

Die Tilgung der Pferdebrucellose in der DDR konnte 2 Jahre früher abgeschlossen werden.

Nach den Publikationen von Ritscher (1963) sowie Fechner und Meyer (1963) traten nachweisbar keine weiteren Brucellose-Erkrankungsfälle beim Pferd auf.

#### **4. Diagnostik**

Als diagnostische Verfahren stehen der bakteriologische Erregernachweis, der serologische Nachweis von Antikörpern und die Allergieprobe zur Verfügung.

##### **4.1 Bakteriologie**

Den ersten brauchbaren bakteriologischen Nachweis von Brucellen konnte Bruce (1887) erbringen.

Der bakteriologische Erregernachweis ist mit zusätzlicher Typendifferenzierung von allen zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden das sicherste Verfahren zur Diagnostik der Brucellose.

Die bakteriologische Untersuchung von Organmaterial mit Hilfe der Färbungen von Hansen und Köster (1936), Wegener und Börger (1956) besitzt dagegen nur orientierenden Wert. Während Bang (1907) den bakteriologischen Erregernachweis vornehmlich mit flüssigen Nährmedien, speziell mit Serumbouillon, vornahm, deren Rezeptur später von Zeller (1923) durch Traubenzucker-Glyzerin-Bouillon ergänzt wurde, hat sich in neuerer Zeit der feste Nährboden gegenüber dem flüssigen Nährmedium mehr und mehr durchgesetzt. Einerseits wurden mit ihm größtenteils bessere Untersuchungsergebnisse erzielt und andererseits blieben durch ihn die kulturmorphologischen Eigenschaften eher erhalten. Ein Phasenwechsel von S- in R-Formen der Brucellen ist bei der Verwendung fester Nährböden weniger zu befürchten. Die Auswahl fester Nährböden ist größtenteils von finanziellen Gesichtspunkten und der Bereitstellung besonderer Chemikalien abhängig.

Ausgesprochen gute Ergebnisse können mit dem von Lerche und Entel (1958) modifizierten Lebersubstrat-Agar (Entel und Breuer (1962)) und dem Albimi-Agar erzielt werden. Durch die Bebrütung in einem sauerstoffarmen Milieu kann die Zahl der isolierten Brucella-Kolonien als optimal bezeichnet werden. Die bakteriologischen Untersuchun-

gen mit Hilfe des Stafseth- und Glycerin-Dextrose-Agars bringen befriedigende Ergebnisse.

Eine optimale Erfolgschance in der Anzüchtung von Brucellen aus den Organen von Pferden und ihren Ausscheidungen nutzten Fechner und Meyer (1960) durch den gleichzeitigen Einsatz fester und flüssiger Nährmedien. Als feste Nährböden kamen der 2%ige Glycerin-Dextrose-Agar und der Stafseth-Agar in Anwendung. Als flüssige Nährmedien nutzten sie die Traubenzucker-Glycerin-Bouillon nach den Angaben von Zeller (1933) und Penizillinnährmedien des Veterinärhygiene Institutes Zürich mit folgender Zusammensetzung: Bacto-Tryptose 20 g, Dextrose 2 g, NaCl 5 g, Natrium citricum 10 g, Thiamin-HCL 0,005 g in 1000 ccm Aqua dest. mit Zusatz von 0E Penizillin je Kubikzentimeter. Jede entnommene Probe wurde auf allen 4 Nährmedien angelegt. Die flüssigen Nährmedien wurden nach der Beimpfung mit Paraffinum liquidum überschichtet, die festen Nährböden unter CO<sub>2</sub>-Spannung bebrütet. Nach 5- bis 7-tägiger Bebrütung wurde die Plattenkontrolle durchgeführt und nach 7 Tagen die flüssigen Nährmedien auf feste Nährböden überimpft.

Zur Typendifferenzierung der isolierten Brucella-Kolonien können die einschlägigen Differenzierungsverfahren durchgeführt werden.

An erster Stelle wäre die Farbplattenmethode nach Huddleson (1943) zu nennen, deren Farbstoffkonzentration von Lerche und Entel (1958) zur Verbesserung der Differenzierung erhöht wurde. Die Unterscheidung gegenüber anderen Brucellatypen erfolgt durch Prüfung des Wachstums auf Nährböden mit Zusatz von Fuchsin und von Thionin, wie es in Abb. 7 dargestellt ist.

Nach den Empfehlungen des Fachausschusses zur Bekämpfung der Brucellose der WHO zusammen mit der FAO 1950 in Washington und 1952 in Florenz sowie der Tagung der WHO/FAO in Wien 1952 sind als weitere Untersuchungsgänge der Typendifferenzierung biochemische Tests (CO<sub>2</sub>Bedarf, H<sub>2</sub>S-Produktion, Ureaseaktivität u. a.) sowie serologische Identifizierung und Klassifizierung einschließlich der Untersuchung auf Dissoziationsformen vorzunehmen (Meyer, 1962).

Die Typendifferenzierung der Brucellen setzt Kenntnisse über ihr biochemisches Verhalten voraus. Im Prinzip sind die Brucellen, die zum Wachstum die Vitamine Thiamin, Niacin und Biotin benötigen, streng aerobe Keime, die jedoch speziell bei der Erstisolierung 5-10% CO<sub>2</sub>-Zusatz benötigen. Das Temperaturoptimum liegt für Brucellen bei 37°C. Ihr Wachstum und ihre Vermehrung im Organismus erfolgen intrazellulär.

Die für die Pferdebrucellose wichtigen 3 *Brucella*-Typen zeichnen sich nach Beer (1987) durch folgende biochemische Untersuchungsmerkmale aus:

*Brucella abortus*:

Benötigt bei der Erstisolierung einen 5%igen CO<sub>2</sub>-Zusatz, ist H<sub>2</sub>S-Bildner in geringem Maße, wächst meist in Gegenwart von basischem Fuchsin und wird im Prinzip bis auf thioninresistente Stämme durch Thionin gehemmt. *Brucella abortus* hat 9 bestätigte Biotypen. Der Referenzstamm ist *Brucella abortus* 544.

*Brucella melitensis*:

Ver mehrt sich aerob, benötigt beim Wachstum kein CO<sub>2</sub>, bildet kein H<sub>2</sub>S, ist fuchsin- und thioninresistent. Der Referenzstamm ist *Brucella melitensis* 16 M.

*Brucella suis*:

Ist starker H<sub>2</sub>S-Bildner, benötigt kein CO<sub>2</sub> beim Wachstum. Letzteres erfolgt in Gegenwart von Thionin und wird durch basisches Fuchsin gehemmt.

Die *Brucella suis* ist pathogen für Schwein, Hase, Pferd und Mensch. Der Referenzstamm ist *Brucella suis* 1330.

Das biochemische Verhalten der 3 für das Pferd wichtigen *Brucella*-Typen zeigt Tab. 6.

Biochemisches Verhalten	CO <sub>2</sub> -Bedarf	H <sub>2</sub> S-Bildung	Wachstum mit basisches Fuchsin		Farbstoffzusatz Thionin		
			II	III	I	II	III
<i>Brucella abortus</i>	+	+	+	+	-	-	-
Biotyp 3	+	+	+	+	+	+	+
<i>Brucella melitensis</i>	-	-	+	+	-	+	+
<i>Brucella suis</i>	-	+	-	-	+	+	+

Tab. 6

Biochemisches Verhalten der *Brucella*-Typen (Beer, 1987)

Die Speziesdifferenzierung ist auf Albimi-Agar oder Tryptose-Agar mit folgenden abgestuften Farbstoffkonzentrationen vorzunehmen: 1:25000 (I), 1:50000 (II), 1:100000 (III). Die Interpretation der Resultate muß durch Vergleich mit den Referenzstämmen jeder Spezies abgesichert werden.



Abb. 7

Wachstum der 3 Brucellatypen auf thionin- und fuchsinhaltigen Nährböden  
 (aus Fechner: Schutzimpfungen bei Haustieren, 1964)

## 4.2 Serologie

Auch bei der Pferdebrucellose dienen als serologische Untersuchungsverfahren die Serumlangsamagglutination (SLA) und die Komplementbindungsreaktion (KBR). Die Meinicke-Flockungsreaktion und die Präzipitationsmethode erlangten keine diagnostische Bedeutung.

Als Erste veröffentlichten Fontaine und Lütje (1919) aus ihrem umfangreichen Untersuchungsmaterial von 3419 Pferden neben den klinischen Erscheinungen die serologischen Untersuchungsergebnisse auf Brucellose. Zur Diagnostik nutzten sie das Agglutinationsverfahren und konnten von 3419 Pferden 17 Pferde als brucellapositiv (0,5%) bewerten.

In der Nachfolgezeit äußerte sich eine Reihe von Autoren über den diagnostischen Wert der Serumlangsamagglutination und der Komplementbindungsreaktion und vertraten unterschiedliche Meinungen in der Beurteilung des Grenztiters der SLA und in der Bewertung der KBR.

Rinjard und Hilger sahen 1928 in der SLA den Titer von 1:50 als unterste Stufe der positiven Bewertung.

In Amerika fanden Fitch u. Mitarb. (1930), daß Verdünnungen ab 1:100 Bang-Bakterien agglutinieren. Bennets und Filmer kamen 1931 zu dem gleichen Ergebnis.

Konkreter in ihren Darlegungen werden Hieronymi und Gilde (1935), Krüger (1937), Lafranchi und Pacchioni (1934), Sczuka (1938), Hess (1945), Makkawejsky u. Mitarb. (1931). Sie vertreten den Standpunkt, daß Reaktionen mit dem Titer ab 1:100 als positiv gelten.

Herrmann u. Mitarb. (1934) betrachten den Titer von 1:50 als Grenzwert. Pritulin (1952) bestätigt diese Meinung. Im Gegensatz zu diesen Autoren erachteten von der Hoeden (1932) und Schoop (1935) derartig niedrige Zahlen für nicht beweisend. Sie sehen als Ausdruck eines spezifischen Infektionsprozesses erst einen Titer von 1:200 als positiv an. Schellner (1934), der ebenfalls dem Titer von 1:200 den Grenzwert zuspricht, unterstützt die Ansicht von Zwick und Zeller (1936), die Agglutination gleichzeitig mit der Komplementbindungsreaktion einzusetzen, da es sich erwies, wie Anczykowski (1939) hervorhebt, daß zu bestimmten Zeitpunkten das Serum brucellainfizierter Pferde nicht agglutiniert, während die KBR deutlich positiv ausfällt. Das betrifft hauptsächlich Patienten mit chronischen Prozessen und eventuell Rekonvaleszenten, da nach Schellner (1934) die Agglutinine aus der Blutbahn schneller verschwinden als die Bang-spezifischen Antikörper. Somit ist nach Schellner (1934) durch die SLA die akute Phase der Erkrankung und mittels der KBR der Stand des Durchseuchungsgrades des Bestandes durch den länger anhaltenden positiven Titer eher zu erkennen. Schellner (1934) benutzt als SLA-Antigen einen nach Fleischhauer hergestellten Extrakt und bemängelt in der Bewertung der KBR auf Grund der unterschiedlich eingesetzten Serum-mengen die dadurch eingetretene differenzierte Bewertung in den Veröffentlichungen der Autoren. So basieren die KBR-Ergebnisse von Fontaine und Lütje (1919) auf

dem Einsatz einer Serummenge von 0,2 ml, während van der Hoeden (1932) nur 0,06 ml anwandte.

Pilet (1958) hält die Agglutination für das wichtigste Mittel zur Diagnostik und vertritt mit Rossi (1936) die Meinung, daß ein Agglutinationstiter von 1:80 noch normal sei.

1939 weist Anczykowski auf die große Divergenz in der Bewertung des Grenztiters bei der Pferdebrucellose hin. Das Pferd kann einmal als infiziert angesehen werden, im anderen Fall als gesund. Die Ursache für solche Abweichungen klärt in gewissem Grade Stableforth (1936) in seinen Untersuchungen, die im Auftrage des Internationalen Büros für Epizootiologie in Paris von ihm durchgeführt wurden. Er stellte fest, daß die Ursache des Nichtübereinstimmens der Ergebnisse und der unterschiedlichen Meinung über den positiven Titer beim infizierten Pferd in bestimmten Ungenauigkeiten liegt. Er macht dafür verschiedene Methoden und Konzentrationen der Antigen-Bereitung für die Agglutination verantwortlich. Der Autor ist der Meinung, daß sich diese Ungenauigkeiten durch die Einführung entsprechender Standardmethoden vermeiden lassen.

In Polen befaßte sich zuletzt damit die veterinärmedizinische Abteilung des Institutes für Landwirtschaftswissenschaften in Pulawy, die eine Durchführungsmethode für die Agglutinationsreaktion ausgearbeitet hat.

Ritscher kommt 1963 in Verbindung mit der Brucellin-Augenprobe zu dem Vorschlag, erst einen SLA-Titer ab 1:40 als verdächtig und ab 1:80 als positiv zu werten. Der Vergleich mit dem Ausfall der Augenprobe bestätigt diese Meinung.

Kleine-Stricker (1959) kommt in ihren Untersuchungen, basierend auf der SLA, zu den gleichen Ergebnissen. Diese großen Unterschiede in der Festlegung des Grenztiters gehen auf zwei Tatsachen zurück, wie Fechner und Meyer (1963) hervorheben.

Zum einen stützt sich die Festsetzung des Grenztiters bei einigen Autoren hauptsächlich auf den klinischen Befund des Patienten ohne Berücksichtigung des bakteriologischen Nachweises und ohne Hinzuziehung der Komplementbindungsreaktion. Zum anderen ist bei vielen früheren Autoren die angewandte Untersuchungstechnik nicht einheitlich, und Dichte und Agglutinabilität des Antigens sind unterschiedlich. Bahnbrechend auf diesem Gebiet war die grundlegende Arbeit von Lerche und Roots (1948) über die Anwendung eines standardisierten Trockenantigens für den serologischen Brucellosenachweis in der Serumlangsamagglutination. Das standardisierte Trockenantigen macht es erst möglich, die vielerorts durchgeführten serologischen Untersuchungen hinsichtlich ihrer Ergebnisse gleichwertig zu beurteilen. Die Anwendung des standardisierten Trockenantigens nach Lerche und Roots zeigt gegenüber allen anderen Verfahren den Vorteil, daß seine antigene Wirkung über längere Zeit in gleichblei-

bender Höhe erhalten bleibt, das Antigen sich in abgewogenen Mengen zu Testsuspensionen von konstanter Dichte und Wirksamkeit verarbeiten läßt und demzufolge die Grenztiter keinen Schwankungen unterliegen.

Das Antigen besteht aus abgetöteten Keimen eines besonders ausgewählten *Brucella abortus*-Stammes. Die Wirksamkeit des Trockenantigens ist, basierend aus den Erkenntnissen von Lerche und Roots, entsprechend den Richtlinien der WHO, Expertenkomitee für Biologische Standardisierung, so eingestellt, daß eine Verdünnung des Standardserums (Veterinary Laboratory Weybridge) von 1:640 eine 50prozentige Agglutination des Antigens bewirkt.

Das Ziel der Untersuchungen von Fechner und Meyer (1963) war u. a., den Grenztiter bei der Pferdebrucellose festzulegen und den Verlauf serologischer Titer im Vergleich mit den klinischen Erscheinungen und der Lokalisation und Ausscheidung der Erreger zu beobachten.

Die Autoren untersuchten zu diesem Zwecke 16 Versuchspferde für die Dauer von über 3 Jahren sowie 200 Pferde aus ländlichen Betrieben und 1059 Schlacht- und Serumpferde teils einmalig, teils mehrmalig mit Hilfe der SLA, KBR und größtenteils mit der Kolloid-Komplementbindungsreaktion (KKBR). Sie benutzten das standardisierte Trockenantigen nach Lerche und Roots (1948), um zu konstanten und vergleichbaren Ergebnissen zu kommen.

Die über 3 Jahre sich erstreckenden, fortlaufenden serologischen Untersuchungen an dem gesamten Pferdebestand lassen in ihren Ergebnissen die serologischen Reaktionen der Pferdebrucellose wie folgt beurteilen.

1. Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn die Agglutination bei einer Serumverdünnung von 1:80 deutlich sichtbar ist (1:80 ++ und höher).
2. Ein zweifelhaftes Ergebnis liegt vor, wenn die Agglutination bei einer Serumverdünnung von 1:40 deutlich sichtbar ist und bei einer Serumverdünnung von 1:80 nur in Spuren oder nicht auftritt (1:40 +++++; 1:80 +).
3. Ein negatives Ergebnis liegt vor, wenn die Agglutination bei einer Serumverdünnung von 1:40 deutlich sichtbar ist oder nicht auftritt (1:40 ++++; 1:40 ++ und weniger).
4. Ist die KBR für sich allein positiv, also die SLA negativ oder zweifelhaft, so ist auch die Endbeurteilung positiv.

Der Grenztiter bei der Pferdebrucellose ist 1:80 +.

Durch die Untersuchungen ihrer 3-jährigen Versuchsreihen kamen die Verfasser über den Verlauf des SLA-Titers bei Pferden nach erfolgter Aufnahme von Brucellen zu folgenden Ergebnissen:

1. Ausbildung von Bang-Agglutininen bei jahrelang gleichbleibenden positiven Titerwerten ohne chirurgische Erkrankungen (latente Infektion),
2. Ausbildung von Bang-Agglutininen bei jahrelang gleichbleibenden positiven Titerwerten mit chirurgischer Erkrankung,
3. Ausbildung von Bang-Agglutininen für einige Monate, vorübergehendes Absinken und Wiederanstieg der Agglutinine,
4. schwache Ausbildung von Bang-Agglutininen für einige Monate,
5. keine Ausbildung von Bang-Agglutininen.

Die Beurteilung der serologischen Reaktion in der Komplementbindung erfolgte nach folgendem, staatlich angewiesenem Schema:

1. Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn das Serum in der Menge von 0.1 ml eine vollständige Bindung des Komplements (++++) bewirkt.
2. Ein zweifelhaftes Ergebnis liegt vor, wenn das Serum in der Menge von 0,1 ml eine teilweise Bindung des Komplements (+++, ++, +) bewirkt.
3. Ein negatives Ergebnis liegt vor, wenn das Serum in der Menge von 0,1 ml keine Bindung des Komplements bewirkt.
4. Ist die KBR für sich allein positiv, also die SLA negativ oder zweifelhaft, so ist auch die Endbeurteilung positiv.

Mit diesen fundierten Festlegungen in der Serodiagnostik der SLA und KBR konnte die Diagnosesicherheit bei der Feststellung der Pferdebrucellose auf eine reale Basis gestellt werden.

Im Zusammenwirken von SLA und KBR – unterstützt durch bakteriologische Untersuchungen – kommen Fechner und Meyer anschließend zu folgendem Beurteilungsschlüssel in der Serodiagnostik der Pferdebrucellose:

- P o s i t i v :**
- SLA-Titer 1:80 ++ und mehr;
  - SLA-Titer 1:80 + und weniger;
  - bei positiver KBR.
- Z w e i f e l h a f t :**
- SLA-Titer 1:80 +
  - 1:40 +++; KBR negativ oder zweifelhaft.



N e g a t i v :           - SLA-Titer 1:40 +++ und weniger;  
                              - KBR negativ.

Wie Hieronymi und Gilde (1935) erwähnen, wurde die Präzipitationsmethode für die Diagnostik der Pferdebrucellose versucht aber wieder verlassen, da sie keine zuverlässigen Ergebnisse zeigte. Es liegen ähnliche Verhältnisse wie beim Rind vor, bei dem die Verfasser schon im Jahre 1912 die Präzipitation angewandt, doch wegen der diagnostischen Unzuverlässigkeit wieder aufgegeben hatten.

Auch konnte sich in der Diagnostik der Pferdebrucellose die Flockungsreaktion nach Meinicke nicht durchsetzen.

Die serologischen Untersuchungsergebnisse der Literatur aus dem englischsprachigen Raum lassen sich hinsichtlich der Durchführungsmethoden und der Titerbewertung in der Regel nicht mit den deutschen gleichsetzen. Auch sie weisen unterschiedliche Werte zum Grenztiter auf.

So arbeiteten Gibbon und Manning (1969) in den USA mit dem Standard Tube Agglutinationstest (STT), dem Rivanol Precipitation Plate Test (RIV), dem Buffered Brucella Antigen Card Test (BBA) und dem Complement-Fixationstest (CF).

Eine internationale Vereinheitlichung der Titer-Werte – basierend auf den WHO-Richtlinien zur Standardisierung des Trockenantigens – ist in der ausländischen Literatur bis in die Neuzeit hinein im Allgemeinen nicht zu erkennen.

### **4.3 Allergieproben**

Schoop (1936) und Pallaske (1936) vertreten die Meinung, daß die Brucellose des Pferdes einen allergischen Charakter trägt. Deshalb führten etliche, in der Folge genannte Autoren Untersuchungsmethoden auf allergischer Basis durch, die in Form von intradermal, subkutan und in der Intradermopalpebralprobe ihre Anwendung fanden.

In der Überlegung, die Allergiereaktion des brucellainfizierten Pferdes für die Diagnostik brauchbar zu machen, unternahm van der Hoeden 1932 als erster den Versuch, in Anlehnung an die Tuberkulinprobe und die Malleination, eine Ophthalmoreaktion mit einer Brucellasuspension für die Diagnostik zu erproben. Als Allergen diente ihm eine dichte Brucella-Kultursuspension in physiologischer Kochsalzlösung, die auf 60° erhitzt und zu gleichen Teilen mit Glycerin verdünnt wurde. Bei Einträufeln dieser Lösung in das Augenlid zeigte ein brucellainfiziertes Pferd nach 14 Stunden rote, geschwollene Bindehäute mit eitriger Exsudation, die in ihrem Erscheinungsbild der Ophthalmoreaktion bei Tuberkulose sehr ähnlich war. Das andere Auge des Pferdes diente als Kontrol-

le. In dieses Auge wurde eine physiologische Kochsalzlösung mit 50% Glycerin ohne Brucellen geträufelt. Es zeigte keine nennenswerten Veränderungen. Die positiven Reaktionen markierten sich schon nach 6 bis 9 Stunden und waren meistens nach 24 Stunden wieder spurlos verschwunden.

Van der Hoeden (1932) nutzte 23 in der SLA und KBR negativ reagierende Kontrollpferde, denen er das Brucella-Reagenz ins Auge träufelte. Es trat bei den Pferden weder Rötung noch Schwellung noch eitriger Augenausfluß auf.

Die ersten intrakutanen Proben führten Rossi und Saunie (1934) durch und hatten dabei gute Erfolge. In Anleitung an van der Hoedens (1932) Untersuchungen erprobten Hieronymi und Gilde (1935) die Kutan- und Subkutanreaktion als Diagnostikum brucellainfizierter Pferde. Zur Ausbildung einer Antigen-Antikörperreaktion setzten sie eine Abortusbakterienemulsion von der Dichte ein, wie sie für die Agglutination in Anwendung kam. Die kutane wie subkutane Injektionsdosis betrug 3-5 ml; die Konservierung bestand in 0,5%igem Phenol- oder 3%igem Yatren-Zusatz.

Die intrakutane und subkutane Injektion von abgetöteten Brucellakeimen bewirkte erheblich schmerzhaftes Schwellungen an der Injektionsstelle brucellainfizierter Pferde. Nicht selten trat nach der Einspritzung dichter Bakterienaufschwemmungen Abszedierung ein. Nichtinfizierte Pferde vertrugen die Injektion auch größerer Bakterienmengen reaktionslos. Eine thermische Reaktion konnte bei diesen Pferden selbst bei einer Injektionsmenge von 10 ml Brucellaaufschwemmung nur einmal beobachtet werden.

In seiner umfangreichen Arbeit über die Pferdebrucellose griff Anczykowski (1939) u. a. die Thematik der Allergieprobe wieder auf und kam zu dem abschließenden Urteil, daß die intrakutane Reaktion 5-7 Tage nach der Injektion des Antigens Agglutinine bis zu einem Titer von 1:320 im Blut hervorruft, die sich bis zu 10 Wochen p. i. nachweisen lassen. Der Wert der Allergieprobe erfährt durch diesen Umstand erhebliche Einschränkungen. - Die Probe wird am Hals des Tieres vorgenommen. Alle Autoren warnten davor, die Injektion in das Lid vorzunehmen, da es manchmal zur Bildung von Eiterungen an der Injektionsstelle kommt, die sich nachteilig auf das Auge auswirken können. - Die positive Reaktion des Intrakutantestes kennzeichnet sich in der Erscheinung einer harten, heißen und schmerzhaften Geschwulst, die ca. 4-13 cm lang und 4-5 cm breit ist.

Über den diagnostischen Wert der Allergieproben äußert sich 1958 Pilet, indem er die subkutane Reaktion als ungeeignet betrachtet und der Intradermalreaktion diagnostische Beachtung schenkt. Pilet spritzte 0,7 ml des Antigens Dubois intradermal am Hals

des Pferdes und las die Reaktion nach 3-4 Tagen ab. Bei einem positiven Befund entstand ein heißes, schmerzhaftes Ödem von 4-12 cm Länge und 4-5 cm Breite, oftmals mit Schwellung der Lymphgefäßstränge. Als brauchbar schätzte er die Ophthalmoreaktion mit einer 48 Stunden alten Bakterienkultur ein. Die Kultur wurde auf 60°C erhitzt und mit gleicher Menge Glycerin vermischt. Ein Tropfen dieser Mischung auf die Konjunktiva rief bei infizierten Pferden nach 6-9 Stunden eine erhebliche Schwellung mit Tränenfluß hervor. Nach 24 Stunden hatten sich die Lidbindehäute wieder normalisiert. Pilet (1958) hebt im Zusammenhang mit der Bewertung der Allergieproben den Vorteil hervor, daß der Praktiker selbst ohne Laborunterstützung vor Ort am Patienten eine relativ sichere Schnelldiagnose stellen kann.

Die letzten umfangreichen Untersuchungen zur Diagnostik der Pferdebrucellose mittels der Ophthalmoreaktion führte Ritscher (1963) an 146 Pferden der Rostocker Bezirkstierklinik durch. Zur Anwendung kam das Brucella-Allergen „Brucellin Dessau“, das offiziell zur Brucellosediagnostik beim Schwein zur Intrakutanprobe und beim Schaf zur Intradermopalpebralprobe zugelassen war.

Das Brucellin ist eine nichtagglutinogene Zellfraktion eines *Brucella abortus* Stammes in der S-Phase, deren Konservierung mit einer organischen Quecksilberverbindung (0,002 g/100 ml) erfolgte.

Ritscher (1963) injizierte 0,2 ml Brucellin in den Konjunktivalsack und las das Ergebnis nach 7 Stunden ab.

Für die Beurteilung der Brucellin-Konjunktivalproben stellte Ritscher folgendes Schema auf:

- |             |   |
|-------------|---|
| Positiv:    | - Deutliche Schwellung und Rötung der Konjunktiva, Augenausfluß mit gelbgefärbtem Sekret wie in Abb. 8 oder |
|             | - Fehlen eines der ersten beiden Symptome, Augenausfluß mit starker Sekretion                               |
| Verdächtig: | - Schwellung und Rötung der Konjunktiva allein, oder  |
|             | - mäßige, jedoch vom Normalen abweichende Sekretion,  |
| Negativ:    | - keine Veränderung am Auge.  |

Auffallend war nach Ritscher, daß die Färbung des Augensekrets bei brucellainfizierten Pferden gelblich und bei brucellafreien Pferden weißlich war. Seine Untersuchungen mittels des Brucellin-Augentestes von 146 Pferden brachten folgendes Ergebnis:

115 Proben fielen negativ aus, 15 Proben positiv und 16 Proben verdächtig.

Der Verfasser setzte die Ergebnisse der Konjunktivalprobe in Beziehung zu den serologischen Untersuchungsergebnissen und zu dem Resultat, daß die Augenprobe in 28 Fällen schwächer und in 9 Fällen stärker als die Blutprobe ausfiel. Ein „Widerristpatient“ reagierte serologisch wiederholt brucellapositiv, nach der Ausheilung jedoch negativ. Die dann durchgeführte Augenprobe zeigte ein positives Ergebnis, was bewies, daß die Gewebsallergie die humorale Abwehr überdauert hat.

Ritscher (1963) kommt zu der abschließenden Beurteilung, daß die Brucellinaugenprobe (s. Abb. 8) beim Pferd zur Ergänzung der serologischen Untersuchung geeignet ist. Sie hat den Vorteil, daß sie die Tiere noch erfaßt, bei denen die Agglutinine bereits verschwunden sind, jedoch noch Gewebsallergie besteht. Das Ergebnis der Brucellinaugenprobe allein ist nicht beweiskräftig; es sollte stets an die serologischen Untersuchungsmethoden gekoppelt sein.



Abb. 8  
Positiver Brucellin-Augentest  
Aufn.: Ritscher (1963)

Im Zuge seiner diagnostischen Allergen-Untersuchungen unterzog Ritscher (1963) 37 Pferde der Intrakutanprobe. Es wurden 0,1ml Brucellin mit der Hauptner-Tuberkulinspritze intradermal am Hals injiziert und die Reaktion nach 24 Stunden abgelesen.

Bei 4 Widerristpatienten, deren Blutstatus brucellosepositiv war, bildeten sich im Ergebnis der Intrakutanprobe handtellergroße Quaddeln bei einer Hautdickenzunahme von 11,5 mm. Eine deutliche Übereinstimmung in allen angewandten diagnostischen Bereichen lag hier vor, was besonderes Interesse verdient. Bei nichtinfizierten Pferden

kam es zu Hautdickenzunahmen bis zu 7 mm, was den Verfasser veranlaßte, sie als verdächtig einzustufen. Im Verlauf der Intrakutanprobe zeigten sich vereinzelt Körpertemperaturerhöhungen bis zu 1,5°C und Inappetenz.

Verglichen mit der Konjunktivalprobe ergibt die Intradermalprobe eine mindere Reaktionsicherheit, weshalb sie vom Verfasser zugunsten der Konjunktivalprobe nicht empfohlen wurde.

In der Nachfolgezeit hat sich die Ophthalmoreaktion in Anwendung der Konjunktival- bzw. Intradermopalpebralprobe in der Palette der diagnostischen Untersuchungsmethoden nicht durchgesetzt. Das gleiche gilt für die Intradermalprobe.

Im Zuge der fortgeschrittenen Brucellose-Sanierung sank die Patientenzahl der an Brucellose erkrankten Pferde zunehmend, so daß man bei diesen Pferden fast ausschließlich die erprobten serologischen Untersuchungsmethoden mit standardisiertem Antigen zur Anwendung brachte, die, wenn es die Situation ergab, durch bakteriologische Untersuchungen ergänzt wurden.

#### **4.4 Tierversuch**

Eine wesentlich unterstützende Komponente zur Anreicherung von Brucellen mit nachfolgender Überimpfung auf feste und flüssige Nährböden stellt der Tierversuch dar. Zu diesem Zweck eignet sich das Meerschweinchen am besten. Durch den Tierversuch wird in Verbindung mit den bakteriologischen und serologischen Untersuchungen und möglichen allergischen Reaktionen die Diagnose umfassend abgesichert.

Hutyra u. Mitarb. (1959) heben besonders hervor, daß Meerschweinchen als Versuchstiere zum Nachweis der Brucellen eine besonders wichtige Rolle spielen. Nach Verimpfung von Brucellen unter die Haut oder in die Bauchhöhle entsteht bei Meerschweinchen eine chronische Krankheit, die sich in hochgradiger Milzschwellung, entzündlich-nekrotischen Herden in Lungen, Leber und Nieren, manchmal auch in gleichförmiger Auftreibung der Knochen äußert (Smith u. Fabyan), bei Verimpfung von Stämmen der *Brucella suis* aber auch rascher tödlich verlaufen kann.

Bei weiblichen Meerschweinchen ist Verwerfen, bei männlichen Hodenentzündung möglich. Die anatomischen Veränderungen sind nach 35-60 Tagen gut ausgeprägt (Smitmans u. Eschbaum, 1941). Die Bakterien lassen sich aber schon nach 3-4 Wochen in der Milz und in den Lymphknoten nachweisen. Verimpft man das Krankheitsmaterial in die Kniefalte, dann können nach Köser u. Plate (1933) die Bakterien im extirpierten Kniefaltenlymphknoten schon nach 3 Wochen in 82% der Fälle ermittelt werden. Das Angehen der Infektion läßt sich nach über 3 Wochen, mitunter aber schon

nach 8-10 Tagen, auch durch den positiven Ausfall der serologischen Untersuchung des Herzblutes, erweisen (Hutyra u. Mitarb. 1959).

Als Erste setzten Hieronymi und Gilde (1935) zur Diagnostik der Pferdebrucellose das Meerschweinchen ein. Die Verfasser injizierten Meerschweinchen subkutan kleine, von Pferden stammende Eiterpartikel. 6 Wochen p. i. wurden die Meerschweinchen getötet und bakteriologisch untersucht. Bei der Obduktion war im positiven Fall die Milz, aus der die Brucellen leicht und reichlich gezüchtet werden konnten, stark geschwollen. die Typendifferenzierung ergab *Brucella abortus*.

Auch Schoop (1935) unternahm den Versuch, aus Pferdeprounmaterial mittels Meerschweinchen Brucellen zu isolieren. In seinen Untersuchungen gelang es ihm nicht, mit Hilfe des Meerschweinchens den Erregernachweis zu erbringen.

Dagegen hatten Berge und Haupt (1937) mit der Isolierung von Brucellen aus Pferdeeiter vollen Erfolg. Von 10 Eiterproben, die zugleich bakteriologisch angelegt und an Meerschweinchen verimpft wurden, konnten in 3 Fällen Abortusbakterien nachgewiesen werden. Dabei ist hervorzuheben, daß sich die bakteriologischen Befunde mit denen der Meerschweinchen-Untersuchungen deckten.

Erst 23 Jahre später kam in den Untersuchungen von Fechner und Meyer (1960) das Meerschweinchen im Rahmen der Pferdebrucellose-Diagnostik wieder zum Einsatz. Mit Hilfe des Meerschweinchenversuches konnten die Verfasser aus dem Harn eines brucellainfizierten Pferdes einen thioninresistenten,  $H_2S$  bildenden *Brucella abortus*-Stamm isolieren.

1972 erwähnt Duff die Isolation eines *Brucella abortus*-Stammes aus der Milz eines Meerschweinchens, das Wochen zuvor mit einer vom Pferde stammenden Abszeßflüssigkeit infiziert worden war. Interessant ist der Titer des Pferdes, der zur Zeit der Probeentnahme 1:20 betrug.

Nach Rolle (1949) verfügt das Meerschweinchen über eine hohe *Brucella abortus*-Sensibilität.

„Der Meerschweinchen-Tierversuch gilt nach wie vor als Methode der Wahl zur Isolierung von Brucellen aus Untersuchungsmaterialien, die entweder durch anderweitige, vorwiegend saprophytäre Mikroorganismen stark verunreinigt sind oder die erwartungsgemäß einen sehr spärlichen Gehalt an Brucellen aufweisen“ (Rolle, 1949). Somit kommt dem Meerschweinchen eine gewisse Siebfunktion zu.

Das Kaninchen verhält sich als Brucellose-Versuchstier ähnlich wie das Meerschweinchen (Hutyra u. Mitarb. 1959). Doch wurde das Meerschweinchen aus möglichen Kostengründen und einfacheren Haltungsbedingungen dem Kaninchen vorgezogen.

Ratten und Mäuse eignen sich nach Hutyra u. Mitarb. (1959) nicht zum Erregernachweis von Brucellen, da sie häufig innerhalb von 4-14 Tagen an einer tödlichen Septikämie verenden. Nach Rolle (1949) sind sie deshalb zur Diagnostik ungeeignet, weil sie nur gegen einige Stämme empfindlich sind.

Trotzdem sprechen Schaetz und Buss (1951) den Hausratten Übertragungsmöglichkeiten auf Rinder zu.

Etliche Autoren, wie van der Hoeden (1932), Schellner (1934), Gobulev (1939), Fechner und Meyer (1960) u. a. konnten den Einsatz des Pferdes als Versuchstier im Rahmen der Epizootiologie-Forschung ermöglichen.