

Anlage 2
(Zu Nummer 2 zu § 2)

**Nachweis des Erregers der Vibronenseuche
(*Vibrio fetus*)**

Kulturelle Untersuchung

1.1 Als Untersuchungsmaterial sind Vaginal- oder **Präputialspülproben**, Spülproben von der Innenwand der künstlichen Scheide und **Spermaproben** zu verwenden. Zwischen der Entnahme und dem Anlegen der Kulturen darf kein längerer Zeitraum als 6 bis 8 Stunden liegen.

1.1.1 Als **Spülflüssigkeit** hat sich **Thioglykolatbouillon** bewährt, die als **Fertignährboden** bezogen oder nach folgendem Rezept hergestellt werden kann:

Pepton	20,0 g
Kochsalz	5,0 g
Natriumthioglykolat	1,0 g
Aqua dest.	1000,0 ml

1.2 Zur kulturellen Isolierung der Vibronen ist es erforderlich, daß die Begleitflora im Untersuchungsmaterial möglichst ausgeschaltet wird. Dies kann erreicht werden:

1.2.1 Durch Nährböden, die Hemmstoffe enthalten, z.B. **Natriumthioglykolat-Nährboden** (s. unter 1.1.1 angeführtes Rezept oder Fertignährboden) mit Zusatz von 2% Agar, 10% Rinderschüttelblut und 11,4 ml einer 0,22%igen Brillantgrünlösung auf 1 Liter Nährboden oder **Natriumthioglykolat-Nährboden** mit Zusatz von 2% Agar, 10% Rinderschüttelblut und **Bacitracin (15 E/ml)**, **Novobiocin (10 µg/ml)** und **Polymyxin (2 E/ml)**.

1.2.1.1 Die Nährböden sind mit 2 bis 3 Ösen des **Untersuchungsmaterials**, evtl. nach kurzem **Zentrifugieren** (2 bis 5 Min.) vom Überstand, zu **beimpfen**.

1.2.2 Durch Filtration des Untersuchungsmaterials vor Beimpfung des Nährboden. Die Spülproben sind kurz (2 bis 5 Minuten) zu **zentrifugieren** und 3 ml der überstehenden Flüssigkeit durch einen Filter mit 0,65 µm Porenweite (besonders geeignet sind **Injektions-spritzen** aufsetzbare Filter) zu **filtrieren**; bei Samenproben sollten etwa 0,3 ml Spermplasma mit 2,7 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden. Um eine Verstopfung der Filterscheiben zu vermeiden, können zusätzlich **Mikroglasfaser-Vorfilterscheiben** verwendet werden.

1.2.2.1 Von dem **Filtrat** werden 2 bis 3 Tropfen auf **Natrium-thioglykolatnährboden** mit 2% **Agar** und 10% Rinderschüttelblut ohne hemmende Zusätze gebracht.

1.3 Die beimpften Platten sind 4 Tage in luftdicht verschließbaren Behältern (z. B. **Zeißler-Töpfe**), in denen ein Unterdruck von 0,8 at erzeugt wird, der durch Einleiten eines Gasgemisches aus 95% Stickstoff und 5% Kohlendioxyd bis auf 0,2 at vermindert wird, zu bebrüten.

1.4 Bei der **Prüfung** der Kulturen sind vibronenverdächtige Kolonien mikroskopisch zu untersuchen. Hierzu eignet sich besonders die Untersuchung von **Nativ-präparaten** im Phasenkontrast mit **Olimmersion**, da bei diesem Verfahren neben der typischen Form der Bakterien auch ihre charakteristische Beweglichkeit erkennbar ist.

2

Identifizierung von *Vibrio fetus*

Die von den Genitalschleinhäuten des Rindes isolierbaren Vibronen lassen sich in der Regel auf Grund kulturell-biochemischen Verhaltens den Arten *V. fetus* und *V. bubulus* zuordnen:

Spezies	Bildung von Katalase	Bildung von H ₂ S	Wachstum bei 3,5% NaCL
<i>V. fetus</i>	+	—	—
<i>V. bubulus</i>	—	+	+

Katalasenachweis

1 ml einer gut bewachsenen Leberbouillon ist mit 1 ml einer **3%igen H₂O₂-Lösung** zu mischen. Bei positivem Ausfall treten nach wenigen Sekunden Sauerstoffblasen **auf**.

H₂S-Nachweis

Nach Beimpfung einer Leberbouillon (vorher **kurz** aufkochen) wird ein Blei~~azetatstreifen~~ in das Röhr-

7831

chen eingehängt. Eine positive Reaktion (Schwarzfärbung des Streifens) tritt nach 2 bis 3 Tagen Bebrütung auf.

- 2.3 Nachweis der Kochsalztoleranz
Natriumthioglykolutbouillon mit Zusatz von 0,1% Agar und von 3,5% Kochsalz ist mit 2 bis 3 Tropfen einer gut bewachsenen Leberbouillonkultur zu beimpfen. Wachstumskontrolle nach 48 Stunden Bebrütung durch makroskopische Beurteilung und mikroskopische Untersuchung eines **Nativpräparates** (bewegliche Vibrionen).
- 2.4 Stämme, die sich kulturell biochemisch wie *V. fetus* verhalten, müssen zur Unterscheidung von *V. fetus* (*venerealis*) und *V. fetus* (*intestinalis*) weiter differenziert werden.
 - 2.4.1 *Vibrio fetus* (*venerealis*):
O-Antigentyp 1, in der Regel keine, aber vereinzelt geringe oder variable Glycintoleranz (maximal 1,1%), 0,1% Natrium-Selenitreduktion und **H₂S-Bildung** negativ.
Vibrio fetus (*intestinalis*):
O-Antigentyp 1 oder 2. Glycintoleranz 1,3% (0 1) - 1,9% (**0 2**), **Selenitreduktion** und **H₂S-Bildung** positiv.
- 2.5 Nachweis der **Unterscheidungsmerkmale**
 - 2.5.1 Nachweis der Glycintoleranz: Natrium-Thioglycolatbouillon mit (oder auch ohne) 0,5% **Dextrose**, und mit Zusatz von 1,2% Glycin ist mit **2 - 3** Tropfen einer gut bewachsenen Leberbouillonkultur zu beimpfen. Wachstumsbeurteilung nach 48 Stunden wie in Nr. **2.3**.
 - 2.5.2 Nachweis der Selenitreduktion: Zu Nährbouillon 0,1% Natriumselenit zugeben, beimpfen, mikroaerophil bebrüten, rötliche Trübung am 1. bis 3. Tage positiv.
 - 2.5.3 Empfindlicher **H₂S-Nachweis**: Zu Nährbouillon 0,075% Agar und 0,02% Cystein zugeben, beimpfen, Bleiacetatpapier-Streifen einhängen, fünf Tage bebrüten. Eine schwache Schwärzung meist nach 2 Tagen am unteren, zweckmäßig abgerissenen und nicht abgeschnittenen Rande des Papierstreifens ist bereits positiv. Bei kräftig flächiger Schwärzung handelt es sich nicht um *Vibrio fetus*.
- 2.6 Serologische Differenzierung von *Vibrio fetus*
In Ausnahmefällen, in denen die kulturell-biochemischen Methoden keine eindeutigen Ergebnisse liefern, kann die Bestimmung des **O-Antigens** mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion notwendig werden. Einzelheiten der Versuchstechnik s. E. **Mitscherlich** und B. **Liess** (1958): Die serologische Differenzierung von **Vibrio-fetus-Stämmen**, **Dtsch. Tierärztl. Wschr.** **65**, 2-5, 36-39.