eines kombinierten Verfahrens zur Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* aus tierischem Probenmaterial erfolgte. Dabei wurden bestehende Nachweisschritte speziell auf die Ansprüche von *Y. pseudotuberculosis* untersucht und optimiert. Die kritisch zu bewertende KOH-Behandlung wurde aus dem Protokoll entfernt und

stattdessen die Fähigkeit von *Y. pseudotuberculosis*, bei Kälte zu wachsen, mit Einführung einer Vorinkubation unterstützt. Insgesamt wurden zehn Tage von der Probenentnahme bis zur Isolierung und Spezies-Identifikation benötigt. Dies stellt eine moderate Verbesserung hinsichtlich des Zeitbedarfs dar. Bei der Erstellung des Nachweisverfahrens sollte durch Kombination von kulturellen und molekularbiologischen Methoden eine sorgfältige, exakte und zeitgünstige Analyse von Proben ermöglicht werden, mit besonderem Augenmerk auf die folgende Prävalenzstudie.

6.2 Prävalenzuntersuchung von *Yersinia pseudotuberculosis* aus Schwarzwild im Nordosten Deutschlands

Mit Hilfe des neu entwickelten Isolationsprotokolls wurde eine Prävalenz-Studie zum Vorkommen von *Y. pseudotuberculosis* in Wildschwein-Tonsillen durchgeführt. Die Auswahl des Probenmaterials wurde vor allem im Hinblick auf das steigende Interesse an Lebensmitteln aus unkonventioneller Produktion (z. B. Wildfleisch, Freilandhaltung von Hausschweinen) getätigt. Wildfleisch wird nicht selten als Feinkost angesehen und gewann in den letzten Jahren zunehmend an Verbraucherinteresse. Der Zeitgeist der heutigen Gesellschaft, sich gesund und körperbewusst zu ernähren, aber auch das Misstrauen in die Fleischqualität aus konventioneller Herkunft aufgrund zahlreicher, sogenannter Fleischskandale bestärkt diesen Trend (Wacheck, 2008). Der Pro-Kopf-Verbrauch von Wilderzeugnissen betrug in der Bundesrepublik Deutschland 1,4 Kilogramm für das Jahr 2016 (BVDF, 2018, Statistisches Bundesamt, 2017). Bei der Ermittlung des tatsächlichen bundesweiten Verbrauchs von Wildbret ist zu beachten, dass ein hoher Anteil des Wildbrets direkt vom Jäger an den Verbraucher abgegeben wird, und dabei nicht statistisch erfasst wird (Maahs, 2010). Laut Apelt (2007) wird das aus der einheimischen Jagd gewonnene Wildbret nur zu etwa 1/3 über den Handel vermarktet, 2/3 des Wildbrets verbleiben in den Haushalten der Jagdausübungsberechtigten oder werden direkt an den Endverbraucher einschließlich Gaststätten abgegeben. Ein beträchtlicher Anteil (47 %, 13.900 Tonnen) des Gesamtwildbretaufkommens

stammt dabei vom Schwarzwild (Deutscher Jagdverband, 2018). Eine besondere Bedeutung kommt dem Jäger zu. Denn durch die Arbeit des Jägers (vom „Ansprechen“ bis zum „Versorgen“ des Wildes) wird die Lebensmittelsicherheit maßgeblich bestimmt. Das EU-Lebensmittelrecht, welches für die Erzeugung und Vermarktung aller Lebensmittel gilt, umfasst alle Stufen der Lebensmittelherstellung, nach dem Prinzip „from stable to table, from farm to fork“. Da das sogenannte „EU-Lebensmittelhygienepaket“ alle Lebensmittel umfasst, gilt es auch für Wildfleisch und somit für den Jäger (Apelt, 2007). Damit wird die Verantwortung für die Sicherheit der hergestellten Futter- und Lebensmittel auf allen Stufen der Produktion auf den „Lebensmittelunternehmer“, also den Jäger übertragen (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2006). Gegenwärtige Studien zu Krankheitserregern im Wild befassen sich mit dem Vorhandensein der häufig auftretenden Zoonoseerreger *Trichinella*, *Salmonella*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, dem Hepatitis E Virus und *Toxoplasma Gondii* (Widén *et al.*, 2017; Sannö *et al.*, 2014; Wallander *et al.*, 2015; Pozio *et al.*, 2004; Sannö *et al.*, 2018; Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2009). Es zeigte sich, dass insbesondere Wildschweine eine hohe Anzahl von Zoonoseerregern beherbergen und übertragen können (Ruiz-Fons, 2017). Für die vorliegende Arbeit wurden Tonsillen von 503 Wildschweinen auf Anwesenheit von *Y. pseudotuberculosis* untersucht. Dabei ist es gelungen, Proben aus Regionen mit besonders hoher Schwarzwilddichte zu akquirieren. Die Entnahme erfolgte dabei durch eine einzige Person. Damit war eine Probengewinnung sozusagen aus erster Hand gewährleistet und eine unsachgemäße Probenbehandlung ausgeschlossen. Um die Gefahr einer Kreuzkontamination zu verringern, wurde für jede Probe ein steriles Skalpell, ein neues Paar Handschuhe und ein steriler Plastikbecher verwendet. Die Entnahme selbst erfolgte nach etwas Übung bereits nach wenigen Sekunden. Es empfahl sich, diesen Aufwand selbst zu betreiben, da eine Integration dieser Aufgaben in einen laufenden Forstbetrieb bzw. Jagdbetrieb, insbesondere an Gemeinschaftsjagd-Tagen, nur eine zusätzliche Belastung für die Projektpartner bedeutet hätte und sich dies wiederum auf die Arbeitsqualität der Probenentnahme hätte auswirken können. Durch persönliche Absprachen war

es möglich, bei einer Vielzahl der erlegten Wildschweine den Kehlbereich solange verschlossen zu lassen, bis eine Probenentnahme erfolgte. Dies war jedoch nur realisierbar, weil es sich bei Wildschweinen um keine wiederkauende Wildart handelt und die Wildbrethygiene trotz des benannten Schrittes eingehalten werden konnte. Mit Hilfe des erstellten Isolierungsverfahrens konnte in 32 Proben (6,4 %) *Y. pseudotuberculosis* durch PCR nachgewiesen werden. In 10 Proben (2 %) gelang der kulturelle Nachweis und die Isolierung von insgesamt 10 *Y. pseudotuberculosis*-Isolaten. Eine Prävalenz von 2 %, die kulturell bestimmt wurde, ist in guter Übereinstimmung mit Daten aus einer Untersuchung von Wildschweinen aus der Schweiz (3 %) (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu wurde durch PCR in der genannten Studie in 20 % der Proben sowie in einer aktuellen Arbeit von Sannö *et al.* (2018) in 14,7 % der Proben und in einer Untersuchung von Wildschweinen aus Nordspanien (Arrausi-Subiza *et al.*, 2016) in 25 % der Proben *Y. pseudotuberculosis* nachgewiesen. Die Diskrepanz zwischen den erwähnten Studien und der hier vorgestellten Arbeit könnte durch die sich unterscheidenden Nachweis-Protokolle, die für die Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* verwendet wurden, verursacht worden sein. Andere Faktoren, wie z. B. eine andere PCR-Methodik, sind ebenfalls möglich. Beachtet werden sollte auch, dass in den anderen Untersuchungen eine Probenakquise oft durch Dritte oder vom Erleger selbst vorgenommen wurde. Damit ist ohne einen anschließenden kulturellen Nachweis (Isolat-Identifizierung) eine Kreuzkontamination nicht auszuschließen. In der Studie von Sannö *et al.* (2018) wird die Problematik einer Probennahme durch mehrere Personen, die unterschiedlich versiert sind, deutlich, anhand von fehlenden Proben bis hin zu falsch entnommenem Probenmaterial und irreführender Probenbezeichnung. Des Weiteren ist die Differenz der Prävalenzwerte zwischen der kulturellen Nachweismethodik und der PCR-Methodik dem Umstand geschuldet, dass durch PCR eine Unterscheidung von lebendigen und toten Zellen nicht getätigt werden kann. Somit werden auch jene Proben positiv getestet, welche keine lebensfähigen *Y. pseudotuberculosis* enthalten. Dagegen ist ein kultureller Nachweis nur

möglich, wenn lebendige Bakterienzellen in kultivierbarer Form vorliegen. In der Dissertation von Rohde (2016) wurde die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) als eine vielversprechende Alternative zu anderen molekularen Detektionsmethoden, welche eine Lebend/Tot-Differenzierung ermöglichen, dargestellt. Eine Alternative für den kulturellen Nachweis könnte die „Magnetic Beads-Methode“ sein. Dabei werden magnetische Kügelchen mit Liganden (z. B. Antikörpern) beschichtet und einer Bakterienkultur zugeführt. Die Selektion des Zielbakteriums erfolgt dabei über die Spezifität des Liganden (Fu *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2018). Jedoch ist diese vielversprechende Methode aufgrund der Diversität von *Y. pseudotuberculosis* noch nicht anwendbar.

In dieser Arbeit wurden sieben Isolate von männlichen Wildschweinen gewonnen. Sechs Isolate stammten von Frischlingen, also Tieren, die jünger als 1 Jahr waren (Tabelle 32, 33). Es ist bekannt, dass mit zunehmendem Alter der Wildschweine die Prävalenz von Anti-*Yersinia* Antikörper zunimmt und mit dem Erwerb einer Immunität assoziiert ist, so dass in älteren Wildschweinen seltener *Y. pseudotuberculosis* aus einer akuten Infektion nachgewiesen werden kann. Bei jungen Stücken hingegen ist die Prävalenz von Anti-*Yersinia* Antikörpern geringer und eine Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* wahrscheinlicher (Al Dahouk *et al.*, 2005). In der Arbeit von Arrausi-Subiza *et al.* (2016) wurde festgestellt, dass eine hohe Prävalenz von Anti-*Yersinia* Antikörpern besonders in den Zeiträumen mit kalten Temperaturen und häufigen Niederschlägen zu verzeichnen ist. Interessanterweise wurden in dieser Arbeit tatsächlich neun der zehn *Y. pseudotuberculosis*-Isolate in den Wintermonaten (Dezember, Januar) gewonnen, obwohl die Probenahmen über die verschiedenen Jahreszeiten hinaus getätigt wurden. Die Zusammensetzung der untersuchten Tiere entsprach der Streckenzusammensetzung des Landkreises Uckermark und des Landes Brandenburg für das Jagdjahr 2016/ 2017. In Anbetracht der Jahresjagdstrecke (Uckermark) für das Schwarzwild im Jagdjahr 2016/ 2017 mit 9.794 erlegten Stücken wird deutlich, dass die Probenmenge von 503 Wildschweinen nur einen begrenzten Anteil der Gesamtstrecke entsprach (Jagdbericht des Landes Brandenburg 2016/ 2017). Nichtsdestotrotz ist die Probenzahl in vergleichbaren Studien häufig geringer; eine große Anzahl von

Proben ist meist in Studien zu finden, die lediglich über einen molekularbiologischen Nachweis, ohne kulturelle Bestätigung, Auskunft geben (Sannö *et al.*, 2018; Arrausi-Subiza *et al.*, 2016; Sannö *et al.*, 2013; Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2009). Laut BIOHAZ-Gremium kann ein zuverlässiger Nachweis von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* nicht alleinig durch molekularbiologische Methoden (z. B. PCR) erbracht werden. Eine Isolierung der Bakterien ist wesentlich für die Bestätigung und die Charakterisierung. Daher sollten beispielsweise positive PCR-Ergebnisse immer durch Kulturmethoden untermauert werden (European Food Safety Authority, 2007). Betrachtet man die Isolierungsraten von *Y. pseudotuberculosis* bei verschiedenen Tierarten (Tab. 1), so wird erkennbar, dass beispielsweise Hunde (6,3 %) (Fukushima *et al.*, 1985), Mäuse (8,4 %) (Zheng *et al.*, 1995) und Rinder (7 %) (Slee *et al.*, 1988) durch ihre oft unmittelbare Nähe zum Menschen eine wichtige Rolle bei der Übertragung von *Y. pseudotuberculosis* einnehmen können. Dabei ist anzumerken, dass in den oben genannten Studien *Y. pseudotuberculosis* nicht wie in dieser Arbeit aus Tonsillen isoliert wurde, sondern aus Kot-, Milz-, Lymphknoten-, Blinddarm- und Ileum-Material. Obwohl in Studien bereits nachgewiesen wurde, dass insbesondere Wildschweine eine hohe Anzahl von Zoonoseerregern beherbergen können (Ruiz-Fons, 2017; Widén *et al.*, 2017; Sannö *et al.*, 2014; Wallander *et al.*, 2015; Pozio *et al.*, 2004; Sannö *et al.*, 2018; Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2009), sind die Risikofaktoren bezüglich einer Übertragung von *Y. pseudotuberculosis* durch Wildschweine auf den Menschen bis heute noch nicht vollständig geklärt (Sannö *et al.*, 2018). In Anbetracht der stetig ansteigenden Schwarzwild-Populationen (Deutscher Jagdverband, 2018) und der häufig überlappenden Lebensräume von Mensch und Tier bedarf diese Fragestellung weiterer Untersuchungen. Die Möglichkeit besteht, dass *Y. pseudotuberculosis*-positive Wildschweine Kontakt zu landwirtschaftlichen Flächen und ihren Bewässerungsquellen erlangen. Die Kontamination der Erzeugnisse, wie z. B. Salate und Karotten kann somit direkt über den Kontakt mit Wildtieren bzw. deren Ausscheidungen erfolgen oder über mit Kot kontaminiertes Wasser geschehen (Nuorti *et al.*, 2004). Jedoch ist eine Übertragung von

Y. pseudotuberculosis auf den Verbraucher in diesem Szenario lediglich in Ausnahmefällen denkbar, da zwischen Ernte und Verzehr mindestens ein Waschschrift der landwirtschaftlichen Erzeugnisse liegt und eine aktive Abwehr des Schwarzwildes auf diesen Flächen zusätzlich betrieben wird. Ebenfalls ist über Yersiniosen, die durch den Verzehr von kontaminiertem Wildschweinfleisch oder durch Kontakt mit Wildschweinen verursacht wurden, bisher nichts bekannt. Der Verzehr von rohen Wildfleischprodukten, wie etwa beim Hausschwein (Hack), ist weniger üblich. Meistens wird Wildfleisch in durcherhitztem Zustand verzehrt, dies minimiert die Wahrscheinlichkeit einer Infektion um ein weiteres. Hingegen ist die Übertragung von *Y. pseudotuberculosis* von Wildschweinen auf Hausschweine (Freilandhaltung) und letztendlich auf den Verbraucher ein denkbareres Risiko, da Hausschweine im Vergleich zu Wildschweinen eher in größeren Gruppen auf begrenztem Areal leben, und eine massenhafte Übertragung im gesamten Bestand begünstigt würde. Das lässt den Schluss zu, dass das Wildschwein in dieser Hinsicht eher als Transmitter fungiert, als das es ein Reservoir für *Y. pseudotuberculosis* darstellt. Ein weiterer wichtiger Punkt, um Aussagen über das Risikopotenzial treffen zu können, ist die genaue Charakterisierung der gefundenen *Y. pseudotuberculosis*-Stämme und die Klärung ihres pathogenen Potenzials. Aus diesem Grund folgte im Anschluß dieser Prävalenzstudie die eingehende Beschreibung der gewonnenen *Y. pseudotuberculosis*-Isolate.

6.3 Charakterisierung der gewonnenen *Yersinia pseudotuberculosis* - Isolate

Nach der Gewinnung und Identifizierung der *Y. pseudotuberculosis*-Isolate aus den Wildschweintonsillen folgte die Charakterisierung derselbigen. Dazu gehörte die Feststellung der Kolonie- und Zellmorphologie, die Bestimmung des Sero- und Biotyps sowie des MLST-Typs und die Ermittlung von möglichen Antibiotika-Resistenzen und Pathogenitätsfaktoren.

Hinsichtlich der Koloniemorphologie verhielten sich alle Isolate insofern gleich, dass sie auf CIN-Agar die für Yersinien typischen „bull’s eye“-Kolonien bildeten. Eine Besonderheit zeigte sich bei vier Isolaten. Hier wurden bei ein und demselben Isolat zwei Kolonieförmigkeiten beobachtet. Die Isolate hatten sowohl kleine runde Kolonien mit glattem Rand und fester Konsistenz, als auch große Kolonien mit unregelmäßigem Rand und weicher Konsistenz (Abb. 16B). Es zeigte sich, dass die kleinen Kolonien das Plasmid pYV enthielten, während die größeren Kolonien plasmidlos waren und kein *virF*-PCR-Produkt (700 bp) nachgewiesen werden konnte (Abb. 17). Diese Beobachtung ist bislang in der Literatur für *Y. pseudotuberculosis* noch nicht beschrieben worden. Möglicherweise ist das beschleunigte Wachstum damit zu erklären, dass bei Entfallen der genetischen Last eines Plasmides vorhandene Ressourcen nun anderweitig genutzt werden können und z. B. durch ein schnelleres Wachstum erkennbar werden.

Durch die molekularbiologische Serotypisierung mittels der PCR von Bogdanovich *et al.* (2003) konnten sieben Isolate dem Serotyp O:1a, zwei Isolate dem Serotyp O:1b und ein Isolat dem Serotyp O:4a zugeordnet werden (Tab. 38). Alle drei Serotypen gehören zu den bedeutenden humanpathogenen Serotypen, wohingegen O:1c, O:2a, O:6 – O:15 noch nie aus Patienten isoliert, sondern nur in terrestrischen und aquatischen Ökosystemen und in kleinen Säugetieren gefunden wurden (Klimov und Chesnokova, 2007; Ch’ng *et al.*, 2011). Die Serotypen O:1a und O:1b sind die am häufigsten in Europa, Australasien und Nordamerika vorkommenden Typen (Carniel *et al.*, 2006). Serotyp O:1 konnte bereits im Zusammenhang gebracht werden mit Infektionen von Wildschweinen, Hausschweinen und Menschen (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2011; Rimhanen-Finne *et al.*, 2009). In Deutschland wurden bis jetzt Humaninfektionen durch *Y. pseudotuberculosis* hauptsächlich durch das Serovar O:1, aber auch durch die Serovare O:2 und O:3 hervorgerufen (Aleksic und Bockemühl, 1990; Aleksic *et al.*, 1995; Aleksic *et al.*, 1991; Weber, 1988; Weidenmüller, 1968). Der Serotyp O:4a ist weniger typisch für den europäischen Raum und wurde nur in Ausnahmefällen in Deutschland nachgewiesen (Aleksic *et al.*, 1995). Vielmehr ist er mit dem Serotypen O:4b

dominierend im Fernen Osten vertreten (Bogdanovich *et al.*, 2003; Fukushima *et al.*, 2001). Weiterhin konnten die Isolate den Biotypen 2 (n 7) und 1 (n 3) zugeordnet werden (Tab. 37). Eine Verbindung zwischen Biotyp und Serotyp konnte nicht erkannt werden. Ähnlich verhielt es sich bei der Zuordnung des Multi-Lokus-Sequenz-Typs. Sieben Isolate konnten dem Sequenztyp 42, zwei Isolate dem Sequenztyp 9 und ein Isolat dem Sequenztyp 23 zugeordnet werden. Auch hier konnte kein zwingender Zusammenhang von Biotyp, Serotyp und Multi-Lokus-Sequenz-Typs beobachtet werden. Beschreibende Arbeiten diesbezüglich konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

Trotz der nicht selten vorkommenden Humaninfektionen durch *Y. pseudotuberculosis* gibt es derzeit nur wenige umfassende Studien über die Antibiotika-Empfindlichkeit von *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen. Ähnlich wie in dieser Arbeit werden die antimikrobiellen Eigenschaften eher im Zusammenhang mit Prävalenzstudien untersucht (Bonardi *et al.*, 2016; Terentjeva und Bērziņš, 2010), als dass *in-vitro*-Studien zur Antibiotika-Empfindlichkeit durchgeführt werden (Stock und Wiedemann, 1999; Kanazawa und Kuramata, 1976; Merka und Splino, 1972; Ryzhko *et al.*, 1976). Dies könnte zum einen daran liegen, dass aufgrund des sporadischen Auftretens der Humaninfektionen in der Regel nur wenige Erreger für derartige Studien zur Verfügung stehen und zum anderen, dass die Erreger unter Umständen ohne einen entsprechenden Verdacht aus Infektionsherden nicht isoliert werden (Stock und Wiedemann). Die Untersuchung der Antibiotika-Resistenzen in dieser Arbeit ergab, dass die Isolate den meisten antimikrobiellen Substanzen gegenüber empfindlich waren (Tab. 39), was übereinstimmend ist mit Ergebnissen aus der vorhandenen Literatur (Stock und Wiedemann, 1999). Ein Isolat (M129) zeigte eine weniger ausgeprägte Empfindlichkeit gegenüber Azithromycin (16 µg/ ml) als die anderen Isolate (4-8 µg/ ml). Die Hemmkonzentration aller Isolate lag in einem Bereich von 4-16 µg/ ml und ist damit vergleichbar mit dem ermittelten Bereich von Stock und Wiedemann (1999). Eine Besonderheit konnte bei dem Isolat M489 festgestellt werden. Während alle Isolate eine gute Verträglichkeit und Wachstum in der Gegenwart einer hohen Colistin-Konzentration (> 16 µg/ ml) zeigten, wurde das Wachstum

von M489 bereits bei einer geringen Colistin-Konzentration von $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ eingeschränkt. In den Arbeiten von Lai *et al.* (2014) sowie Oberhofer und Podgore (1980) konnte ebenfalls eine wenig stark ausgeprägte Sensitivität gegenüber Colistin bei den untersuchten *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen festgestellt werden. Stock und Wiedemann (1999) sehen es als wahrscheinlich an, dass neben der äußeren Membran bei *Y. pseudotuberculosis* keine weiteren natürlichen Abwehrmechanismen gegenüber Antibiotika vorhanden sind und Mechanismen sekundärer Resistenz eher eine untergeordnete Rolle einnehmen. Trotzdem liegt die Vermutung nahe, dass die Unempfindlichkeit gegenüber Colistin im Zusammenhang steht mit möglichen Mutationen der Gene, welche für die Zusammensetzung von Lipopolysacchariden verantwortlich sind (z. B. *mcr-1*). Da Colistin hauptsächlich verwendet wird, um Infektionen zu behandeln, die durch Carbapenem-resistente oder Extended-Spectrum-Betalaktamase (ESBL)-produzierende *Enterobacteriaceae* verursacht werden (Büchler *et al.*, 2018), spielt es für *Y. pseudotuberculosis* nur eine unwesentliche Rolle.

Die Analyse der Virulenzfaktoren der zehn *Y. pseudotuberculosis*-Isolate zeigte, dass sie sich hinsichtlich ihres potentiellen pathogenen Potentials zum Teil erheblich voneinander unterscheiden. Für die Ermittlung der Virulenz wurden verschiedene Methoden wie der MOX-Test, PCR und die Gesamt-Genom-Sequenzierung angewandt. Dabei konnten keine Widersprüche festgestellt werden, was die Richtigkeit der Ergebnisse unterstützt. Eine Übersicht zu den Virulenz-Eigenschaften der untersuchten Isolate ist in Tabelle 41 aufgeführt. *Y. pseudotuberculosis* ist eines der wenigen gramnegativen Bakterien, die ein superantigenes Toxin (YPM) produzieren, dessen Rolle für die Pathogenese bereits diskutiert wurde (Carnoy *et al.*, 2000; Fukushima *et al.*, 2001; Uchiyama *et al.*, 1993). Keines der Isolate besaß Gene, welche für YPM codieren. Die Bildung dieses Toxins wurde vor allem in Stämmen aus Fernost nachgewiesen (Fukushima *et al.*, 2001). Ähnlich wie bei YPM ist die Hochpathogenitätsinsel (HPI) eng mit Symptomen einer von *Y. pseudotuberculosis* hervorgerufenen Yersiniose assoziiert. HPI sind große zusammenhängende Sequenzen der chromosomalen DNA, die für eine Vielzahl von Virulenzfaktoren kodieren

(Hacker *et al.*, 1997). In der Gattung *Yersinia* kommen HPI lediglich bei *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und bei hochpathogenen *Y. enterocolitica*-Stämmen des Biotyps 1B vor (Carniel, 2001). Die Gene der HPI kodieren Proteine, die an der Biosynthese, Regulation und dem Transport des Siderophors Yersiniabactin beteiligt sind und steuern somit die essentielle Eisenaufnahme (Gehring *et al.*, 1998; Rakin *et al.*, 1999). In sechs Isolaten wurde eine Hochpathogenitätsinsel (HPI) nachgewiesen, während ein Isolat (M489) kein HPI-assoziiertes Gen besaß. Dieses Isolat gehörte zum Serotyp O:4a, für welchen diese Eigenschaft bereits in einer anderen Studie beschrieben wurde (Schubert *et al.*, 2004). Drei Isolate (M91, M102 und M126) besaßen eine partielle HPI, bei der einige Gene enthalten waren und einige abwesend. Für die Funktionalität der HPI sind insbesondere die vier Gen-Bereiche *psn*, *irp1*, *irp2*, *ybtP-ybtQ* von Bedeutung, denn sie sind Bestandteil des Yersiniabactin-Systems (Gehring *et al.*, 1998). In dem Isolat M91 fehlten die Gene *psn*, *irp1* und *irp2*, während in den Isolaten M102 und M126 nur *psn* bzw. *irp1* fehlten. Die Gene *irp1* und *irp2* kodieren für Proteine, die an der nicht-ribosomalen Synthese von Yersiniabactin beteiligt sind (Carniel *et al.*, 1996). *Irp2* ist ein Marker für hohe Pathogenität und ist bis jetzt nur in pathogenen Stämmen gefunden worden (Carniel *et al.*, 1992; de Almeida *et al.*, 1993). Einige andere Gene der Hochpathogenitätsinsel scheinen verantwortlich für die genetische Mobilität zu sein (Schubert *et al.*, 2004). Eines dieser Gene (*int*) codiert eine Integrase, die der Integrase von Phage P4 ähnlich ist (Buchrieser *et al.*, 1998). In den untersuchten Isolaten dieser Arbeit ist das *int*-Gen in allen außer zwei Isolaten (M102 und M489) detektiert worden. Diese beiden Isolate waren die einzigen, die nicht das Insertionselement IS100 enthielten, das an Umlagerungen des Genoms beteiligt ist (Schubert *et al.*, 2004). Enteropathogene *Yersiniae* tragen die Gene *ail* (Attachment Invasion Locus) und *inv* (Invasin) auf ihren Chromosomen. Während das Membranprotein Invasin die Bindung und das Eindringen in die Wirtszellen begünstigt (Uliczka *et al.*, 2009), scheint das Membranprotein Ail von *Y. pseudotuberculosis* nicht den Anheftungs- und Invasionsprozess zu vermitteln, wie bei *Y. enterocolitica*. Vielmehr scheint es für die Serumresistenz verantwortlich zu sein (Yang *et*

al., 1996; Miller *et al.*, 2001). *Ail* und *inv* wurden in neun Isolaten nachgewiesen, nur einem Isolat (M102) fehlten diese Gene. Bei *Y. pseudotuberculosis* ist die Abwesenheit beider Gene eher ungewöhnlich (Nakajima *et al.*, 1992). Es ist möglich, dass das Isolat M102 die Fähigkeit zum Eindringen in die Epithelschicht verloren hat und daher ein Stamm mit verringerter Virulenz sein könnte (Pepe und Miller, 1993; Tsang *et al.*, 2010; Tsang *et al.*, 2012; Yamashita *et al.*, 2011). Das Virulenzplasmid pYV kodiert für Proteine, die in der äußeren Membran (z. B. YadA) und als sezernierte Exoproteine, den sog. Yops („*Yersinia* outer membrane protein“) vorkommen (Frederiksson-Ahomaa und Wacheck, 2011). Nur vier Isolate besaßen sowohl das Virulenzplasmid pYV als auch wichtige chromosomale Virulenz-Gene (*ail*, *inv*, komplette Hochpathogenitätsinsel (HPI)). Eine Besonderheit stellte das Isolat M489 dar, da es weder Gene der HPI noch von pYV zeigte. Lediglich die chromosomalen Virulenzgene *ail* und *inv* konnten nachgewiesen werden. In der Studie von Fukushima *et al.* (2001) wurde die Verteilung dieser Virulenzfaktoren sowie ihr geografisches Vorkommen analysiert und eine Differenzierung von *Y. pseudotuberculosis* in sechs Pathogenitätsuntergruppen vorgenommen. Alle Isolate dieser Arbeit, mit Ausnahme von M489, stimmen mit dem Pathogenitätstyp „Europäisch-Gastroenteritisch“ (HPI⁺, YPM⁻, pYV⁺) mit den dominierenden Serotypen O:1a und O:1b in westlichen Ländern überein. Zu erwähnen ist, dass die Abwesenheit vom Virulenzplasmid pYV durch einen Verlust während der Kultivierungsschritte im Labor nicht auszuschließen ist, da bereits in vorherigen Arbeiten die Instabilität von pYV erkannt wurde (Bhaduri und Smith, 2011, Hammerl *et al.*, 2012). Somit können auch die Isolate ohne pYV dem Pathogenitätstyp Europäisch-Gastroenteritisch zugeordnet werden. Interessanterweise gelten Stämme ohne pYV als nicht pathogen, obwohl pYV-negative *Y. pseudotuberculosis*-Stämme bereits von Patienten isoliert wurden (Carniel, 2001; Fukushima *et al.*, 1991). Das Isolat M489 (HPI⁻, YPM⁻, pYV⁻) nimmt wie schon bei der Serotypisierung eine besondere Stellung ein. Es ist das einzige Isolat, welches nicht dem Pathogenitätstyp „Europäisch-Gastroenteritisch“ zugeordnet werden konnte, sondern eher Stämmen, die im fernöstlichen Raum auftreten, ähnelt. In der Übersicht von Fukushima *et al.*

(2001) werden Stämme mit den gleichen Virulenzeigenschaften wie M489 als pathogen eingestuft. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass die Gruppierung nach Fukushima *et al.* (2001) keine Verbindlichkeit besitzt und lediglich als vergleichende Information dienen kann. Zusammenfassend lässt sich durch die Analyse des Virulenzgehaltes der zehn Isolate vermuten, dass sie sich hinsichtlich ihres pathogenen Potentials signifikant unterscheiden. Nur vier Isolate besaßen sowohl das Virulenzplasmid pYV als auch wichtige chromosomale Virulenzgene (*ail*, *inv*, komplette HPI). Dennoch kann keines der Isolate als harmlos angesehen werden, da die Virulenz von *Y. pseudotuberculosis* von mehreren genetischen Faktoren bestimmt wird.

Um die phylogenetische Beziehung zwischen den Isolaten zu ermitteln, wurde sowohl eine Puls-Feld-Gel-Elektrophorese (PFGE)-Analyse durchgeführt, als auch Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP = Single Nucleotide Polymorphism) in den Stämmen analysiert. Bei der PFGE-Analyse ergab der Vergleich der zehn Isolate anhand ihrer Bandenmuster fünf verschiedene Restriktionsmustergruppen (Abb. 21). Das PFGE-Muster war in guter Übereinstimmung mit den Daten der Gesamtgenom-Sequenzierung. Bei der Cluster-Analyse konnten die zehn *Y. pseudotuberculosis*-Isolate in vier Cluster unterteilt werden (Abb. 22). Dabei umfasst Cluster A fünf Isolate, die zwei Biotyp-Gruppen (Biotyp 1 und 2) angehören, welche im Vorfeld unterschiedliche PFGE-Restriktionsmuster aufwiesen. Mit der Einzelnukleotid-Polymorphismus-Analyse konnte jedoch keine signifikant höhere Anzahl von Einzelnukleotid-Veränderungen gefunden werden (Abb. 23). Cluster B und D enthielten Isolate desselben Biotyps (Biotyp 2), die sich jedoch hinsichtlich ihres Serotyps und MLST-Typs unterschieden. Die Einzelnukleotid-Polymorphismus-Analyse bestätigte die enge Verwandtschaft der Stämme innerhalb jedes Clusters und die entferntere Beziehung zwischen den Clustern. Interessanterweise wurden die Proben, deren Isolate zu einem Cluster gehören (mit Ausnahme von M102 und M207), häufig am selben Jagd-Tag und demselben Jagd-Ereignis entnommen. Dabei handelte es sich in einigen Fällen um nur kleine Jagdflächen. Die Möglichkeit ist damit gegeben, dass Tiere aus ein und demselben Familienverband, der sogenannten Rotte, erlegt wurden. Die

Weitergabe von *Y. pseudotuberculosis* von Tier zu Tier ist in einer Rotte wahrscheinlich, aufgrund des engen Kontaktes der Tiere untereinander. Wie schon in den vorhergegangenen Untersuchungen unterschied sich das Isolat M489 von allen anderen Isolaten. Dieses Isolat wies mehr als 5.000 Einzelnukleotid-Veränderungen in Bezug zu den restlichen Isolaten auf und war am entferntesten mit den anderen Isolaten verwandt. M489 war daher der einzige Vertreter des separaten Clusters C. Das Jagdrevier, aus dem M489 gewonnen werden konnte, zeichnete sich ebenfalls durch seine separierte Lage zu den übrigen Revieren aus.

Diese Studie bestätigte das Vorkommen von *Y. pseudotuberculosis* in Wildschweinen aus Deutschland. Damit können sie eine mögliche Quelle von *Y. pseudotuberculosis*-Infektionen sein, wobei das Wildschwein möglicherweise mehr als Transmitter fungiert, als dass es ein Reservoir darstellt. Über Yersiniosen, die durch den Verzehr von kontaminiertem Wildschweinfleisch oder durch Kontakt mit Wildschweinen verursacht wurden, ist bisher nichts bekannt. In Anbetracht des steigenden Interesses an Wildfleisch, der hohen Mengen von Wildbret, die dem Verbraucher zur Verfügung stehen, der stetig wachsenden Populationen von Wildschweinen in Europa, und ihrer Verbreitung in der Umwelt, können Wildschweine eine wichtige Rolle bei der Epidemiologie von *Yersinia*-Infektionen einnehmen. Jedoch unterscheiden sich die Verzehrsgewohnheiten beim Wildfleisch (Verzehrmenge/ Jahr und Zubereitungsformen) deutlich im Vergleich zum Schweinefleisch und verringern die Wahrscheinlichkeit einer Infektion. In dieser Arbeit wurden zehn *Y. pseudotuberculosis*-Stämme aus 503 Wildschweinen-Tonsillen isoliert. Eine dreifach höhere Prävalenz wurde mit Hilfe der molekularbiologischen Methode festgestellt. Die Analysen der Isolate zeigten, dass sie sich signifikant unterschieden. Dies betraf nicht nur den Biotyp, Serotyp und MLST der Isolate, sondern auch ihren Virulenzgehalt. Somit existieren mehrere Linien von *Y. pseudotuberculosis* in deutschen Wildschweinen und es ist wahrscheinlich, dass in Zukunft weitere Vertreter gefunden werden. Das in dieser Arbeit entworfene Protokoll, welches für den kulturellen Nachweis angewendet wurde, kann nützlich für weitere Studien sein, da es exklusiv für *Y. pseudotuberculosis*

entwickelt wurde. Dennoch ist eine weitere Verbesserung nötig, besonders in Anbetracht der immer noch hohen Prävalenzwert-Unterschiede der kulturellen und molekularbiologischen Nachweismethoden.

7 Zusammenfassung

Die Yersiniose ist nach der Salmonellose und der Campylobacteriose die häufigste bakterielle Lebensmittelinfektion in Deutschland und anderen europäischen Ländern. Sie wird durch *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* verursacht. Während Hausschweine das Haupt-Reservoir für *Y. enterocolitica* darstellen, ist über die Verbreitung von *Y. pseudotuberculosis* in Tieren wenig bekannt. Auch existiert für diese Spezies kein validiertes kulturelles Nachweisverfahren. In dieser Arbeit sollte daher in Anlehnung an die DIN EN ISO 10273:2017 zum kulturellen Nachweis von *Y. enterocolitica* ein Verfahren zur Isolierung von *Y. pseudotuberculosis* aus tierischem Probenmaterial entworfen und damit eine Prävalenzstudie zur Verbreitung von *Y. pseudotuberculosis* in Wildschweinen durchgeführt werden. Isolate sollten dann eingehend charakterisiert werden. Da sich *Y. pseudotuberculosis* sehr empfindlich gegenüber einer KOH-Behandlung zeigte, wurde dieser Schritt aus dem Protokoll der DIN EN ISO 10273:2017 entfernt. Stattdessen wurde ein Prä-Inkubationsschritt bei Raumtemperatur vor einer einwöchigen Kälteanreicherung eingeführt, der das Wachstum von *Y. pseudotuberculosis* signifikant steigerte. Damit konnte die Isolierung der Bakterien in nur 10 Tagen durchgeführt werden. In der Prävalenzstudie wurden Tonsillen von 503 Wildschweinen auf das Vorkommen von *Y. pseudotuberculosis* überprüft. Durch PCR wurde eine Prävalenz von 6 % ermittelt, die kulturell ermittelte Prävalenz betrug 2 %. Zehn *Y. pseudotuberculosis*-Isolate konnten gewonnen werden, die sich z. T. signifikant voneinander unterschieden. Dieses betraf nicht nur den Biotyp, Serotyp und MLST-Typ, sondern auch vorhandene Virulenzgene. Während vier Isolate sowohl das Virulenzplasmid pYV, als auch die chromosomalen Virulenz-Gene *ail*, *inv* und eine komplette Hochpathogenitätsinsel (HPI) besaßen, konnten bei einem Isolat (M489) lediglich die Virulenzgene *ail* und *inv* nachgewiesen werden. Alle Isolate zeigten gegenüber den meisten getesteten antimikrobiellen Substanzen eine ausgeprägte Sensitivität, mit Ausnahme gegenüber dem Antibiotikum Colistin. Durch phylogenetische Untersuchungen

ließen sich die zehn *Y. pseudotuberculosis*-Isolate in vier Cluster bzw. fünf PFGE-Restriktionsmuster einordnen. Dabei zeigte sich, dass sich das Isolat M489 am stärksten von den übrigen Isolaten unterschied und am entferntesten mit den anderen Stämmen verwandt war. Das in dieser Arbeit entworfene Protokoll zum kulturellen Nachweis von *Y. pseudotuberculosis* kann für weitere Studien hilfreich sein, da es speziell für diese Spezies entwickelt wurde.

8 Summary

After Campylobacteriosis and Salmonellosis, Yersiniosis is the most frequent foodborne bacterial infectious disease in Germany and other European countries. It is caused by *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. While domestic pigs are the main reservoir for *Y. enterocolitica*, little is known about the prevalence of *Y. pseudotuberculosis* in animals. There is also no validated cultural detection method for this species. For that reason, a method based on DIN EN ISO 10273:2017 for the cultural detection of *Y. enterocolitica* should be developed for the isolation of *Y. pseudotuberculosis* from animal samples. Using this new method, a study on the prevalence of *Y. pseudotuberculosis* in wild boars should be carried out. Isolates should then be characterized in detail. Since *Y. pseudotuberculosis* turned out to be very sensitive to KOH treatment, this step of the DIN EN ISO 10273: 2017 was omitted in the method for *Y. pseudotuberculosis*. Instead, a pre-incubation step at room temperature prior to one-week cold enrichment was introduced, which significantly increased the growth of *Y. pseudotuberculosis*. Through this, the isolation of the bacteria could be performed in just ten days. In the prevalence study, tonsils from 503 wild boars were examined for the presence of *Y. pseudotuberculosis*. By PCR, a prevalence of 6% was determined, the culturally determined prevalence was 2%. Ten *Y. pseudotuberculosis* isolates could be obtained, some of which were significantly different. This does not only refer to the biotype, serotype and MLST type of the isolates, but also the composition of virulence genes. While four isolates possessed both the virulence plasmid pYV and the chromosomal virulence genes *ail*, *inv* and a complete high pathogenicity island (HPI), in one isolate (M489) only the virulence genes *ail* and *inv* could be detected. All isolates showed a pronounced sensitivity to most of the tested antimicrobials, except for the antibiotic colistin. By phylogenetic studies, the ten *Y. pseudotuberculosis* isolates could be classified into four clusters and five PFGE restriction patterns. It was found that the isolate M489 diverged significantly from the other isolates and was most distantly related to the other strains. The protocol for the cultural detection of *Y. pseudotuberculosis*,

designed in this work, may be useful for further studies as it was specially developed for this species (*Yersinia pseudotuberculosis*).

9 Literaturverzeichnis

Abe, J., et al. 1997. Clinical Role for a Superantigen in *Yersinia pseudotuberculosis* Infection. *The Journal of Clinical Investigation*. 1997, Bd. 99, 8, S. 1823-1830.

Achtmann, M., et al. 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999, Bd. 96, 24, S. 14043-14048.

Al Dahouk , S., et al. 2005. Seroprevalence of brucellosis, tularemia, and yersiniosis in wild boars (*Sus scrofa*) from north-eastern Germany. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*. 2005, Bd. 52, 10, S. 444-455.

Amphlett, A. 2016. Far East Scarlet-Like Fever: A Review of the Epidemiology, Symptomatology, and Role of Superantigenic Toxin: *Yersinia pseudotuberculosis*-Derived Mitogen A. *Open Forum Infectious Diseases*. 2016, Bd. 3, 1.

Apelt, J. M. 2007. *INAUGURAL-DISSERTATION: Hygienestatus von frisch erlegten Wildtieren aus verschiedenen Jagdrevieren Deutschlands*. 2007.

Arrausi-Subiza, M., et al. 2016. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in the Basque Country, northern Spain. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2016, Bd. 58, 4.

Arrausi-Subiza, M., et al. 2014. valuation of different enrichment methods for pathogenic *Yersinia* species detection by real time PCR. *BMC Veterinary Research*. 2014, Bd. 10, 192.

Atanassova, V., et al. 2008. Microbiological quality of freshly shot game in Germany. *Meat Science*. 2008, Bd. 78, 4, S. 414-419.

Atkinson, S. und Williams, P. 2016. *Yersinia* virulence factors - a sophisticated arsenal for combating host defences. *Food Research*. 2016, Bd. 5, 1370, S. 1-10.

Aulisio , C. C., Mehlman, I. J. und Sanders, A. C. 1980. Alkali Method for Rapid Recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from Foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 1980, Bd. 39, 1, S. 135-140.

- Ayyadurai , S., et al. 2010.** Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiology*. 2010, Bd. 10, 285.
- Bandick, N. und Ring, C. 1996.** Wildbret als Nahrungsmittel. *Fleischwirtschaft*. 1996, Bd. 76, S. 888-896.
- Bauschulte, C., Birka, S. und Lücker, E. 2017.** Wild richtig erlegt. 58. *Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG: Programm- und Abstract-Band*. Garmisch-Partenkirchen : s.n., 2017, S. 214.
- Bergman, M. A., Chafel, R. und Meccas, J. 2010.** *Yersinia*. [Buchverf.] C. L. Gyles, et al. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 4. Ames, IA : Wiley-Blackwell, 2010, S. 309-323.
- Bogdanovich, T., et al. 2003.** Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, Bd. 41, 11, S. 5103-5112.
- Boqvist, S., et al. 2009.** Sources of sporadic *Yersinia enterocolitica* infection in children in Sweden, 2004: a case-control study. *Epidemiology and Infection*. 2009, Bd. 137, S. 897–905.
- Bottone, E. J. 1999.** *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes and Infection*. 1999, Bd. 1, 4, S. 323-333.
- 1997.** *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997, Bd. 10, 2, S. 257-267.
- Bottone, E., Bercovier, H., Mollaret, H. 2005.** Genus XLI. *Yersinia*. [Buchverf.] G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J.T. Garrity. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed.* New York, USA : Springer, 2005, S. 838-848.
- Bottone, E., Brcovier, H., Mollaret, H. 2005.** Genus XLI. *Yersinia*. [Buchverf.] G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. Garrity. *Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology 2nd Ed.* New York, USA : Springer, 2005, S. 838-848.
- Brodowski, G. und Beutling, D. 1998.** Der Einfluß exogener Faktoren auf die Wildbretqualität von Dam-, Reh- und Schwarzwild. *Fleischwirtschaft*. 1998, Bd. 78, 12, S. 1298-1300.
- Bundesinstitut für Risikobewertung. 2. Januar 2006.** *Information Nr. 01/2006: Tipps für Jäger zum Umgang mit Wildfleisch*. 2. Januar 2006.

Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz. 2018b. <https://www.gesetze-im-internet.de/bjagdg/>. [Online] 2018b. [Zitat vom: 12. April 2018.]

— **2018a.** <https://www.gesetze-im-internet.de/ifsg/>. [Online] 2018a. [Zitat vom: 01. Februar 2018.]

Bundesministerium für Gesundheit, Arbeitskreis Blut. 1999. Bekanntmachung des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit-Yersinia enterocolitica. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*. 1999, Bd. 42, S. 613-621.

BVDF, Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie e. V. 2018. https://www.bvdf.de/in_zahlen/tab_05/. [Online] 2018. [Zitat vom: 11. April 2018.]

Carniel, E. 2001. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes and Infection*. 2001, Bd. 3, 7, S. 561-569.

Carniel, E., et al. 2006. *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. [Buchverf.] M. Dworkin, et al. *The Prokaryotes- A Handbook on the Biology of Bacteria*. 3. s.l. : Springer, 2006, Bd. 6, S. 270-398.

Casoli, C., et al. 2005. Wild Ungulate Slaughtering and Meat Inspection. *Veterinary Research Communications*. 2005, Bd. 29, 2, S. 89-95.

Ch'ng, S. L., et al. 2011. Population structure and evolution of pathogenicity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, Bd. 77, 3, S. 768-775.

Coburn, H. L., et al. 2005. Qualitative risk assessment of the hazards and risks of wild game. *The Veterinary Record*. 2005, Bd. 157, 10, S. 321-323.

Collyn, F., et al. 2002. *Yersinia pseudotuberculosis* Harbors a Type IV Pilus Gene Cluster That Contributes to Pathogenicity. *Infection and Immunity*. 2002, Bd. 70, 11, S. 6196-6205.

Cornelis, G., et al. 1987. *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. *Reviews of infectious diseases*. 1987, Bd. 9, 1, S. 64-87.

Cox, C. 2016. MASTER THESIS: Phenotypic and genotypic analysis of plasmids from *Yersinia pseudotuberculosis*. 2016.

- Czernomysy-Furowicz, D. 1997.** An outbreak of foal yersiniosis in Poland: pathological and bacteriological examination. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 1997, Bd. 286, 4, S. 542-546.
- Debois, J., Vandepitte, J. und Degreef, H. 1978.** *Yersinia enterocolitica* as a cause of erythema nodosum. *Dermatologica*. 1978, Bd. 156, 2, S. 65-78.
- Dedié, K., et al. 1993.** Yersiniosen mit enteritischen Verlauf beim Menschen. *Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch-Epidemiologie, Pathologie, Klinik, Diagnostik und Bekämpfung*. Stuttgart : Ferdinand Enke Verlag, 1993.
- Deutscher Jagdverband e. V. 2018.** *DJV-Handbuch Jagd*. Berlin : s.n., 2018.
- Deutz, A., et al. 2000.** Hygienrisiken bei Wildfleisch - Oberflächenkeimgehalte und humanpathogene Keime. *Fleischwirtschaft*. 2000, Bd. 80, 12, S. 106-108.
- Deutz, A., et al. 2006.** Wildfleischhygienische Aspekte zu Stöberjagden auf Rot- und Rehwild. *Archiv für Lebensmittelhygiene*. 2006, Bd. 57, S. 197-200.
- Eckhardt, R. 1989.** Infektionskrankheiten-*Enterobacteriaceae, Vibrionaceae* und Verwandte. [Buchverf.] L. Heilmeyer . [Hrsg.] H. A. Kühn und J. Schirmeister. *Innere Medizin-Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. 5. Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, 1989, Bd. 1, S. 119-120.
- Eitel, J. und Dersch, P. 2002.** The YadA Protein of *Yersinia pseudotuberculosis* Mediates High-Efficiency Uptake into Human Cells under Environmental Conditions in Which Invasin Is Repressed. *Infection and Immunity*. 2002, Bd. 70, 9, S. 4880-4891.
- El Tahir, Y. und Skurnik, M. 2001.** YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *International Journal of Medical Microbiology*. 2001, Bd. 291, 3, S. 209-218.
- Engelmann, E. und Kugler, F. 2012.** MALDI-TOF Massenspektrometrie-Eine molekulare Identifizierungsmethode im GMP-Umfeld. *TechnoPharm-Fokus Hygiene und Monitoring*. 2012, Bd. 2, 1, S. 18-23.
- European Food Safety Authority (EFSA) und European Centre for Disease Prevention and Control. 2016.** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *The EFSA Journal*. 2016, Bd. 14, 12, S. 4634.
- . **2017.** The European Union summary report on trends and sources, of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *The EFSA Journal*. 2017.

- European Food Safety Authority, (EFSA). 2007.** Monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia spp.* Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *The EFSA Journal*. 2007, Bd. 595, S. 1-30.
- Evira (Finnish Food Safety Authority). 2008.** The *Yersinia pseudotuberculosis* outbreak in Kajaani is suspected to have been caused by grated carrot. <https://www.evira.fi/en/shared-topics/news/the-yersinia-pseudotuberculosis-outbreak-in-kajaani-is-suspected-to-have-been-caused-by-grated-carrot/>. 2008.
- Fehlhaber, K. und Janetschke, P. 1992.** *Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene*. Stuttgart : Gustav-Fischer Verlag, 1992.
- Flores, D., et al. 2003.** Reactive arthritis:: newer developments. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2003, Bd. 29, 1, S. 37-59.
- Ford, D. K. 1979.** *Yersinia*-induced arthritis and Reiter's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1979, Bd. 38, Suppl 1, S. 127-128.
- Frederiksson-Ahomaa, M. und Wacheck, S. 2011.** *Enteropathogene Yersinien*. Hamburg : Behr's-Verlag, 2011. S. 21.
- Fredriksson-Ahomaa , M., et al. 2011.** Different enteropathogenic *Yersinia* strains found in wild boars and domestic pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2011, Bd. 8, 6, S. 733-737.
- Fredriksson-Ahomaa, M. und Korkeala, H. 2003.** Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, fod and environmental samples: a methodological problem. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003, Bd. 16, 2, S. 220-229.
- Fredriksson-Ahomaa, M., et al. 2009.** Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, Bd. 135, 3, S. 199-202.
- Fredriksson-Ahomaa, M., et al. 2009.** Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, Bd. 135, 3, S. 199-202.
- Frölich, K., et al. 2003.** Epizootiologic and ecologic investigations of European brown hares (*Lepus europaeus*) in selected populations from Schleswig-Holstein, Germany. *Journal of Wildlife Diseases*. 2003, Bd. 39, 4, S. 751-761.

Fukushima, H. 1985. Direct isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 1985, Bd. 50, 3, S. 710-712.

— **1992.** Direct isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* from fresh water in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, Bd. 58, 8, S. 2688-2690.

Fukushima, H. und Gomyoda, M. 1986. Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* biotype 3B serotype O3 inhibited on cefsulodin-Irgasan-novobiocin agar. *Journal of Clinical Microbiology*. 1986, Bd. 24, 1, S. 116-120.

— **1991.** Intestinal carriage of *Yersinia pseudotuberculosis* by wild birds and mammals in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991, Bd. 57, 4, S. 1152-1155.

Fukushima, H., et al. 2001. Geographical Heterogeneity between Far Eastern and Western Countries in Prevalence of the Virulence Plasmid, the Superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-Derived Mitogen, and the High-Pathogenicity Island among *Yersinia pseudotuberculosis* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, Bd. 39, 10, S. 3541-3547.

Fukushima, H., et al. 1985. Presence of zoonotic pathogens (*Yersinia spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.* and *Leptospira spp.*) simultaneously in dogs and cats. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*. 1985, Bd. 181, 3-5, S. 430-440.

Fukushima, H., et al. 1998. Putative origin of *Yersinia pseudotuberculosis* in western and eastern countries. A comparison of restriction endonuclease analysis of virulence plasmids. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 1998, Bd. 288, 1, S. 93-102.

Fukushima, H., et al. 1988. *Yersinia pseudotuberculosis* infection contracted through water contaminated by a wild animal. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988, Bd. 26, 3, S. 584-585.

Galindo, C. L., et al. 2011. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. *Journal of Pathogens*. 2011.

Gaydos, J. K., Zabek, E. and Raverty, S., et al. 2009. *Yersinia pseudotuberculosis* Septicemia in a Beaver from Washington State. *Journal of Wildlife Diseases*. 2009, Bd. 45, 4, S. 1182-1186.

- Gehring, A. M., et al. 1998.** Iron acquisition in plague: Modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chemistry and Biology*. 1998, Bd. 5, 10, S. 573-586.
- Gemski, P., et al. 1980.** Presence of a virulence-associated plasmid in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity*. 1980, Bd. 28, 3, S. 1044-1047.
- Giannitti, F., et al. 2014.** *Yersinia pseudotuberculosis* infections in goats and other animals diagnosed at the California Animal Health and Food Safety Laboratory System: 1990–2012. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2014, Bd. 26, 1, S. 88-95.
- Gill, J. M. 1996.** Yersiniosis of farm animals in New Zealand. *Surveillance*. 1996, Bd. 23, 4, S. 24-26.
- Giuggioli, G., et al. 2017.** The hygiene-sanitary control in the wild game meats. *Italian Journal of Food Safety*. 2017, Bd. 6, 4, S. 6875.
- Goubard, A., et al. 2015.** Superantigenic *Yersinia pseudotuberculosis* Induces the Expression of Granzymes and Perforin by CD4+ T Cells. *Infection and Immunity*. 2015, Bd. 83, 5, S. 2053-2064.
- Grahek-Ogden, D., et al. 2007.** Outbreak of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:9 infection and processed pork, Norway. *Emerging Infectious Diseases*. 2007, Bd. 13, 5, S. 754–756.
- Granfors, K., et al. 1989.** *Yersinia* antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis. *The New England Journal of Medicine*. 1989, Bd. 320, 4, S. 216-221.
- Grant, H., Rode, H. und Cywes, S. 1994.** *Yersinia pseudotuberculosis* affecting the appendix. *Journal of Pediatric Surgery*. 1994, Bd. 29, 12, S. 1621.
- Grigull, L., et al. 2005.** Multiple Spleen and Liver Abscesses Due to *Yersinia enterocolitica* Septicemia in a Child With Congenital Sideroblastic Anemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 2005, Bd. 27, 11, S. 624-626.
- Guinet , F., Carniel, E. und Leclercq, A. 2011.** Transfusion-Transmitted *Yersinia enterocolitica* Sepsis. *Clinical Infectious Diseases*. 2011, Bd. 53, 6, S. 583-591.
- Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S. H. E., Ullmann, U. 2013.** *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 4. Auflage*. Heidelberg : Springer, 2013.

- Han, T. H., Paik, I. K. und Kim, S. J. 2003.** Molecular relatedness between isolates of *Yersinia pseudotuberculosis* from a patient and an isolate from mountain spring water. *Journal of Korean Medical Science*. 2003, Bd. 18, 3, S. 425-428.
- Hannu, T., et al. 2003.** Reactive arthritis after an outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* serotype O:3 infection. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2003, Bd. 62, 9, S. 866-869.
- Head, C. B., Whitty, D. A. und Ratnam, S. 1982.** Comparative study of selective media for recovery of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1982, Bd. 16, 4, S. 615-621.
- Heesemann, J., et al. 1983.** Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *The Journal of Infectious Diseases*. 1983, Bd. 147, 1, S. 107-115.
- Hein, J. und Knauff, H. G. 1978.** Die Yersiniosis in Deutschland. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 1978, Bd. 103, S. 490-491.
- Heintges, F. 2015.** *Sicher durch die Jägerprüfung-Wildkrankheiten, Versorgen und Verwerten von Wild*. [Hrsg.] W. Heintges. 9. Weiden : Spintler Druck und Verlag GmbH, 2015.
- Hetem, D. J., Pekelharing, M. und Thijsen, S. F. T. 2013.** Probable transmission of *Yersinia enterocolitica* from a pet dog with diarrhoea to a 1-year-old infant. *BMJ Case Reports*. 2013.
- Hoffmann, D. 2013.** Wieviel Wild wird in Jägerfamilien verzehrt? Auswertung einer Fragebogenerhebung des DJV. "Alle(s) Wild"- Symposium des Bundesinstitutes für Risikobewertung, 18.-19. März 2013. Berlin : s.n., 2013.
- Holzappel, W. 1996.** Mikrobiologie verpackter Fleischerzeugnisse und verpackten Fleisches. [Buchverf.] H. Weber. *Mikrobiologie der Lebensmittel – Fleisch und Fleischerzeugnisse*. Hamburg : Behr's Verlag, 1996, S. 393-404.
- Homewood, R., et al. 2003.** Ileitis due to *Yersinia pseudotuberculosis* in Crohn's disease. *Journal of Infection*. 2003, Bd. 47, 4, S. 328-332.
- Hoogkamp-Korstanje, J. A. A. und De Koning, J. 1990.** Klinik, Diagnostik und Therapie von *Yersinia enterocolitica*-Infektionen. *Immunität und Infektion*. 1990, Bd. 18, S. 192-197.

- Hu, Y., et al. 2009.** OmpR positively regulates urease expression to enhance acid survival of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiology*. 2009, Bd. 155, S. 2522-2531.
- Hurlin, J. und Schulze, H. 2007.** Möglichkeiten und Grenzen der Qualitätssicherung in der Wildfleischvermarktung. <http://www.uni-goettingen.de/de/34019.html>. [Online] 2007. [Zitat vom: 16. April 2018.]
- International Organisation for Standardization. 2003.** ISO 10273: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Genf, Schweiz : s.n., 2003.
- Jalava, K., et al. 2006.** An outbreak of gastrointestinal illness and erythema nodosum from grated carrots contaminated with *Yersinia pseudotuberculosis*. *The Journal of Infectious Diseases*. 2006, Bd. 194, 9, S. 1209-1216.
- Jalava, K., et al. 2004.** Multiple Outbreaks of *Yersinia pseudotuberculosis* Infections in Finland. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, Bd. 42, 6, S. 2789-2791.
- Jamali , H., Radmehr , B. und Ismail, S. 2014.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria*, *Salmonella*, and *Yersinia* species isolates in ducks and geese. *Poultry Science*. 2014, Bd. 93, 4, S. 1023-1030.
- Janda, J. M. und Abbott, S. L. 1998.** The genus *Yersinia*. *The Enterobacteria*. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1998, S. 202-244.
- Jerrett, I., Slee, K. und Robertson, B. 1990.** Yersiniosis in Farmed Deer. *Australian Veterinary Journal*. 1990, Bd. 67, 6, S. 212-214.
- Kageruka, P., et al. 1976.** Pseudotuberculosis in the Antwerp Zoo. *Acta zoologica et pathologica Antverpiensia*. 1976, Bd. 66, S. 111-200.
- Kageyama, T., et al. 2002.** *Yersinia pseudotuberculosis* infection in breeding monkeys: detection and analysis of strain diversity by PCR. *Journal of Medical Primatology*. 2002, Bd. 31, 3, S. 129-135.
- Kappelhoff, W. 1999.** Wildbrethygiene in der jagdlichen Praxis. *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle*. 1999, Bd. 6, S. 272-276.
- Keto-Timonen , R., et al. 2018.** Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* Strains at Different Temperatures, pH Values, and NaCl and Ethanol Concentrations. *Journal of Food Protection*. 2018, Bd. 81, 1, S. 142-149.

- Kirch, E., et al. 1931.** *Ergebnisse der Allgemeinen Pathologie und Pathologischen Anatomie des Menschen und der Tiere: Zweiundzwanzigster Jahrgang: I. Abteilung.* Heidelberg : Springer, 1931, S. 184.
- Klimov , V. T. und Chesnokova, M. V. 2007.** Molecular genetic monitoring of *Yersinia pseudotuberculosis* using PCR O-genotyping. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2007, Bd. 22, 4, S. 150-154.
- Krämer, J. 2002.** *Lebensmittelmikrobiologie.* 4. Stuttgart : Eugen Ulmer Verlag, 2002.
- Krostitz, W. 1996.** Der Wildfleischmarkt. *Fleischwirtschaft.* 1996, Bd. 76, S. 1029-1036.
- Lasch , P., et al. 2010.** Characterization of *Yersinia* using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics. *Analytical Chemistry.* 2010, Bd. 82, 20, S. 8464-8475.
- Laukkanen , R., et al. 2009.** Contamination of carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 originates from pigs infected on farms. *Foodborne Pathogens and Disease.* 2009, Bd. 6, 6, S. 681-688.
- Laukkanen, R., et al. 2008.** Transmission of *Yersinia pseudotuberculosis* in the pork production chain from farm to slaughterhouse. *Applied and Environmental Microbiology.* 2008, Bd. 74, 17, S. 5444-5450.
- Leirisalo-Repo, M. und Suoranta, H. 1988.** Ten-year follow study of patients with *Yersinia* arthritis. *Arthritis & Rheumatology.* 1988, Bd. 31, 4, S. 533-537.
- Lenz, W. 1977.** *INAUGURAL-DISSERTATION: Fleischhygienische Untersuchung an Rehwild.* 1977.
- Lenze, W. 1977.** *INNAUGURAL-DISSERTATION: Fleischhygienische Untersuchungen an Rehwild. (Einfluss von Gesundheitszustand, Herkunft, Erlegungs- und Versorgungsmodalitäten auf Keimgehalt und pH-Wert).* 1977.
- Lillehaug, B., et al. 2005.** *Campylobacter spp., Salmonella spp., Verocytotoxic Escherichia coli* and antibiotic resistance in indicator organisms in wild cervids. *Acta veterinaria Scandinavica.* 2005, Bd. 46, 1-2, S. 23-32.
- Long, C., et al. 2010.** *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* Infections, FoodNet, 1996–2007. *Emerging Infectious Diseases.* 2010, Bd. 16, 3, S. 566-567.

Maahs, C. 2010. *INAUGURAL - DISSERTATION: Untersuchung zur mikrobiologischen Qualität von Rehwild unter verschiedenen Kühlbedingungen.* 2010.

MacDonald, E., et al. 2012. *Yersinia enterocolitica* Outbreak Associated with Ready-to-Eat Salad Mix, Norway, 2011. *Emerging Infectious Diseases.* 2012, Bd. 18, 9, S. 1496-1499.

Magistrali, C. F., et al. 2015. Characterisation of *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from animals with yersiniosis during 1996–2013 indicates the presence of pathogenic and Far Eastern strains in Italy. *Veterinary Microbiology.* 2015, Bd. 180, 1-2, S. 161-166.

Mair, N. S. 1973. Yersiniosis in Wildlife and its public health implications. *Journal of Wildlife Diseases.* 1973, Bd. 9, 1.

Malassez, L. und Vignal, W. 1884. Sur le micro-organisme de la tuberculose zoogléique. *Archives de physiologie norm et pathologie.* 1884, Bd. 4, S. 81-104.

Marder, E. P., et al. 2017. Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food and the Effect of Increasing Use of Culture-Independent Diagnostic Tests on Surveillance — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2013–2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR).* 2017, Bd. 66, 15, S. 397-403.

Marimon, J. M., et al. 2017. Thirty years of human infections caused by *Yersinia enterocolitica* in northern Spain: 1985–2014. *Epidemiology & Infection.* 2017, Bd. 145, 11, S. 2197-2203.

Martínez , P. O., et al. 2011. Variation in the prevalence of enteropathogenic *Yersinia* in slaughter pigs from Belgium, Italy, and Spain. *Foodborne Pathogens and Disease.* 2011, Bd. 8, 3, S. 445-450.

Martínez, O. P., et al. 2009. Prevalence of enteropathogenic *Yersinia* in Estonian, Latvian, and Russian (Leningrad region) pigs. *Foodborne Pathogens and Disease.* 2009, Bd. 6, 6, S. 719-724.

Matero , P., et al. 2009. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology.* 2009, Bd. 117, 1, S. 34-44.

Miller, V. L., et al. 2001. Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. *Molecular Microbiology.* 2001, Bd. 41, 5, S. 1053-1062.

- Mollaret, H. H. 1965.** Sur la nomenclature et la taxinomie du bacille de Malassez et Vignal. *Inational Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*. 1965, Bd. 14, 2, S. 97-106.
- Mollaret, H. H. und Thal, E. 1974.** *Yersinia*. [Buchverf.] R. Buchanan und N. E. Gibson. *Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology* . 8. Baltimore : Williams and Wilkins, 1974, S. 330-332.
- MPI (Ministry for Primary Industries, New Zealand). 2014.** *Outbreak Source Investigation-Yersinia pseudotuberculosis 2014*. New Zealand : s.n., 2014.
- Mühldorfer, K., et al. 2010.** *Yersinia* Species Isolated from Bats, Germany. *Emerging Infectious Diseases*. 2010, Bd. 16, 3, S. 578-580.
- Nakajima , H., et al. 1992.** Detection and identification of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by an improved polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992, Bd. 30, 9, S. 2484-2486.
- Nakamura, S.-I., et al. 2015.** Yersiniosis due to infection by *Yersinia pseudotuberculosis* 4b in captive meerkats (*Suricata suricatta*) in Japan. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2015, Bd. 27, 5, S. 641-644.
- Nemoto, H., et al. 1992.** Multiple liver abscesses secondary to *Yersinia enterocolitica*. *Internal Medicine*. 1992, Bd. 31, 9, S. 1125-1127.
- Neubauer, H. und Sprague, L. D. 2015.** Strains of *Yersinia wautersii* should continue to be classified as the 'Korean Group' of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex and not as a separate species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015, Bd. 65, 2, S. 732-733.
- Nikolova, S., et al. 2001.** Isolation of Pathogenic *Yersiniae* from Wild Animals in Bulgaria. *Journal of Veterinary Medicine*. 2001, Bd. 48, 3, S. 203-209.
- Niskanen, T., et al. 2003.** VirF-Positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* Found in Migratory Birds in Sweden. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, Bd. 69, 8, S. 4670-4675.
- Novoslavskij, A., et al. 2010.** Prevalence of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in slaughtered pigs within 5 months period in Lithuania. *Veterinarija ir zootechnika*. 2010, Bd. 51, 73, S. 30-35.

Nowak, B., et al. 2006. Validation of a method for the detection of virulent *Yersinia enterocolitica* and their distribution in slaughter pigs from conventional and alternative housing systems. *Veterinary Microbiology*. 2006, Bd. 117, 2-4, S. 219-228.

Nowgesic, E., et al. 1999. Outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* in British Columbia--November 1998. *Canada Communicable Disease Report*. 1999, Bd. 99, 11, S. 97-100.

Nuorti, J. P., et al. 2004. A widespread outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O:3 infection from iceberg lettuce. *The Journal of Infectious Diseases*. 2004, Bd. 189, 5, S. 766-774.

Pärn, T., et al. 2015. Outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O:1 infection associated with raw milk consumption, Finland, spring 2014. *Eurosurveillance*. 2015, Bd. 20, 40.

Pekka Nuorti, J., et al. 2004. A Widespread Outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O:3 Infection from Iceberg Lettuce. *The Journal of Infectious Diseases*. 2004, Bd. 189, 5, S. 766-774.

Portnoy, D. A., et al. 1984. Characterization of common virulence plasmids in *Yersinia* species and their role in the expression of outer membrane proteins. *Infection and Immunity*. 1984, Bd. 43, 1, S. 108-114.

Rakin, A., et al. 1999. Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. *Infection and Immunity*. 1999, Bd. 67, 10, S. 5265-5274.

Revell, P. A. und Miller, V. L. 2001. *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, Bd. 205, 2, S. 159-164.

Riemer, R. und Reuter, G. 1979. Untersuchungen über die Notwendigkeit und Durchführbarkeit einer Wildfleischuntersuchung bei im Inland erlegtem Rot- und Rehwild – zugleich eine Erhebung über die substantielle Beschaffenheit und die Mikroflora von frischem Wildfleisch. *Fleischwirtschaft*. 1979, Bd. 59, S. 857-864.

Riley, G. und Toma, S. 1989. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using congo red-magnesium oxalate agar medium. *Journal of Clinical Microbiology*. 1989, Bd. 27, 1, S. 213-214.

Rimhanen-Finne, R., et al. 2009. *Yersinia pseudotuberculosis* causing a large outbreak associated with carrots in Finland, 2006. *Epidemiology & Infection*. 2009, Bd. 137, 3, S. 342-347.

- Riot, B., Berche, P. und Simonet, M. 1997.** Urease is not involved in the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. *Infection and Immunity*. 1997, Bd. 65, 5, S. 1985-1990.
- Robert Koch Institut (RKI). 2017a.** *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2016*. Berlin : s.n., 2017a.
- Robert Koch Institut. 2017b.** Epidemiologisches Bulletin -Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und public health. 2017b, Bd. 31/2017, S. 309-314.
- Rouffaer, L. O., et al. 2017b.** Effects of urbanization on host-pathogen interactions, using *Yersinia* in house sparrows as a model. *PLoS ONE*. 2017b, Bd. 12, 12.
- Rouffaer, L. O., et al. 2017a.** Low prevalence of human enteropathogenic *Yersinia spp.* in brown rats (*Rattus norvegicus*) in Flanders. *PLoS ONE*. 2017a, Bd. 12, 4.
- Saebø , A. und Lassen , J. 1992.** Survival and causes of death among patients with *Yersinia enterocolitica* infection. A Norwegian 10-year follow-up study on 458 hospitalized patients. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 1992, Bd. 24, 5, S. 613-617.
- Saisawa, K. 1913.** Über die Pseudotuberkulose beim Menschen. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten; medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Virologie*. 1913, Bd. 73, S. 353-400.
- Sannö, A., et al. 2014.** Presence of *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli* O157:H7 in wild boars. *Epidemiology & Infection*. 2014, Bd. 142, 12, S. 2542-2547.
- Savin, C., et al. 2014.** The *Yersinia pseudotuberculosis* complex: Characterization and delineation of a new species, *Yersinia wautersii*. *International Journal of Medical Microbiology*. 2014, Bd. 304, 3-4, S. 452-463.
- Scherling, L. und Ring, C. 1989.** Zum Hygienestatus von Haarwildbret aus dem Staatsrevier Forstenried. *Fleischwirtschaft*. 1989, Bd. 69.
- Schiefer, G. 1996.** Mikrobiologie des Wildes. [Buchverf.] H. Weber. *Mikrobiologie der Lebensmittel*. Hamburg : Behr's Verlag, 1996, S. 533-561.
- Schiemann, D. A. 1979.** Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Canadian Journal of Microbiology*. 1979, Bd. 25, 11, S. 1298-1304.

- Schiemann, D. 1989.** *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. [Buchverf.] M. P. Doyle. *Foodborne Bacterial Pathogens*. New York, USA : Marcel Dekker, 1989, S. 601-672.
- Schlafer, D. H. und Foster, R. H. 2016.** Female Genital System. [Buchverf.] M. G. Maxie. *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 6. s.l. : Elsevier, 2016, Bd. 3, 4, S. 358-464.
- Skaar, E. P. 2010.** The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts. *PLoS Pathogens*. 2010, Bd. 6, 8.
- Skurnik, M., et al. 2009.** *Yersinia*. [Buchverf.] D. Liu. *Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens*. Boca Raton, Florida : CRC Press, 2009, S. 501-518.
- Skurnik, M., Peippo, A. und Ervelä, E. 2000.** Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Molecular Microbiology*. 2000, Bd. 37, 2, S. 316–330.
- Slee, K. J. und Button, C. 1990.** Enteritis in sheep, goats and pigs due to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Australian Veterinary Journal*. 1990, Bd. 67, 9, S. 320-322.
- Slee, K. J. und Skilbeck, N. W. 1992.** Epidemiology of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* infections in sheep. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992, Bd. 30, 3, S. 712-715.
- Slee, K. J., Brightling, P. und Seiler, R. J. 1988.** Enteritis in cattle due to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Australian Veterinary Journal*. 1988, Bd. 65, 9, S. 271-275.
- Statistisches Bundesamt. 2017.** Kap. 6.4 Verbrauch an ausgewählten Nahrungs- und Genussmitteln. *Statistisches Jahrbuch 2017*. 2017, S. 183.
- Sunahara , C., Yamanaka , Y. und Yamanishi , S. 2000.** Sporadic cases of *Yersinia pseudotuberculosis* serotype 5 infection in Shodo Island, Kagawa Prefecture. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2000, Bd. 53, 2, S. 74-75.
- Terti, R., et al. 1989.** Clinical manifestations of *Yersinia pseudotuberculosis* infection in children. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1989, Bd. 8, 7, S. 587-590.

- Thal, E. 1978.** Chapter II: The Identification of *Yersinia pseudotuberculosis*. [Buchverf.] T. Bergan und J. R. Norris. *Methods in Microbiology*. s.l. : Academic Press, 1978, Bd. 12, S. 15-24.
- Thoerner , P., et al. 2003.** PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence genes distribution. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, Bd. 69, 3, S. 1810-1816.
- Tisted-Lambertz, S., Nilsson, C. und Hallanvuol, S. 2008.** TaqMan-based real-time PCR method for detection of *Yersinia pseudotuberculosis* in food. *applied and Environmental Microbiology*. 2008, Bd. 74, 20, S. 6465-6469.
- Tsubokura, M. und Aleksic, S. 1995.** A simplified antigenic scheme for serotyping of *Yersinia pseudotuberculosis*: phenotypic characterization of reference strains and preparation of O and H factor sera. *Contributions to Microbiology and Immunology*. 1995, Bd. 13, S. 99-105.
- Uherová, R., Buchtová, V. und Takacsová , M. 1992.** Nährfaktoren im Wildfleisch. *Fleischwirtschaft*. 1992, Bd. 72, S. 1155-1156.
- Uliczka, F., et al. 2009.** Cell invasion of *Yersinia pseudotuberculosis* by invasin and YadA requires protein kinase C, phospholipase C- γ 1 and Akt kinase. *Cellular Microbiology*. 2009, Bd. 11, 12, S. 1782-1801.
- Vandepitte, J. und Wauters, G. 1979.** Epidemiological and clinical aspects of human *Yersinia enterocolitica* infections in Belgium. *Contributions to Microbiology and Immunology*. 1979, Bd. 5, S. 150-158.
- Vasala, M., et al. 2014.** High frequency of reactive arthritis in adults after *Yersinia pseudotuberculosis* O:1 outbreak caused by contaminated grated carrots. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2014, Bd. 73, S. 1793-1796.
- Vazquez-Torres, A. und Fang, F. C. 2000.** Cellular routes of invasion by enteropathogens. *Current Opinion in Microbiology*. 2000, Bd. 3, 1, S. 54-59.
- Virtanen, S., et al. 2011.** Factors related to the prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* on pig farms. *Epidemiology and Infection*. 2011, Bd. 139, 12, S. 1919-1927.
- von Altrock, A., Seinige , D. und Kehrenberg , C. 2015.** *Yersinia enterocolitica* Isolates from Wild Boars Hunted in Lower Saxony, Germany. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015, Bd. 81, 14, S. 4835-4840.

- Wacheck, S. 2008.** INAUGURAL-DISSERTATION: Mikrobiologische und sensorische Untersuchung tiefgefrorenen Wildbrets im Hinblick auf die Festlegung mikrobiologischer Richtwerte. 2008.
- Waldschmidt, J. 1978.** *Yersinia enterocolitica* and *pseudotuberculosis* infection in children. *Progress in Pediatric Surgery*. 1978, Bd. 11, S. 97-105.
- Welsh, R. D. und Stair, E. L. 1993.** *Yersinia pseudotuberculosis* bovine abortion. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1993, Bd. 5, 1, S. 109-111.
- Wieser, A., et al. 2012.** MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, Bd. 93, 3, S. 965–974.
- Wren, B. W. 2003.** The *Yersinia* model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. 2003, Bd. 1, 1, S. 55-64.
- Yanagawa, Y., Maruyama, T. und Sakai, S. 1978.** Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from Apparently Healthy Dogs and Cats. *Microbiology and Immunology*. 1978, Bd. 22, 10, S. 643–646.
- Yang, Y., et al. 1996.** The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. *Infection and Immunity*. 1996, Bd. 64, 7, S. 2483-2489.
- Yoshino, K., et al. 1995.** Geographical heterogeneity between Far East and Europe in prevalence of *ypm* gene encoding the novel superantigen among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995, Bd. 33, 12, S. 3356-3358.
- Yotsu, R., et al. 2010.** Erythema nodosum associated with *Yersinia enterocolitica* infection. *The Journal of Dermatology*. 2010, Bd. 37, 9.
- Zechner, K. 2003.** *Die Verbreitung der Yersiniose beim Menschen im Großraum München unter Berücksichtigung von Schweinefleisch und Schlachtnebenprodukten als mögliche Infektionsquelle*. München : unv. Diss., Ludwig-Maximilians-Universität , 2003.
- Haider, W. 2000.** *Zeitliches Wildbretangebot sowie Wildbretqualität aus der Sicht des Gastronomen*. Gumpenstein, Irnding, Österreich : s.n., 2000. Tagung für die Jägerschaft, 15. und 16. Februar 2000 an der Bundesanstalt für alpenländische Landwirtschaft. S. 31-32.

Zhang, S., et al. 2008. Fatal yersiniosis in farmed deer caused by *Yersinia pseudotuberculosis* serotype O:3 encoding a mannosyltransferase-like protein WbyK. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2008, Bd. 20, 3, S. 356-359.

Zheng, X. B., et al. 1995. *Yersinia pseudotuberculosis* in China. *Microbiology and Immunology*. 1995, Bd. 39, 10, S. 821-824.

Ziegenfuss, J. 2003. *INAUGURAL-DISSERTATION: Hygienestatus von erlegtem Schwarzwild (Sus scrofa scrofa) im Wartburgkreis*. 2003.

V Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Karsten Nöckler, vom Bundesinstitut für Risikobewertung und Prof. Dr. Rupert Mutzel, von der Freien Universität Berlin für die Überlassung dieses überaus interessanten Themas sowie für die wissenschaftliche Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

Ebenfalls gilt mein Dank Dr. Stefan Hertwig für die fachliche Betreuung, die wertvolle Unterstützung und für die Hilfestellung bei der Anfertigung der wissenschaftlichen Publikationen sowie für das Lesen des Manuskriptes.

Des Weiteren möchte ich den Kollegen aus der Abteilung „Biologische Sicherheit“ im Bundesinstitut für Risikobewertung ausdrücklich danken. An dieser Stelle seien namentlich Dr. Eckhard Strauch, Dr. Jens-Andre Hammerl, Dr. Jochen Reetz, Dr. Claudia Jäckel, Dr. Nadja Bier, Dr. Anne Mayer-Scholl, Dr. Nils Bandick, Dr. Jana Sachsenröder, Dr. Anja Buschulte, Dr. Annette Johne und Andrea Barac genannt. Vielen Dank für eure Unterstützung, die wertvollen Gespräche und die netten Stunden. Allen nicht namentlich erwähnten Kollegen danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die vielfältige Unterstützung.

Großer Dank gebührt den vielen Projektpartnern, für die Bereitstellung der Untersuchungsgebiete sowie für die über die Maße freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung. Erwähnen möchte ich insbesondere die Fürst zu Oettingen-Spielberg'sche Forstverwaltung, den Landesbetrieb Forst Brandenburg, den Deutschen Jagdverband, die Eigentümer des Eigenjagdbezirks Schönow und die zahlreichen Jagdpächter sowie Revierförster. Für die tatkräftige Unterstützung und das fortwährende Interesse an meiner Arbeit danke ich dem Revierförster Jörg Kabelitz, der Tierärztin Petra Kabelitz und Dr. Egbert Gleich vom Landeskompetenzzentrum Forst Eberswalde. Für ein beinahe familiäres Arbeitsklima, auch bei Probennahmen weit nach Mitternacht möchte ich Edgar und Tina Wendt ganz herzlich danken.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Mann Martin von ganzem Herzen danken. Für das große Interesse an meiner Arbeit, die bedingungslose Unterstützung, die Geduld und das mir entgegengebrachte Verständnis.

VI Veröffentlichungen

Auszüge der dargestellten Daten wurden bereits im Vorfeld in Fachpublikationen veröffentlicht.

Wissenschaftliche Artikel

Reinhardt, M., Hammerl, J. A., Kunz, K., Barac, A., Nöckler, K., Hertwig, S. (2018). Prevalence and diversity of *Yersinia pseudotuberculosis* in Wild Boars in Northeast Germany. *Applied and Environmental Microbiology*. doi: 10.1128/AEM.00675-18.

Reinhardt, M.*, Hammerl, J. A.*, Hertwig, S. (2018). Complete Genome Sequences of 10 *Yersinia pseudotuberculosis* Isolates Recovered from Wild Boars in Germany. *Genome Announcements*, 6(19). doi: 10.1128/genomeA.00266-18.

*These authors contributed equally to this work.

Konferenzbeiträge

(Poster) Reinhardt, M., Kunz, K., Barac, A., Nöckler, K., Hertwig, S. Improvement of the cultural detection of *Yersinia pseudotuberculosis*. of zoonotic National Symposium on Zoonoses Research 2016. Oktober 2016. Berlin, Deutschland.

(Poster) Reinhardt, M., Kunz, K., Barac, A., Nöckler, K., Hertwig, S. Untersuchungen zum kulturellen Nachweis von *Yersinia pseudotuberculosis*. 57. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG 2016. September 2016. Garmisch-Partenkirchen, Deutschland.

(Vortrag) Reinhardt, M., Hammerl, J. A., Hertwig, S. *Yersinia pseudotuberculosis* aus Schwarzwild im Nordosten Deutschlands. 58. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG 2017. September 2017. Garmisch-Partenkirchen, Deutschland. Vortragende: **Reinhardt, M.**

Masterarbeiten im Rahmen dieser Dissertation

Kunz, Katharina. (2016). Phänotypische und genotypische Untersuchungen von *Yersinia pseudotuberculosis*-Isolaten aus Wildtieren. Beuth Hochschule für Technik.

Cox Constanze. (2016). Phänotypische und genotypische Analyse von Plasmiden aus *Yersinia pseudotuberculosis*. Humboldt-Universität zu Berlin

VII Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben. Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet. Ein Promotionsverfahren zu einem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich wurde nicht beantragt.

Berlin, den 17. September 2018

Marie Reinhardt