FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Amtliche Methodensammlung

Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Die Brucellose wird durch eine Infektion mit Bakterien der Gattung "Brucella" verursacht.

Spezies (Hauptwirt)	Einstufung nach TRBA 466***
• *Brucella melitensis* (Hauptwirt Schaf und Ziege)	Risikogruppe 3
• *Brucella abortus* (Hauptwirt Rind)	Risikogruppe 3
• *Brucella suis* (Hauptwirt Schwein)	Risikogruppe 3
• *Brucella ovis* (Hauptwirt Schaf) **	Risikogruppe 3
• *Brucella canis* (Hauptwirt Hund)*	Risikogruppe 3
• *Brucella neotomae* (Hauptwirt Wüstenratte)*	Risikogruppe 3
• *Brucella microti* (Hauptwirt Feldmaus)*	Risikogruppe 2
• *Brucella ceti* (Hauptwirt Delphin)*	Risikogruppe 2
• *Brucella pinnipedialis* (Hauptwirt Robbe)*	Risikogruppe 2
• *Brucella inopinata* (Hauptwirt Mensch?)*	Risikogruppe 3
• *Brucella papionis*	*keine Einstufung*
• *Brucella vulpis*	*keine Einstufung*

* Diese Spezies sind bisher bei landwirtschaftlichen Nutztieren noch nicht nachgewiesen worden.
***Brucella ovis* ist der Erreger der Infektiösen Epididymitis (Ovine Epididymitis). Diese Erkrankung, ist ebenfalls anzeigepflichtig.
*** in der jeweils gültigen Fassung

1.2 Klinische Symptomatik

Als Krankheitsanzeichen werden bei Tieren vorwiegend undulierendes Fieber, Arthritis, Bursitis, Orchitis, Aborte und Puerperalerkrankungen festgestellt. Besonders schwer ist i.d.R. der Urogenitaltrakt betroffen. Deshalb sollten alle Aborte bei Nutztieren diagnostisch abgeklärt werden. Als Zoonoseerreger kommen *Brucella (B.) melitensis, B. abortus* und *B. suis* in Betracht. Sie führen zu akuten bis chronischen schweren Erkrankungen bei Menschen und stellen auch heute noch in vielen wirtschaftlich weniger entwickelten Ländern ein großes gesundheitliches Problem dar. Menschen infizieren sich i.d.R. durch kontaminierte Lebensmittel oder direkten Kontakt zu kranken Tieren bzw. tierischen Produkten.

1.3 Differentialdiagnose

Alle anderen bei Rindern, Schweinen, Schafen und Ziegen mit Aborten einhergehenden Krankheiten.

1.4 Diagnostische Indikation

Rechtlich vorgeschriebene Überwachungsuntersuchungen, Handelsuntersuchungen, klinischer, pathologisch-anatomischer oder epidemiologisch begründeter Verdacht.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Private und staatliche Laboratorien

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Referenzlabor für Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen:
Friedrich- Loeffler- Institut, Naumburger-Str. 96a, 07743 Jena, Tel: 03641 804 2466, Fax: 03641 804 2228.

1.6 Rechtsgrundlagen

- Richtlinie 64/432/EWG zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen in der jeweils geltenden Fassung
- Richtlinie 97/12/EG zur Änderung und Aktualisierung der Richtlinie 64/432/EWG zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen in der jeweils geltenden Fassung
- Richtlinie 90/429/EWG zur Festlegung der tierseuchenrechtlichen Anforderungen an den innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Samen von Schweinen und an dessen Einfuhr in der jeweils geltenden Fassung
- Brucellose-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 17. Mai 2017 in der jeweils geltenden Fassung
- Entscheidung 2003/467/EG zur Feststellung des amtlich anerkannt tuberkulose-, brucellose- und rinderleukosefreien Status bestimmter Mitgliedstaaten und Regionen von Mitgliedstaaten in Bezug auf die Rinderbestände in der jeweils geltenden Fassung
- Richtlinie 91/68/EWG des Rates vom 28. Januar 1991 zur Regelung tierseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Schafen und Ziegen in der jeweils geltenden Fassung
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der Fassung der Bekanntmachung vom 19. Juli 2011 in der jeweils geltenden Fassung
- Bekanntmachung der nationalen Referenzlaboratorien für anzeigepflichtige Tierseuchen und meldepflichtige Tierkrankheiten vom 5. Dezember 2008 in der jeweils geltenden Fassung
- Verordnung über die Gewinnung, Abgabe und Verwendung von Samen, Eizellen und Embryonen von Zuchttieren (**Samenverordnung** – SamEnV) vom 14. Oktober 2008 in der jeweils geltenden Fassung
- Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG) vom 20. Juli 2000 in der jeweils geltenden Fassung

2. Untersuchungsmaterial

Zum Nachweis des Erregers:

Die zum Erregernachweis bevorzugten Organe variieren je nach Tierart, Geschlecht und Alter der Tiere sowie der zu erwartenden Brucellen - Art. Die für die einzelnen Untersuchungsgänge besonders geeigneten Proben werden dort gesondert aufgeführt.

Auswahl und Entnahme:

Organmaterial frisch verendeter oder besser, von getöteten erkrankten Tieren bzw. frisch abortierte Feten, Se- und Exkrete, Blut (bei Fieber), veränderte Organe. Auf sterile Entnahme achten!

Die zu untersuchenden Tiere sollten nicht unmittelbar vor der Probenahme einer Antibiotikatherapie unterzogen worden sein.

Zum Antikörpernachweis:

Serum für RBT, SLA, KBR, ELISA

Plasma z. T. für ELISA

Milch für ELISA (Rind)

Transport und Lagerung:

Untersuchungsmaterial zur gezielten Untersuchung bei Brucelloseverdacht wird als „Biologischer Stoff, Kategorie B“ UN3373 umgehend vorschriftsmäßig in dicht schließenden Behältnissen entsprechend den Gefahrgutvorschriften für Straße und Eisenbahn (ADR), bzw. im Luftverkehr (IATA-DGR) in der jeweils gültigen Fassung mit Vorbericht und Untersuchungsantrag an die Untersuchungseinrichtung geschickt.

Während des Transportes und evtl. notwendig werdender Lagerung ist das Organ- bzw. Gewebematerial kühl (2 bis 8 °C) aufzubewahren. Das Probenmaterial für die Antikörperuntersuchung kann ungekühlt verschickt werden, sollte aber zügig in das Untersuchungslabor gelangen.

3. Untersuchungsgang

3.1 Vorsichtsmaßnahmen

Brucella (B.) melitensis, B. abortus, B. suis, B. canis, B. ovis und *B. neotomae* sind Erreger der Risikogruppe 3. Die gezielte Tätigkeit mit diesen Erregern oder potentiell erregerhaltigem Material in einer Untersuchungseinrichtung ist genehmigungspflichtig und kann nur in Laboratorien der Sicherheitsklasse 3 durchgeführt werden. Bei allen Arbeiten sind entsprechende Sicherheitsvorkehrungen einzuhalten. *B. pinnipedialis, B. ceti* und *B. microti* sind in die Risikogruppe 2 eingestuft und können in entsprechenden Laboren bearbeitet werden.

3.2 Erregernachweis

Der direkte kulturelle Nachweis des Erregers der Brucellose ist als beweisend anzusehen und daher in jedem brucelloseverdächtigen Tierbestand zu versuchen. Besondere Bedeutung kommt ihm in Herden zu, in denen serologische Untersuchungen zu keiner Abklärung führten, ebenso wie bei der Verfolgung epidemiologischer Zusammenhänge.
PCR Untersuchungen am genannten Probenmaterial schließen bei einem negativen Untersuchungsergebnis eine Infektion nicht aus.

3.2.1 Mikroskopischer Nachweis

Als Untersuchungsmaterial für den mikroskopischen Nachweis werden folgende Teile empfohlen:

Feten:	Mageninhalt (Bodensatz)
Eihautteile:	Kotyledonen (entzündete Areale)
Organteile:	Karunkeln (Oberfläche), Hoden, Nebenhoden
Sekrete:	Lochialsekret, Milch

Von den genannten Tierkörperteilen können Ausstrich- und/oder Abklatschpräparate angefertigt und nach Kister und/oder Stamp gefärbt werden. Auch immunospezifische Färbungen sind möglich.
Brucellen sind kleine, kokkoide Bakterien, 0,5 bis 0,7 x 0,6 bis 1,5 µm groß, gramnegativ und unbeweglich. Sie sind meist einzeln gelagert, oft wird auch intrazelluläre Lagerung in Phagozyten beobachtet. Brucellen bilden keine Kapseln oder Sporen und färben sich sowohl in der Kister- als auch in der Stamp-Färbung rot an.

Bewertung:	Der alleinige mikroskopische Nachweis von Bakterien, die wie Brucellen aussehen, ist als verdächtig zu bewerten.
Differentialdiagnose:	Coxiellen und Chlamydien stellen sich im Stamp-gefärbten Präparat ähnlich wie Brucellen dar (Tabelle 1).

3.2.2 Kultureller Nachweis

Als Untersuchungsmaterial für den kulturellen Nachweis werden folgende Organteile empfohlen:

Feten:	Labmageninhalt, Lunge, Leber (ersatzweise Niere, Gehirn) evtl. Darminhalt, Niere, und Placenta fetalis
Eihautteile:	Kotyledonen (ersatzweise andere Teile, besonders entzündete Areale); zur Unterdrückung der Begleitflora kann das Material für 20 - 30 Minuten in 3%ige Kalilauge eingelegt werden.
weibliche Tiere:	Karunkeln des Uterus, Euter- und Darmbeinlymphknoten, Euter (alle Viertel), Milch (Bodensatz und Rahm), Lochialsekret, Vaginalschleim
männliche Tiere:	Hoden, Nebenhodenkopf und -schwanz (besonders entzündete Areale), Sperma, Sediment von Präputialspülproben

Bei Bedarf kann untersucht werden:

Gelenk- und Bursa-Punktate, weitere Lymphknoten, Milz, Leber, Lunge, Blut, Tonsillen, Kopf- und Halslymphknoten, Abszesse.

Sämtliche o. g. Materialien werden direkt angelegt und evtl. zusätzlich in flüssige Anreicherungsmedien verbracht. Ein Zerkleinern des Organmaterials (z. B. mit Seesand) wird empfohlen.

3.2.3 Nährmedien

Probleme in der Anzüchtung von Brucellen ergeben sich mitunter durch ihre oft sehr geringe Anzahl im Probenmaterial und in ihrem langsamen Koloniewachstum.

Feste Nährmedien

ohne Hemmstoffzusatz:	Blutagarplatten
	Brucella - Agar
mit Hemmstoffzusatz:	Selektiv – Agar
	(Brucella - Agar mit Antibiotikasupplement
	Für die Anzüchtung von *B. ovis, B. abortus* Biovar 2, *B. pinnipedialis* und *B. suis* Biovar 2 ist der Zusatz von 5 % Serum oder Blut zum Nährmedium erforderlich.

Flüssige Anreicherungsmedien

Brucella-Bouillon, ohne Hemmstoffzusatz

Selektiv-Bouillon, mit Hemmstoffzusatz

Blutkultur: handelsübliche Blutkulturmedien (z. B. Microgrost-Blutkulturflaschen, Biotest AG)

3.2.4 Bebrütung

- Bebrütung unter mikroaerophilen Bedingungen (5 bis 10 Vol% CO_2) bei einer Temperatur von 37 °C (aerobe Bedingungen können zusätzlich gewählt werden, wenn eine Phänotypisierung bis zur Biovar durchgeführt werden soll)
- Agarplatten mindestens 5 bis maximal 21 Tage bebrüten, erste Ablesung nach 1 bis 2 Tagen.
- Flüssiganreicherungen mindestens 10 Tage (bis 6 Wochen) bebrüten, Subkultur auf feste Medien wöchentlich, beginnend am dritten Bebrütungstag.
- Das Wachstum auf Selektivmedien kann um einige Tage verzögert sein.
- Blutkulturen bis zu 35 Tage bebrüten.

3.2.5 Ablesen

(im Bedarfsfall mit Stereomikroskop)

- Auf festen Nährböden bilden Brucellen langsam wachsende, runde Kolonien, die in 2 bis 3 Tagen einen Durchmesser von 0,5 bis 2 mm erreichen; das Wachstum kann aber auch verzögert sein.
- Die Kolonien der glatten (S-) Form sind konvex, glattrandig, durchscheinend bis leicht gelblich und nicht hämolysierend.
- Rau- (R) und M-Formen, wie zum Beispiel die permanent raue Art *B. ovis* ist grauweiß, opak und leicht granuliert bzw. schleimig.
- Flüssige Nährmedien werden nach 7 Tagen gering gleichmäßig getrübt, es bildet sich wenig lockerer Bodensatz.

Verdächtige Kolonien sind auf folgende Kriterien zu überprüfen:

- Auf welchem Nährboden und bei welcher Atmosphäre wachsen die verdächtigen Kolonien? Brucellen wachsen aerob und/oder mikroaerophil auf hemmstofffreiem Agar und Selektiv-Agar
- Auf Blutagar keine Hämolyse.
- nach Gram und/oder Kister/Stamp
- Oxidase-Test positiv
  Kolonien von hemmstofffreiem, blutfreiem Agar prüfen, Glasstab oder Platinöse benutzen, positive Reaktion: Testpapier oder -stäbchen verfärbt sich innerhalb von 2 min. in blauviolett, Ausnahme: *B. ovis* reagiert im Oxidase-Test negativ!
- Positiver Katalase-Test
  Auf einem Objektträger einen Tropfen Wasserstoffperoxyd (Konzentration 3%ig) mit einer Kolonie verreiben. Positive Reaktion: starke Gasbildung.
- Beweglichkeitsprüfung
  Mit der Technik "Hängender Tropfen", möglichst aus gut bewachsener Bouillon; Brucellen sind unbeweglich.

- Dissoziationsprüfung
  Mit Trypaflavin als Objektträgertest. Mit Kristallviolett: Platte für 15 bis 20 Sek. mit Kristallviolett-Gebrauchslösung fluten: glatte Kolonien nehmen keine Farbe an und sind weiß, raue Kolonien sind rot-violett).

3.2.6 Weiteres Vorgehen

Bakterienstämme mit brucellaähnlichen Eigenschaften (Tabelle 1) sollten mittels einer genusspezifischen PCR identifiziert (siehe Anhang 3) und im positiven Fall einer Bio-und Genotypisierung zugeleitet werden, die auch der Klärung epidemiologischer Fragestellungen dient. Das NRL Brucellose führt solche Untersuchungen durch.
Regelwidrige Stämme können vorkommen. Bei Erstisolierung liegen mitunter Stämme in der R-Form vor, die sich dann bei weiteren Passagen in die S-Form wandeln, besonders bei Isolierung von *B. melitensis* aus der Milch. Rauformen können mit den herkömmlichen Tests nicht komplett biotypisiert werden.

3.3 Antigennachweis

Antigennachweise mittels Latex-Agglutination und ELISA sind beschrieben. Haben sich jedoch in der Routinediagnostik nicht durchgesetzt.
In den letzten Jahren sind vermehrt Nukleinsäuredetektionsmethoden (PCR) im Labor gebräuchlich geworden. Sie sind als Ergänzung zu klassischen bakteriologischen Methoden geeignet, um z. B. verdächtige Kolonien zu überprüfen, eine Erstuntersuchung einer Probe oder weitergehende Typisierungen durchzuführen. Mit der Brucellose-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 17. Mai 2017 (BGBl. I S. 1267, 3060) gilt ein molekularbiologischer Brucellennachweis (*B. melitensis, B. abortus oder B. suis*) als beweisend für einen Brucelloseausbruch. Ein alleiniger Nachweis des Genus *Brucella* ist nicht ausreichend. Entsprechendes Untersuchungsmaterial (DNA-Extrakt) kann an das NRL zur Speziesidentifikation gesendet werden. An eine positive PCR Untersuchung sollte sich eine Erregerisolierung anschließen, um weiterführende Typisierungsuntersuchungen (am NRL) durchführen zu können.

3.4 Antikörpernachweis

3.4.1 Untersuchungsmaterial

- Geeignet sind Blutserum, Plasma, Milch und Milchserum.
- Entnahme möglichst keimarm, um eine lange Haltbarkeit der Proben zu gewährleisten.
- Blutproben sind zur Gerinnung in den ersten 2 bis 3 Std. nach Entnahme bei 18 bis 20 °C und dann kühl aufzubewahren.
- Frosteinwirkung auf Blut führt zu Hämolyse.
- Trübe, verunreinigte, flockige und hämolytische Seren sowie sinnfällig veränderte Milchproben (Kolostralmilch, Mastitissekrete, saure Milch, Eutersekret von altmelkenden und trockenstehenden Tieren) sind für Untersuchungen ungeeignet.

- Die Proben sind auslaufsicher zu verpacken, zu kennzeichnen wie Organmaterial, schnell und frostfrei zu transportieren.

3.4.2 Untersuchungsmethoden

Je nach Untersuchungsziel und Tierart sind in Deutschland folgende serologische Methoden für die staatlich reglementierten Überwachungsuntersuchungen zugelassen (jeweils gültige Fassungen der EU-Richtlinie 64/432/EWG -Rinder und Schweine- vom 24.06.1964, Verordnung 535/2002/EG, Entscheidung der Kommission 2004/226/EG und EU-Richtlinie 91/68/EWG -Schafe und Ziegen- vom 28.01.1991):

Rind

Antikörpernachweis im Blutserum:	RBT, KBR, ELISA, FPA
Antikörpernachweis in der Milch:	ELISA von Einzel- oder Poolproben (Tankmilch)

Schwein

Antikörpernachweis im Blutserum:	RBT, SLA, KBR, ELISA

Schaf und Ziege

Antikörpernachweis im Blutserum:	RBT, KBR

KBR: Komplemtentbindungsreaktion
SLA: Serumlangsamagglutination
RBT: Rose - Bengal – Test
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FPA: Fluoreszenzpolarisationasassay

Ausführungsrichtlinien und Methodenbeschreibungen über die oben angegebenen serologischen Methoden sind gesetzlich geregelt. Bei kommerziellen ELISAs richtet sich die Durchführung nach der beiliegenden Gebrauchsinformation. Es ist zu beachten, dass bei den staatlich vorgeschriebenen serologischen Überwachungsuntersuchungen beim Rind in den gültigen Richtlinien nur Serum als Untersuchungsmaterial benannt ist. Für die Brucellosediagnostik dürfen nur zugelassene Testkits und Antigene (RBT, SLA, KBR) verwendet werden. Für FPA ist derzeit in Deutschland kein zugelassenes Testkit verfügbar.

3.4.3 Durchführung der serologischen Untersuchungsmethoden

siehe Anhang 2

3.4.4 Bewertung der Ergebnisse:

Der Brucella-Antikörpergehalt von Proben und Kontrollseren ist gegenüber einem als internationales Standardserum anerkanntem Rinderserum (OIEISS), das 1000 Internationale Einheiten/ml (SLA) bzw. 1000 Sensibilisierende Einheiten/ml (KBR) enthält, standardisiert und wird in I.E./ml bzw. SensE/ml ausgedrückt. Die Bewertung der ELISAs bei Poolmilchproben orientiert sich an den vom Hersteller mitgelieferten Kontrollen. Die Bewertung der serologischen Ergebnisse wird durch eine Vielzahl von serologischen Kreuzreaktionen, die durch Antigenverwandtschaft mit anderen Erregern, besonders mit Yersinien (Kittelberger *et al.*; 1998), bedingt werden, erschwert.

Tabelle1: Differentialdiagnostische Charakterisierung von Brucellen im Vergleich zu anderen gramnegativen Mikroorganismen (nach Alton *et al.*, 1988)

Tests	Brucella	Bordetella bronchi-septica	Campylo-bacter fetus	Moraxella	Acineto-bac-ter	Yersinia enterocolitica O:9
Morphologie	kleine Kokken	kleine Kokken	Komma förmig	diplo-kokkoid	diplo-kokkoid	Stäbchen
Beweglichkeit bei 37 °C	-	+	+	-	-	-
Beweglichkeit bei 20 °C	-	-	-	-	-	+
Laktose Fermentation auf Mac Conkey Agar	-	-	-	v[a]	v	-
Säure Produktion auf Glukoseagar	- [b]	-	-	-	v	+
Haemolyse auf Blutagar	-	+	-	v	v	-
Katalase	+	+	+	v	+	+
Oxidase	+ [c]	+	+	+	-	-
Urease	+ [d]	+	-	v	v	+
Nitratreduktion	+ [e]	+	+	v	-	+
Zitratverbrauch	-	+	-	-	v	-

[a] Positive und negative Reaktionen innerhalb des Genus
[b] *B. neotomae* kann geringgradig Fermentation zeigen
[c] Mit Ausnahme von *B. ovis*-, *B. neotomae*- und manchmal *B. abortus*-Stämmen, welche negativ sind
[d] Mit Ausnahme von *B. ovis*- und manchmal *B. abortus*-Stämmen, welche negativ sind
[e] Mit Ausnahme von *B. ovis*, welcher nicht Nitrat reduziert

Anhang 1

1) Färbung nach Kister

- Ausstrich fixieren
- Ausstrich mit alkalisierter Safraninlösung* für 1 min. bedecken
- Abspülen mit Wasser
- Präparat kurzzeitig (8 bis 10 Sek.) entfärben in 0,05%iger Schwefelsäure
- Abspülen mit Wasser
- Gegenfärben mit 3%iger wässriger Methylenblaulösung, etwa 8 - 10 Sek.
- Abspülen mit Wasser und Präparat trocknen lassen

*Alkalisierte Safraninlösung:
Unmittelbar vor jeder Färbung frisch herstellen, indem zu 1,5 ml einer 1 molaren KOH-Lösung 5 Tropfen einer 3%igen wässrigen Safraninlösung gegeben werden.

Auswertung: Brucellen färben sich rot an, andere Bakterien und der Untergrund blau.

2) Färbung nach Stamp (modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung)

- Ausstrich hitzefixieren
- Ausstrich mit 1 : 10 verdünntem Karbolfuchsin nach Ziehl-Neelsen* 10 min. bedecken
- Abspülen mit Wasser
- Präparat entfärben in 0,5%iger Essigsäure für 30 Sek.
- Abspülen mit Wasser
- Gegenfärben mit 1%iger Methylenblaulösung, etwa 20 Sek.
- Abspülen mit Wasser und Präparat trocknen lassen

* Karbolfuchsin nach Ziehl-Neelsen, Stammlösung:
1,0 g basisches Fuchsin, gelöst in 10 ml absolutem Alkohol, zu 90 ml 5%iger Phenollösung gegeben

Auswertung:
Brucellen färben sich rot an, andere Bakterien und der Untergrund blau. Auch Coxiellen und Chlamydien färben sich rot an!

3) Blut-Agar

Brucella-Agar mit Zusatz von 5 bis 10 % defibriniertem Blut von Schafen, Pferden, Rindern oder Kaninchen oder:

Bacto-Pepton	10.0 g
Natriumchlorid	5.0 g
Na_2HPO_4 x 12 HO	2.0 g
Fleischextrakt	6.0 g

Aqua dest. ad	1000.0 ml

pH = 7.2

Verwendung:
wie Brucella-Agar, zusätzlich ist die Beurteilung von Hämolyse möglich

4) Brucella-Agar/Bouillon

Trypticase Pepton	10.0 g
Thiotone Pepton	10.0 g
Hefeextrakt	2.0 g
Glucose	1.0 g
Natriumchlorid	5.0 g
Natriumdisulfit	0.1 g
Agar (nicht bei Bouillon)	15.0 g
Aqua dest.	ad 1000.0 ml

pH = 7.0

Verwendung:
Isolierung, Anreicherung und Kultivierung von Brucella-Arten aus klinischem Material und Lebensmitteln (auch Milch und Milchprodukte) Brucella-Agar ist ein sehr gutes Basismedium und wird, auch mit Zusatz von 5 % defibriniertem Schafblut oder Antibiotika-Supplement, breit eingesetzt. Brucella-Agar ist zur Stammaufbewahrung geeignet.

5) Brucella Selektiv-Agar/Selektiv-Bouillon mit Selektiv-Supplement

Polymyxin B	2.500 IE
Bacitracin	12.500 IE
Cyclohexemid	50 mg
Nalidixinsäure	2,5 mg
Nystatin	50.000 IE
Vancomycin	10 mg

Verwendung:
Als Zusatz zum Basismedium zur Hemmung der Begleitflora bei Direktkultivierung und Anreicherung von Brucellen. Die Zusammensetzung des Supplements variiert je nach Hersteller geringgradig.
Je Röhrchen Supplement aseptisch 10 ml Methanol/Aqua dest.-Mischung (50 : 50) zusetzen und 10 - 15 min. bei 37 °C inkubieren. Durch Schütteln vollständig lösen, die Lösung zu 500 ml auf 50 °C abgekühltem Medium geben, mischen und abfüllen.

Achtung:
Das Produkt ist giftig! Sicherheitshinweise beachten!
Das Produkt hat eine kurze Laufzeit, Verfallsdatum beachten!
Das Produkt ist bei 2 bis 8 °C zu lagern!

6) Trypaflavin zur Dissoziationsprüfung

10 mg Trypaflavin (Acriflavin) auf 10 ml aqua dest. Erst unmittelbar vor Gebrauch herstellen.

7) Kristallviolett zur Dissoziationsprüfung

Lösung a):	Kristallviolett 2,0 g abs. Alkohol 20,0 ml
Lösung b):	Ammoniumoxalat 0,8 g Aqua bidest. 80,0 ml
Stammlösung:	Lösungen a) und b) mischen, Haltbarkeit 3 Monate
Gebrauchslösung:	erst unmittelbar vor Gebrauch herstellen Stammlösung 1 : 40 mit Aqua bidest. verdünnen

Anhang 2

A) Arbeitsanleitung zur Durchführung der Serumlangsamagglutination in der Mikro-Methode (SLA)

1. Geräte

- Zentrifuge
- Brutschrank (+37 °C ± 1 °C)
- Kühlschrank (+5 °C ± 3 °C)
- Tiefkühlschrank (-21 °C ± 3 °C)
- Präzisionswaage
- Kolbenhubpipetten (10 µl bis 100 µl, 100 µl bis 1000 µl) nach DIN/ISO 9001
- Mehrkanalkolbenhubpipette nach DIN/ISO 9001
- 8-Kanal-Multistepper (50 µl bis 200 µl) nach DIN/ISO 9001
- Dispenser (10 µl bis 5 ml) nach DIN/ISO 9001
- Combitips nach DIN/ISO 9001

2. Gebrauchsmaterialien

- Reagenzgläser
- Messpipetten DIN 12691, 12695, 12700 (1, 5, 10 ml)
- Messzylinder DIN 12680
- Erlenmeyerkolben DIN 12380, 12385, 12387
- Stehkolben DIN 12347, 12348
- Bechergläser DIN 12331
- Mikrotiterplatten (U-Form, 8x12 cups)
- Pipettenspitzen DIN/ISO 9001
- Reagenzglasständer
- feuchte Kammer
- Antigen, zugel. nach §17c TierSG
- Kontrollserum, positiv, zugel. nach §17c TierSG
- Kontrollserum, negativ, zugel. nach §17c TierSG

3. Chemikalien

- Natriumchlorid p.A. (NaCl)
- Safranin
- Aqua bidest.

4. Rezepturen

4.1. Physiologische NaCl-Lösung

- Natriumchlorid p.A. 8,9 g
- Aqua bidest ad 1000,0 ml
- 20' bei 121 °C autoklavieren, Lagerung bei +5 °C ± 3 °C, Haltbarkeit 6 Monate

4.2. Safranin-Lösung

- Safranin 0,5 g
- Aqua bidest ad 100,0 ml
- Aqua bidest unter ständigem Schwenken dem Safranin zufügen und bis zur vollständigen Lösung rühren, Lagerung bei +22 °C ± 3 °C, Haltbarkeit 12 Monate

4.3. Verdünnungsflüssigkeit

- 1 Tropfen (ca. 50 µl) der 0,5%igen Safranin-Lösung + 20 ml physiologischer NaCl-Lösung

5. Durchführung

5.1. Antigen

Das Antigen ist in der vom Hersteller angegebenen Gebrauchsverdünnung zu verwenden.

5.2. Kontrollsystem

- Kontrollseren: In jedem Ansatz wird ein dem Antigen homologes positives (mit definiertem Titer bzw. Angabe von IE/ml) sowie ein antikörperfreies, d. h. negatives Kontrollserum mitgeführt.
- Antigenkontrolle

5.3. Serumproben und Antigen auf Raumtemperatur erwärmen

5.4. Serumproben und Kontrollseren werden im Reagenzglas 1:5 vorverdünnt

5.5. Ansatz

In der folgenden Tabelle werden die Arbeitsschritte für eine Probenuntersuchung dargestellt:

		Cup							Anti-gen-Kon-trolle
Arbeitsschritte		1	2	3	:	:	:	11	12
1. NaCl-Lösg.	(µl)	-	50	50	:	:	:	50	50
2. Serum-Verd. 1:5	(µl)	100	-	-	:	:	:	-	-

3. Titration des Serums von 1 nach 11 durch Übertragung von 50 El der Serumverdünnung, 50 El Serumverdünnung der Reihe 11 verwerfen

4. Antigen-Gebrauchsverd.	(µl)	50	50	50	:	:	:	50	50

6. Ablesen der Reaktionen

- Positive Reaktion → Bildung eines auf dem Boden gleichmäßig verteilten, mitunter an den Rändern leicht eingerolltes Agglutinat
- Negative Reaktion → eindeutige Knopfbildung des Antigens
- Positive Kontrolle → muss dem angegebenen Titer entsprechen (+/- eine Titerstufe) bzw. dient der Berechnung der IE/ml der zu untersuchenden Probe
- Negative Kontrolle → in jeder Serumverdünnung muss eine eindeutige Knopfbildung erkennbar sein
- Antigenkontrolle →eindeutige Knopfbildung

7. Bewertung

SLA ± 30 IE/ml

8. Validierung

durch Einsatz des 2. International Standard anti-Brucella abortus Serum (ISabS) und Übersetzung der Ergebnisse in Internationale Einheiten (IE)

B) Arbeitsanleitung zur Durchführung der Komplementbindungsreaktion in der Mikro-Methode Brucellose (KBR)

Alle Reagenzien sind kommerziell erhältlich und sollten möglichst aus einer Hand bezogen werden. Falls eigene Reagenzien verwendet werden, müssen sie gegeneinander titriert werden, um die geeigneten Verdünnungen bestimmen zu können.

1. Materialien und Reagenzien

Brucellose Antigen für die Komplementbindungsreaktion, zugel. nach § 17c TierSG (z. B. IDEXX Europe B.V., Zul.-Nr. BFAV-B 371)
Kontrollserum, positiv, zugel. nach § 17c TierSG (z. B. IDEXX Europe B.V., Zul.-Nr. BFAV-K 076)

Kontrollserum, negativ
Komplement (Institut Virion/ Serion GmbH, Würzburg).
Ampozeptor (Institut Virion/ Serion GmbH, Würzburg).
KBR-Puffer (Institut Virion/ Serion GmbH, Würzburg).
Hammelblut (z. B. stabilisierte 1%ige Suspension, Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH, Ochsenhausen).
Mikrotiterplatten

Bei der Verwendung kommerzieller KBR Reagenzien ist die Gebrauchsanweisung des Herstellers zu beachten.

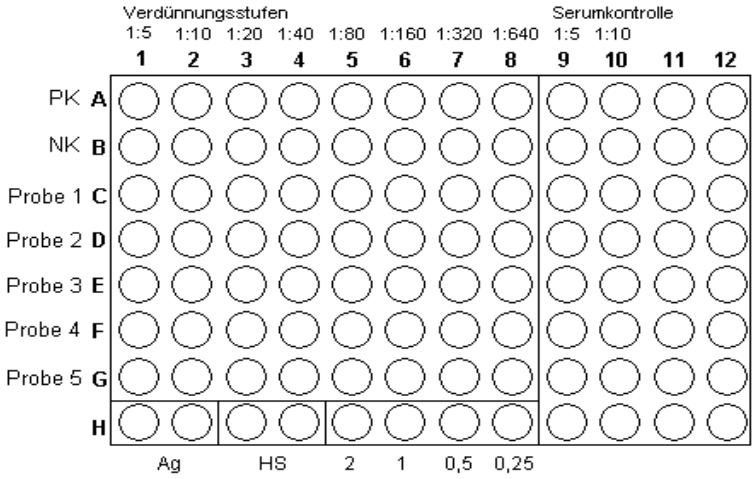
Inaktivierung der Seren
Vor der Untersuchung sind alle zu untersuchenden Proben einschließlich Kontrollseren im Wasserbad in entsprechender Verdünnung wie folgt zu inaktivieren:

	Serum-verdünnung	Tierart	Temp. (AC)	Zeit (min)
B.abortus/ B.melitensis/ B.suis	1 : 5	Rd., Pfd.,	56 - 60	30 - 50
		Meerschw.,		
		Wildwdk., Hasen,		
		Schaf, Ziege,	60 - 63	30
		Schwein, Wildschwein	60	30 - 50
B. ovis	1 : 5 und 1 : 10	Schafe	60 - 63	30

Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

Verunreinigte und hämolytische Seren sind zur Untersuchung nicht geeignet.
Beispiel für die Einteilung und Beschriftung der Mikrotiterplatte:

KBR-Platte



Ansatz

In der Tabelle werden die Arbeitsschritte für die Probenuntersuchung dargestellt.

		Cup									
			(Probenverdünnung)					(Serumkontrollen)			
Arbeitsschritte		**1**	**2**	**3**	**:**	**:**	**:**	**10**	**|**	**11**	**12**
1. Puffer	(µl)	-	25	25	:	:	:	25	|	-	25
2. Serum	(µl)	25	25	-	:	:	:	-	|	25	25

3. Titration des Serums von 1 nach 10 und von 11 nach 12 durch Übertragen von 25 µl und verwerfen von 25 µl aus den Cups 10 und 12

4. Puffer	(µl)	-	-	-	:	:	:	-	|	25	25
5. Antigen	(µl)	25	25	25	:	:	:	25	|	-	-
6. Komplement	(µl)	25	25	25	:	:	:	25	|	25	25

7. Kältebindung: abgedeckte Platte 18 - 24 Stunden bei 5°C +/-3°C inkubieren, danach zusammen mit dem frisch hergestellten hämolytischen System 15 min bei 37 °C im Brutschrank inkubieren

8. HS	(µl)	50	50	50	:	:	:	50	|	50	50

9. Inkubation erfolgt 30 min bei 37 °C +/-1 °C in einer feuchten Kammer im Brutschrank oder im Wasserbad

10. Mikrotiterplatte 5 min bei 2500 x g zentrifugieren

Kontrollsystem und Interpretation der Ergebnisse

Das Ablesen der Reaktionsstärken je Verdünnungsstufe erfolgt nach dem Grad der Hämolyse und der Größe des Erythrozytensedimentes (Knopfbildung) im Vergleich zur Kontrolle des Hämolytischen Systems:

- 100 % Hämolyse = negativ, 0 % Erythrozytensediment
- 75 % Hämolyse = 1+, 25 % Erythrozytensediment
- 50 % Hämolyse = 2+, 50 % Erythrozytensediment
- 25 % Hämolyse = 3+, 75 % Erythrozytensediment
- 0 % Hämolyse = 4+, 100 % Erythrozytensediment

Bei jeder Untersuchung sind folgende Kontrollansätze mitzuführen:

- **Serumkontrolle** = Kontrolle der antikomplementären Wirkung <u>jedes</u> Serum angesetzt in den beiden Anfangsverdünnungen (Cup 11 und 12)

  25 µl Serumverdünnung
  + 25 µl VBD
  + 25 µl Komplement
  + 50 µl HS

  <u>Bewertung</u>: 100 % Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment

- Kontrolle des Antigens (mind. 2 Cups)

  25 µl VBD
  + 25 µl Antigen
  + 25 µl Komplement
  + 50 µl HS

  <u>Bewertung</u>: 100 % Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment

- Kontrolle des Komplements (mind. 2 Cups)

  50 µl VBD
  + 25 µl Komplement
  + 50 µl HS

  <u>Bewertung</u>: 100 % Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment

<u>oder</u>

Ansatz einer Verdünnungsreihe der Komplementsgebrauchslösung (4 Cups):

- in Cup 2 - 4 (s. o. Beispiel Cup 6 - 8)

  25 µl VBD
- in Cup 1 u. 2 (s. o. Beispiel Cup 5 u. 6)

  25 µl Komplement
- von Cup 2 - 4 25 µl überpipettieren und 25 µl von Cup 4 verwerfen

Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

- auf alle Cups:
  25 ml VBD
  + 25 µl Antigen
  + 50 µl HS geben → entspricht 2, 1, 0,5 und 0,25 Komplementeinheiten (KE)

Bewertung 2 u. 1 KE: 100 % Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment
Bewertung 0,5 u. 0,25 KE: 0 % Hämolyse, 100 % Erythrozytensediment

- Kontrolle des Hämolytischen Systems (HS)
  75 µl VBD
  + 50 µl HS

Bewertung: 0 % Hämolyse, 100 % Erythrozytensediment

Der Ansatz der Kontrollseren erfolgt wie bei den Serumproben, es wird auch eine Serumkontrolle mitgeführt.

- Positives Kontrollserum

Bewertung: muss dem angegebenen Titer entsprechen bzw. dient der Berechnung der Sensibilisierenden Einheiten pro ml (Sens.E./ml) der zu untersuchenden Probe.

- Negatives Kontrollserum
  Bewertung: 100 % Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment

Der Gehalt an komplementbindenden Antikörpern in einem Serum ist in Sensibilisierungseinheiten pro ml auszudrücken.

Gem. EU-Richtlinie und OIE Manual gelten für Rinder, Schweine, Schafe und kleine Wiederkäuer Seren, die > 20 Sens.E./ml enthalten, als positiv.

Die Bewertung der KBR-Ergebnisse erfolgt durch Berechnung oder Ablesen der Internationalen KBR Einheiten (ICFT)/ml Serum im Vergleich zu einem Referenzserum (kommerziell erhältlich).

Berechnung der ICFTU/ml:
siehe Alton *et al.*, 1988: techniques for the brucellosis laboratory

$$\frac{angegebene\,\frac{ICFTU}{ml}\,des\ RS^{*}}{Titer\ des\ RS\ in\ durchgef\ddot{u}hrter\ KBR} \times\ Titer\ der\ Serumprobe\ = \frac{ICFTU}{ml}(Serumprobe)$$

$RS*$ ...Referenzserum

Tabelle: gerundete ICFTU/ml bei unterschiedlichen Titern und Graden der Hämolysehemmung

	Hämolysehemmung			
Titer Serum	25,00 %	50,00 %	75,00 %	100,00 %
1/2	8,3	10	11,6	13,3
1/4	16,6	***20***	23,3	26,6
1/5	20,8	25	29	33,25
1/8	33,3	40	46,6	53,3
1/10	41,6	50	58	66,5
1/16	66,6	80	93,3	107
1/20	83,2	100	116	133,0
1/32	133	160	187	213
1/40	166	200	232	266,0
1/64	267	320	373	427
1/80	332	400	464	532,0
1/128	533	640	747	853
1/160	664	800	928	1064,0
1/256	1067	1280	1493	1707
1/320	1328	1600	1856	2128,0

Bewertung: 20 Sens. E./ml = positiv

C) Arbeitsanleitung zur Durchführung des Rose-Bengal-Tests (RBT)

1. Geräte

- Zentrifuge
- Kühlschrank (+5 °C ± 3 °C)
- Tiefkühlschrank (-21 °C ± 3 °C)
- Kolbenhubpipetten (10 µl - 100 µl) nach DIN/ISO 9001
- Tafelwaage

2. Gebrauchsmaterialien

- Tüpfelplatten (eben oder mit Vertiefungen)
- Glasstäbe
- Pipettenspitzen nach DIN/ISO 9001
- RBT-Antigen, zugel. nach § 17c TierSG
- Brucellose-Kontrollserum, positiv, zugel. nach §17c TierSG
- Brucellose-Kontrollserum, negativ, zugel. nach §17c TierSG

3. Durchführung

3.1. Kontrollsystem

In jedem Ansatz wird ein Brucellose-Kontrollserum, positiv, und ein Brucellose-Kontrollserum, negativ, mitgeführt. Resuspendierte Seren können portioniert bei -21 °C ± 3 °C gelagert werden.

3.2. Serumproben und Antigen auf Raumtemperatur erwärmen

3.3. Übertragen von Serum auf Tüpfelplatten: 25 µl auf Platten mit Vertiefung, 30 µl auf ebene Platten

3.4. 25 µl bzw. 30 µl Antigen jedem Serum hinzufügen. Das Volumen des Antigens muss dem Volumen des Serums entsprechen.

3.5. Serum und Antigen mit Glasstab mischen

3.6. Serum-Antigen-Gemisch 4' kreisend schwenken

4. Ablesen der Reaktionen

- Positive Reaktion → Bildung von Agglutinaten jeder Reaktionsstärke innerhalb der Beobachtungszeit
- Negative Reaktion → Serum-Antigen-Gemisch bleibt innerhalb der Beobachtungszeit homogen rot gefärbt
- Positive Kontrolle → Agglutination
- Negative Kontrolle → Serum-Antigen-Gemisch bleibt innerhalb der Beobachtungszeit homogen rot gefärbt

Brucella abortus-Antigen für die SLA, kommerziell erhältlich

Brucella abortus-Antigen für die KBR, kommerziell erhältlich

Brucellose-Kontrollserum, positiv, kommerziell erhältlich
RBT-Antigen, kommerziell erhältlich
Zusätzlich wird vom FLI ein positives und ein negatives Nationales Referenzserum für Brucellose bereitgestellt, welches zur laborinternen Methodenkontrolle eingesetzt werden soll.

Nähere Auskünfte:
FLI, NRL Brucellose, Naumburger Str. 96a, D-07743 Jena
Tel.: +49 (0)3641 804 2466

Anhang 3

A) Nachweis von *Brucella* spp. genusspezifischer DNA mittels konventioneller PCR aus Kulturmaterial (nach Baily *et al.*, 1992)

1. Arbeitsvorschrift

1.1. Material

Verdächtige Kolonie direkt von Platte picken und in Eppendorf-Tube in ca. 200 µl PCR-Grade Wasser einbringen und für 2 h bei 90 °C im Thermoschüttler schütteln (Abtötung und Zellaufschluss)

Tabelle 1:

Primer	Nukleotidsequenz 5'-3'
B4	TGG-CTC-GGT-TGC-CAA-TAT-CAA
B5	CGC-GCT-TGC-CTT-TCA-GGT-CTG

Tabelle 2:

PCR Mastermix	**Je Probe**	Thermocycler-Programm
Wasser	18,3 µl	93 °C 5 min, 35 x (90 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min), 72 °C 5 min
10x PCR-Puffer	2,5 µl	
dNTP 10mM	1 µl	
Primer B4 10 pmol/µl	1 µl	
Primer B5 10 pmol/µl	1 µl	
Taq-DNA-Polymerase 5U/µl	0,2 µl	
Template	1 µl	

1.2. Ergebnis und Kontrolle

Bei jedem Ansatz wird eine Negativkontrolle (Wasser statt DNA) und mind. eine Positivkontrolle (DNA von Referenzstamm) mitgeführt.

Die Analyse der PCR- Produkte erfolgt nach ihrer Größe (siehe Tabelle 3) in einem 1,5%igen Agarose-Gel.

Tabelle 3:

	Größe des Fragmentes	Ergebnis
B4/B5	223 bp	*Brucella* ssp. nachgewiesen

Die Positivkontrollen (z. B. von *B.microti*) müssen positiv entsprechend ausfallen, die Negativkontrolle bei der PCR muss negativ sein.

B) Nachweis von *Brucella* spp. genusspezifischer DNA und *B. abortus* sowie *B. melitensis* spezifischer DNA mittels realtime Multiplex-PCR (Taqman-System)

Beispiel für Konfiguration Realtime PCR (nach Probert *et al.*, 2004)

Reagens	5'-3' Sequenz	Gebrauchslösung	Endkonzentration	µl/1x
Wasser				7,75
2x uMM Buffer	z. B. Taqman Environmental Master Mix 2.0	2x	1x	12,5
B. ssp.F	GCTCGGTTGCCAATATCAATGC	10 µM	0,2 µM	0,5
B.ssp R	GGGTAAAGCGTCGCCAGAAG	10 µM	0,2 µM	0,5
B.ssp P	FAM-AAATCTTCCACCTTGCCCTTGCCATCA-BHQ-1	10 µM	0,1 µM	0,25
B.ab F	GCGGCTTTTCTATCACGGTATTC	10 µM	0,2 µM	0,5
B.ab R	CATGCGCTATGATCTGGTTACG	10 µM	0,2 µM	0,5
B.ab P	HEX-CGCTCATGCTCGCCAGACTTCAATG-BHQ-1	10 µM	0,1 µM	0,25
B.mel F	AACAAGCGGCACCCCTAAAA	10 µM	0,2 µM	0,5
B.mel R	CATGCGCTATGATCTGGTTACG	10 µM	0,2 µM	0,5
B.mel P	Cy5-CAGGAGTGTTTCGGCTCAGAATAATCCACA-BHQ-2	10 µM	0,1 µM	0,25

Verdächtige Kolonie direkt von Platte picken und in Eppendorf-Tube in ca. 200 µl PCR-Grade Wasser einbringen und für 2 h bei 90 °C im Thermoschüttler schütteln (Abtötung und Zellaufschluss), kann direkt als PCR-Template eingesetzt werden. DNA-Isolierung aus originalen Gewebeproben mit kommerziellen Kits (z. B. High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche) entsprechend den Hinweisen der Hersteller. Bei Untersuchungen aus Gewebeproben immer eine interne Kontrolle mitführen.

	Temperatur °C	Dauer	Zyklen
Dekontamination	50	2 min	1
Initiale Denaturierung	95	10 min	1
Denaturierung	95	25 sek	40
Annealing/Elongation	57	1 min	

Literatur

- Alton, G.G., L.M. Jones, R.D. Angus, J.M. Verger (1988): Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institute National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris.

- Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG.: Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification. J Trop Med Hyg. 1992 Aug; 95(4):271-5.

- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Stand Mai 2016) http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf

- Probert, W.S., K. N. Schrader, N. Y. Khuong, S. L. Bystrom, M. H. Graves (2004): Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of Brucella spp., B. abortus, and B. melitensis. J. Clin. Microbiol. 42: 1290-1293

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald – Insel Riems, www.fli.de