

Amtliche Methode und Falldefinition

Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode	3
1. Charakterisierung der Infektion	3
1.1 Erreger	3
1.2 Klinische Symptomatik	3
1.3 Differentialdiagnose	4
1.4 Diagnostische Indikation	4
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung	4
1.6 Rechtsgrundlagen.....	4
2. Untersuchungsmaterial	5
3. Untersuchungsgang	6
3.1 Vorsichtsmaßnahmen	6
3.2 Erregernachweis	6
3.3 Antigennachweis.....	10
3.4 Antikörpernachweis	10
Anhang 1	14
Anhang 2	17
Anhang 3	27
Literatur	29
Falldefinition - Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen; <i>B. abortus</i>, <i>B. suis</i>, <i>B. melitensis</i>	30

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

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

Spezies klassisch	Spezies alternativ*	Hauptwirt (bisher bekannt)	TRBA 466*** Risikogruppe
<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i> biovar melitensis*	Schaf und Ziege	3
<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i> biovar melitensis*	Rind	3
<i>B. suis</i>	<i>B. melitensis</i> biovar suis*	Schwein	3
<i>B. ovis**</i>	<i>B. melitensis</i> biovar ovis*	Schaf	3
<i>B. canis</i>	<i>B. melitensis</i> biovar canis*	Hund	3
<i>B. neotomae</i>	<i>B. melitensis</i> biovar neotomae*	Wüstenratte	3
<i>B. microti</i>		Feldmaus	2
<i>B. ceti</i>		Delphin	2
<i>B. pinnipedialis</i>		Robbe	2
<i>B. inopinata</i>		?	3
<i>B. papionis</i>		Pavian	2
<i>B. vulpis</i>		Fuchs	Keine Einstufung

* Von vielen Experten wird *Brucella melitensis* als eine Spezies betrachtet, die in weitere biovarie aufgegliedert werden kann. Dies wird durch Daten aus Genomanalysen und Sequenzvergleichen gestützt.

** *Brucella ovis* ist der Erreger der ebenfalls anzeigepflichtigen [Infektiösen Epididymitis](#) (Ovine Epididymitis).

*** 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.

Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

1.3 Differenzialdiagnose

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, Naumburger-Str. 96a, 07743 Jena, Tel: 03641 804 2466, Fax: 03641 804 2228.

1.6 Rechtsgrundlagen

- Verordnung (EU) 2016/429 vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- Delegierte Verordnung (EU) 2018/1629 vom 25.7.2018 zur Änderung der Liste der Seuchen in Anhang II der Verordnung (EU) 2016/429 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 vom 2.12.2018 über die Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 vom 17.12.2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften betreffend Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen
- DELEGIERTE VERORDNUNG (EU) 2020/687 vom 17.12.2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für die Prävention und Bekämpfung bestimmter gelisteter Seuchen
- DELEGIERTE VERORDNUNG (EU) 2020/688 vom 17. 12. 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Tiergesundheitsanforderungen an Verbringungen von Landtieren und Bruteiern innerhalb der Union
- DELEGIERTE VERORDNUNG (EU) 2020/686 vom 17. 12. 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates betreffend die Zulassung von Zuchtmaterialbetrieben sowie

die Anforderungen an die Rückverfolgbarkeit und die Tiergesundheit in Bezug auf Verbringungen innerhalb der Union von Zuchtmaterial von bestimmten gehaltenen Landtieren

- Brucellose-Verordnung in der jeweils geltenden Fassung (Teile, die nicht durch die Verordnung 2016/429 und zugehörige Delegierte Vverordnungen und Durchführungsverordnungen bereits geregelt sind)
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen 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:

Blutproben:

Serum für RBT, SLA, KBR, ELISA

Plasma nur für ELISA oder FPA (wenn in der jeweiligen Gebrauchsanweisung vorgesehen)

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.

Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

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*, *B. neotomae* und *B. inopinata* 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 Schutzstufe 3 durchgeführt werden. Bei allen Arbeiten sind entsprechende Sicherheitsvorkehrungen einzuhalten. *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. papionis* und *B. microti* sind in die Risikogruppe 2 eingestuft und können in entsprechenden Laboren bearbeitet werden. *B. vulpis* ist bisher in keine Risikogruppe eingestuft worden, sollte aber ebenfalls in Laboratorien mindestens der Schutzstufe 2 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.
- Differenzialdiagnose:** 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, Vaginalsekret
- 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 Anzucht 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 Anzucht 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.

Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

Flüssige Anreicherungsmedien

Brucella-Bouillon, ohne Hemmstoffzusatz

Selektiv-Bouillon, mit Hemmstoffzusatz

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

3.2.4 Bebrütung

- Bebrütung unter mikroaerophilen Bedingungen (5 bis 10 Vol% CO₂) bei einer Temperatur von 37 °C (aerobe Bedingungen können zusätzlich gewählt werden, wenn eine Phänotypisierung bis zur Biovar durchgeführt werden soll)
- Agarplatten mindestens fünf bis maximal 21 Tage bebrüten, erste Ablesung nach ein bis zwei Tagen.
- Flüssiganreicherungen mindestens zehn Tage (bis sechs 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 zwei bis drei 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 sieben 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 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 rotviolett).

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.

Brucella-Isolate können mit MALDI-TOF MS identifiziert werden, wenn entsprechende Referenzspektren in der Datenbank vorhanden sind. Die Präparation erfolgt mit dem Ethanol-Extraktionsverfahren (entsprechend dem Protokoll der Fa. Bruker Daltonics). Nach 20 min in Ethanol sind die Brucellen abgetötet und die übliche Präparation kann gefahrlos erfolgen. Das Picken und das direkte Auftragen der Kolonien auf das Target werden nicht empfohlen.

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.

Gesamtgenomsequenzierung und Bioinformatik

Gesamtgenomsequenzierung mit anschließender bioinformatischer Datenanalyse ist in vielen Ländern bereits Standard bei der isolatbasierten Feintypisierung, Ausbruchsanalysen und phänotypischer Charakterisierung von Brucellen. Zur Sequenzierung bietet sich die Illumina Plattform an. DNA-Isolation und Erstellung von Libraries sollte nach Herstellerangaben durchgeführt werden. Die Datenanalyse beginnt mit einer Qualitätskontrolle. Dabei sollten 70 % der Basen einer Probe einen Qualitätswert (Phred Score) von mindestens 30 aufweisen. Quantitativ sollte eine Coverage von mindestens 30 angestrebt werden, wobei mindestens 70 % der Reads taxonomisch dem Genus *Brucella* zugeordnet werden sollten. In der Datenanalyse folgt nun meist die Assemblierung der Reads zur Vorhersage von Contigs. Hier bieten sich Verfahren basierend auf der Software SPAdes (Bankevich et al., 2012) an. Die assemblierten Genome sollten eine Größe von 3,3 MB und einen N50-Wert von 15 kB aufweisen. Die Feintypisierung auf Grundlage von assemblierten Genomen erfolgt mit dem Programm CanSNPer (Lärkeryd et al., 2014) und basiert auf vordefinierten kanonischen Einzelnucleotidänderungen (SNPs). Außerdem haben sich Verfahren basierend auf Kerngenom-MLST etabliert. Hier bietet sich die kostenfreie Software ChewBBACA (Silva et al., 2018) oder die lizenzierte Software Ridom SeqSphere+ (Jünemann et al., 2013) an.

Ein cgMLST-Schema, wie es zur Genotypisierung von *Brucella*-Ausbruchsisolaten verwendet werden kann, ist mit dem NRL entwickelt und publiziert worden (Abdel-Glil et al., 2022). Eine linuxbasierte Pipeline zur automatischen Analyse von Gesamtgenomdaten für *B. melitensis*, *B. abortus* und *B. suis* ist unter https://gitlab.com/FLI_Bioinfo/WGSBAC kostenfrei verfügbar.

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 Kulturen 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 zwei bis drei Stunden 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 (Kolos-tralmilch, Mastitissekrete, saure Milch, Eutersekret von altmelkenden und trockenstehenden Tieren) sind für Untersuchungen ungeeignet.
- Die Proben sind auslaufsicher zu verpacken, wie Organmaterial zu kennzeichnen und schnell und frostfrei zu transportieren.

3.4.2 Untersuchungsmethoden

Auf der Basis der jeweils gültigen Fassung der Delegierten Verordnung (EU) 2020/689 vom 17. Dezember 2019) sind nach Anhang III Abschnitt 1 folgende Diagnosemethoden für die Gewährung und Aufrechterhaltung des Status „seuchenfrei“ für Infektionen mit *Brucella abortus*, *B. melitensis* und *B. suis* vorgesehen:

Serologische Tests

Für Blutproben zur Verfügung stehende Untersuchungen

- gepufferter Brucella-Antigen-Test (RBT)
- Komplementbindungstest (CFT)
- indirekter Enzymimmunoassay (I-ELISA)
- Fluoreszenz-Polarisations-Assay (FPA)
- kompetitiver Enzymimmunoassay (C-ELISA)

Für Milchproben zur Verfügung stehende Untersuchungen

- Milch-Ring-Test (MRT)
- I-ELISA

Ausführungsrichtlinien und Methodenbeschreibungen über die oben angegebenen serologischen Methoden sind gesetzlich geregelt. Bei kommerziellen ELISAs richtet sich die Durchführung nach der beiliegenden Gebrauchsinformation. Für die Brucellosediagnostik dürfen nur zugelassene Testkits und Antigene verwendet werden. Für FPA, C-ELISA und MRT sind derzeit in Deutschland keine zugelassenen Testkits bzw. Antigene (MRT) 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.

Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

Tabelle 1: Differentialdiagnostische Charakterisierung von Brucellen im Vergleich zu anderen gramnegativen Mikroorganismen (nach Alton et al., 1988)

Tests	Brucella	Bordetella bronchiseptica	Campylobacter fetus	Moraxella	Acinetobacter	Yersinia enterocolitica O:9
Morphologie	kleine Kokken	kleine Kokken	Kommaförmig	diplokokkoid	diplokokkoid	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.

3.5 Antibiotikaresistenz-Testung

§ 12d TÄHAV legt fest, dass die Empfindlichkeit eines bakteriellen Isolats gegen antibiotisch wirksame Substanzen nach national oder international anerkannten Verfahren zu erfolgen hat, falls diese verfügbar sind. Anerkannte Standards zur Durchführung der Empfindlichkeitstestung stellen sicher, dass die für einzelne Substanzen ermittelten Konzentrationswerte, bei denen Wachstumshemmung auftritt, zwischen Laboren vergleichbare Resultate ergeben.

Die Antibiotika-Empfindlichkeitstestung kann z.B. mittels Antibiotika-MHK-Teststreifen durchgeführt (MHK = minimale Hemmkonzentration = MIC; minimal inhibitory concentration).

Etest Streifen bieten eine einfachere Methode für die MIC-Bestimmung als das Mikrodilutionsverfahren und können auch unter S3 Bedingungen durchgeführt werden. Etests bestehen aus einem Plastikstreifen, der mit einem Gradienten antimikrobieller Imprägnierung (mit einem MIC-Bereich von 15 zweifachen Verdünnungen) imprägniert ist. Sobald es auf eine Isolat-beimpfte Agarplatte aufgebracht ist, diffundiert das antimikrobielle Mittel und führt zu einem stabilen Konzentrationsgradienten im Medium. Nach der Inkubation der Kultur erscheint eine Hemmhofelypse. Diese berührt die MHK-Skala bei der Konzentration, bei der das getestete Antibiotikum das Bakterienwachstum hemmt. Dieser Wert stellt den MHK bzw. MIC-Wert dar.

Derzeit gibt es keine von der EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) festgelegten MIC-Werte für Brucellen. Eine antibiotische Behandlung von mit *B. melitensis*, *B. abortus* oder *B. suis* infizierten Tieren ist nicht vorgesehen. Sollte im Einzelfall eine Antibiotikaresistenz-Testung eines Isolates sinnvoll und notwendig sein, so bietet das NRL an, diese Untersuchung nach Absprache (z.B. hinsichtlich auf die zu untersuchenden Antibiotika) am FLI durchzuführen. Die derzeit etablierte Methode stützt sich auf die Publikation Tscherne et al. (2022).

Anhang 1

1) Färbung nach Kister

- Ausstrich fixieren
- Ausstrich mit alkalischer 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 ₂ HPO 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 Stamm-aufbewahrung geeignet.

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

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

Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

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 bis 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. ver-
dünnen

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.

Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

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
---------------------------------	--------	------	------	------	-----	-----	-----	------	------

5.6. Inkubation der Platte 20 bis 24 Stunden bei 37°C +/-1°C im Brutschrank in der feuchten Kammer

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)

Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

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).

Ambozeptor (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:

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

Verunreinigte und hämolytische Seren sind zur Untersuchung nicht geeignet.

Beispiel für die Einteilung und Beschriftung der Mikrotiterplatte:

KBR-Platte

		Verdünnungsstufen								Serumkontrolle			
		1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:5	1:10		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PK	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
NK	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Probe 1	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Probe 2	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Probe 3	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Probe 4	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Probe 5	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		Ag	HS		2	1	0,5	0,25					

Ansatz

In der Tabelle werden die Arbeitsschritte für die Probenuntersuchung dargestellt.

Arbeitsschritte		Cup									
		(Probenverdünnung)						(Serumkontrollen)			
		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

Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

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 (HS):

- 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 jedes Serums angesetzt in den beiden Anfangsverdünnungen (Cup 11 und 12)

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

Bewertung: 100 % Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment

- Kontrolle des Antigens (mind. 2 Cups)

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

Bewertung: 100 % Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment

- Kontrolle des Komplements (mind. 2 Cups)

- 50 µl VBD
- + 25 µl Komplement
- + 50 µl HS

Bewertung: 100 % Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment

oder

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

- 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 (ICFTU)/ml Serum im Vergleich zu einem Referenzserum (kommerziell erhältlich).

Berechnung der ICFTU/ml:

siehe Alton *et al.*, 1988: techniques for the brucellosis laboratory

$$\frac{\text{angegebene } \frac{\text{ICFTU}}{\text{ml}} \text{ des RS}^*}{\text{Titer des RS in durchgeführter KBR}} \times \text{Titer der Serumprobe} = \frac{\text{ICFTU}}{\text{ml}} (\text{Serumprobe})$$

RS*...Referenzserum

Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

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

Titer Serum	Hämolysehemmung			
	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

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.

2. Serumproben und Antigen auf Raumtemperatur erwärmen

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

4. 25 µl bzw. 30 µl Antigen jedem Serum hinzufügen. Das Volumen des Antigens muss dem Volumen des Serums entsprechen.

5. Serum und Antigen mit Glasstab mischen

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 der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

Brucellose-Kontrollserum, positiv, kommerziell erhältlich

RBT-Antigen, kommerziell erhältlich

Zusätzlich wird vom FLI ein positives und ein negatives ationales 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	<i>Brucella</i> ssp. nachgewiesen

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

Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen

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	GGGTAAGCGTCGCCAGAAG	10 µM	0,2 µM	0,5
B. ssp P	FAM-AAATCTCCACCTTGCCCTTGCCATCA-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
- Tscherne, A.; Mantel, E.; Boskani, T.; Budniak, S.; Elschner, M.; Fasanella, A.; Feruglio, S.L.; Galante, D.; Giske, C.G.; Grunow, R.; Henczko, J.; Hinz, C.; Iwaniak, W.; Jacob, D.; Kedrak-Jablonska, A.; Jensen, V.K.; Johansen, T.B.; Kahlmeter, G.; Manzulli, V.; Matuschek, E.; Melzer, F.; Nuncio, M.S.; Papa-paraskevas, J.; Pelerito, A.; Solheim, M.; Thomann, S.; Tsakris, A.; Wahab, T.; Weiner, M.; Zoeller, L.; Zange, S., on behalf of the EMERGE AST Working Group. Adaptation of Brucella melitensis Antimicrobial Susceptibility Testing to the ISO 20776 Standard and Validation of the Method. Microorganisms 2022, 10, 1470.

Falldefinition - Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen; *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*

Klinisches Bild

Infektionskrankheit. Typische Verlaufsform: enzootischer Abort. Hauptsymptome: Aborte, Frühgeburten oder die Geburt toter, lebensschwacher und unterentwickelter Tiere, später Gelenkentzündungen (Lahmheiten), selten Euterentzündungen, bei männlichen Tieren (einseitige) Hoden- und Nebenhodenentzündungen, Gelenkentzündungen (Lahmheiten), Bildung von Abszessen

Inkubationszeit: variabel, zwei Wochen bis mehrere Monate

Labordiagnostischer Nachweis

Positiver Befund mit mindestens einer der folgenden Methoden:

Erregernachweis:

- Kulturell: Anzucht aus Abortmaterial (Fetus), Eihäuten, Milch, Sperma und anderen Geweben mit anschließendem Speziesnachweis
- Molekularbiologischer oder mikroskopischer Erregernachweis: PCR, Immunfluoreszenztest
- Indirekter Nachweis (Delegierte Verordnung 2020/689: Anhang III, Abschnitt 1): spezifischer Antikörpernachweis aus Blut oder Milch (ELISA, KBR, RBT,, FPA, MRT)

Zusatzinformation:

Differenzialdiagnose

Serologische Kreuzreaktionen mit mindestens folgenden Bakterien: *Yersinia enterocolitica* O9, *Escherichia coli* O157, Salmonellen mit O30-Antigen

Epidemiologischer Zusammenhang

Kontakt mit einem labordiagnostisch nachgewiesenen infizierten Tier oder seinen Ausscheidungen oder orale Aufnahme seiner Produkte (z. B. Rohmilch)

Voraussetzung für den Verdacht

Nach Artikel 9 der Delegierten Verordnung 2020/689 gelten folgende Kriterien für die Definition „Verdachtsfall“:

- a) klinische Untersuchungen, Nekropsieuntersuchungen oder Laboruntersuchungen haben ergeben, dass klinische Anzeichen, Post-mortem-Läsionen oder histologische Befunde für diese Seuche sprechen,
- b) die Ergebnisse einer Diagnosemethode an einer Probe von einem Tier oder einer Gruppe von Tieren deuten auf die wahrscheinliche Präsenz der Seuche hin, oder

c) ein epidemiologischer Zusammenhang mit einem bestätigten Fall wurde festgestellt.

Folgende Kriterien gelten für die Definition „bestätigter Fall“:

- a) der Seuchenerreger, mit Ausnahme von Impfstämmen, wurde bei einer Probe von einem Tier oder einer Gruppe von Tieren isoliert,
- b) spezifische Antigene oder Nukleinsäuren des Seuchenerregers, die nicht infolge einer Impfung aufgetreten sind, wurden in einer Probe von einem Tier oder einer Gruppe von Tieren nachgewiesen, die klinische Anzeichen für die Seuche oder einen epidemiologischen Zusammenhang mit einem Verdachtsfall oder bestätigten Fall aufweisen, oder
- c) eine indirekte Diagnosemethode an einer Probe von einem Tier oder einer Gruppe von Tieren, die klinische Anzeichen für die Seuche oder einen epidemiologischen Zusammenhang mit einem Verdachtsfall oder bestätigten Fall aufweisen, hat zu einem positiven Ergebnis geführt, das nicht die Folge einer Impfung ist.

Die Kommission hat sich zu den obengenannten Definitionen nochmals in einem öffentlichen Vortrag erläuternd geäußert. Darin heißt es:

Die Bestätigung einer Krankheit gemäß ihrer Falldefinition liegt in der Verantwortung der zuständigen Behörde. Vermeiden Sie die automatische Einstufung von "falsch-positiven Tests als bestätigter Fall ausschließlich auf der Grundlage von Laborergebnissen (außer Isolierung). Die Herstellung eines epidemiologischen Zusammenhangs erfordert die aktive Beteiligung der zuständigen Behörde und kann festgestellt werden, wenn die Krankheit bei Wildtieren bekannt ist. Ein positiver Test führt (oder kann führen) zu einem Verdachtsfall, und ein zweiter positiver Test in der Herde kann zu einem bestätigten Fall führen (epidemiologische Verbindung zu einem Verdachtsfall, sogar innerhalb desselben Betriebes).

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Wenn bei Rindern, Schweinen, Schafen oder Ziegen *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* oder *Brucella suis* durch:

- a) bakteriologische oder molekularbiologische Untersuchung oder
- b) mindestens zwei unterschiedliche serologische Untersuchungsverfahren in Verbindung mit klinischen oder pathologisch-anatomischen Untersuchungen oder epidemiologischen Anhaltspunkten festgestellt ist (siehe §1, Absatz 1 und §15 Brucelloseverordnung).

Hinweis: Serologische Methoden können nicht zwischen den Infektionen der drei genannten Brucellaspezies unterscheiden.

Infektionen mit *Brucella ovis*: siehe Kapitel Infektiöse Epididymitis.

Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Verordnung (EU) 2016/429 vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- Delegierte Verordnung (EU) 2018/1629 vom 25.7.2018 zur Änderung der Liste der Seuchen in Anhang II der Verordnung (EU) 2016/429 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 vom 2.12.2018 über die Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 vom 17.12.2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften betreffend Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen
- Brucellose-Verordnung in der jeweils geltenden Fassung
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen 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