

7831

Anlage 2

(Zu Nummer 2 zu § 2)

Nachweis des Erregers der **Vibrionenseuche**
(**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 Vibrionen 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 Nährbodens. 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 Spermaplasma 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 **Natriumthioglykolatnährboden** 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 vibrionenverdächtige Kolonien mikroskopisch zu untersuchen. Hierzu eignet sich besonders die Untersuchung von **Nativpräparaten** im Phasenkontrast mit **Ölimmersion**, da bei diesem Verfahren neben der typischen Form der Bakterien auch ihre charakteristische Beweglichkeit erkennbar ist.

Identifizierung von Vibrio fetus

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

Spezies	Bildung von Katalase	H ₂ S	Wachstum bei 3,5% NaCl
V. fetus	+	–	–
V. bubulus	–	+	+

2.1 **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**.

2.2 **H₂S-Nachweis**

Nach Beimpfung einer Leberbouillon (vorher **kurz** aufkochen) wird ein **Bleiazetatstreifen** 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

Natriumthioglykolatbouillon 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-Thioglykolatbouillon 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.