

Tierärztl. Umschau 65, 336–341 (2010)

Aus dem Landesamt für Landwirtschaft,
Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V), Rostock

Vorkommen der Brucellose beim Schwarzwild in Mecklenburg-Vorpommern – pathologische Befunde und Erreger-/Genomnachweise im Rahmen eines Monitoringprogramms

von Sascha Gerst, Peter Wolf, Wolfgang Uhl, Kirsten Risch, Carola Wolf, Kirsten Gerst und Matthias Seelmann

(6 Abbildungen, 1 Tabelle, 10 Literaturangaben)

Kurztitel: Brucellose beim Schwarzwild in M-V

Stichworte: Brucellose – *Brucella suis* – Schwarzwild – Freilandhaltung – Hoden – Orchitis

Zusammenfassung

888 Schwarzwildproben (855 Hoden, 33 Tierkörper) gelangten im Rahmen eines Monitoringprogramms von August 2008 bis März 2009 zur Untersuchung auf Brucellen ins Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei (LALLF). Einer pathologisch-anatomischen Beurteilung folgten histologische, bakteriologische und molekularbiologische Untersuchungen. In 14 Fällen konnten pathologische Veränderungen festgestellt werden, 17 Mal gelang die bakteriologische Erregerisolierung, aus 20 Proben konnte Brucellen-DNA mittels PCR nachgewiesen werden. Der Erregernachweis gelang immer aus typisch makroskopisch veränderten,

aber auch aus unveränderten Hoden, so dass aus diesen in zusätzlich 12 Fällen Brucellen isoliert und/oder deren Genom nachgewiesen werden konnte, obwohl sie keine pathologisch-anatomischen Veränderungen zeigten. Insgesamt konnten bei 26 Probeneinsendungen Brucellen und/oder Brucellen-DNA nachgewiesen werden. Die Erregertypisierungen der Isolate am Nationalen Referenzlabor für Brucellose in Jena ergaben jeweils *Brucella suis* Biotyp 2. *Brucella suis* ist in der Wildschweinpopulation Mecklenburg-Vorpommerns vorhanden, nach unseren Untersuchungen zum direkten Erregernachweis mit einer Prävalenz von 2,9%.

Abstract

Incidence of *Brucella suis* in wild boars in Mecklenburg-Western Pomerania – pathological, bacteriological and molecular biological results within a monitoring program

Key words: brucellosis – *Brucella suis* – wild boar – free-range – testicle – orchitis

888 samples of wild boars (855 testicles, 33 animal bodies) were sent to the State Office for Agriculture, Food Safety and Fishery (LALLF) during the period from August 2008 to March 2009 for the examination for Brucellosis within a monitoring program. Necropsy was followed by histological, bacteriological and molecular biological examinations. In 14 cases pathological changes were present, and in 17 cases *Brucella* spp. was isolated. *Brucella* specific DNA was detected in 20 samples of testicles. All samples with typical macroscopical changes

were positive for *Brucella* spp. either by bacteriological culture or by PCR or by both methods. In 12 cases *Brucella* spp. was isolated from testicles without any pathological changes. All isolates were identified as *Brucella suis* biovar 2 by the National Reference Laboratory in Jena. According to our findings, *Brucella suis* has a prevalence of 2.9% in the population of wild boars in Mecklenburg-Western Pomerania.

1 Einleitung

Brucella (*B.*) *suis* gehört neben *B. abortus* und *B. melitensis*, den Erregern der Rinder- bzw. Schafbrucellose, zu den wirtschaftlich bedeutendsten Vertretern der Gattung *Brucella*. Eine Infektion mit *B. suis* kann beim Menschen zu fieberhaften Erkrankungen führen, wobei der Schweregrad vom jeweiligen Biotyp abhängig ist. So wird für die Biotypen 1, 3 und 4 eine höhere

Pathogenität beschrieben als für *B. suis* Biotyp 2 (Godfroid et al., 2005).

Schon lange gelten sowohl die Hasen- als auch die Wildschweinpopulation Deutschlands als ein Naturreservoir für *B. suis* (Fenske u. Pulst, 1973; Dedek, 1983; Pannwitz, 1984; Melzer et al., 2006). In Österreich wurden von Hofer et al. (2010) durch den Nachweis von *B. suis* aus Mandibularlymphknoten von Rotfüchsen Naturherde der Schweinebrucellose aufgezeigt. Solche Naturherde wurden bislang für Neuausbrüche von Brucellose besonders in der Freilandschweinehaltung verantwortlich gemacht bzw. damit in Zusammenhang gebracht.

Bereits im Jahr 2004 ereignete sich ein Fall von Brucellose bei Hausschweinen in Mecklenburg-Vorpommern. Hier wurde *B. suis* in einer Freilandschweinehaltung im Landkreis Ludwigslust nachgewiesen. Damals gelangte ein Eber des Betriebes zur Sektion, bei dem

eine schwere Hodenbrucellose mit nekrotisierender Orchitis festgestellt wurde. Zusätzlich konnten aus Abortsubstraten Brucellen isoliert werden.

Im Juni 2008 wurden bei Routineuntersuchungen eines Freilandhaltungsbetriebes im Landkreis Ostvorpommern Antikörper gegen Brucellen bei mehreren Hauschweinen nachgewiesen und aus Sektionstieren und Hoden getöteter Eber desselben Betriebes *B. suis* isoliert. Intensivere Beprobung von Freilandhaltungen brachte Brucellennachweise in drei weiteren Landkreisen (Roost *et al.*, 2010).

Daraufhin wurde ein Untersuchungsprogramm ins Leben gerufen, das vorsah, Hoden und Nebenhoden von erlegten Keilern und Uteri erlegter Bachen pathomorphologisch, bakteriologisch und molekularbiologisch zu untersuchen. Parallel dazu wurden Untersuchungen an Blutproben durchgeführt, deren Ergebnisse von Roost *et al.* (2010) dargestellt wurden.

Ziel war es, einen Überblick zur aktuellen Prävalenz von *B. suis* in der Schwarzwildpopulation Mecklenburg-Vorpommerns zu erhalten, der eventuelle Rückschlüsse zulässt, welche Gefahr von den Wildschweinen für die Freilandhaltung ausgeht.

2 Material und Methoden

2.1 Probenmaterial, Sektion

Im Zeitraum von August 2008 bis März 2009 gelangten 33 Einsendungen von Tierkörpern (24 weibliche und 9 männliche) und 855 Hodeneinsendungen zur Untersuchung ins Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V).

Bei den Tierkörpern handelte es sich sowohl um verendete als auch um als krank angesprochen erlegte oder durch Verkehrsunfälle getötete Wildschweine. Hoden und Nebenhoden, die allein zur Brucellendiagnostik eingeschickt wurden, stammten von gestreckten, als gesund angesprochenen Tieren, deren Wildbret zum menschlichen Verzehr vorgesehen war.

An den Tierkörpern wurde eine Sektion zur Feststellung der Todes- bzw. Krankheitsursache durchgeführt und Hoden und Nebenhoden bzw. Uteri für die Brucellendiagnostik verwendet. Hoden, Nebenhoden und Uteri wurden nach makroskopischer Beurteilung einer histologischen, bakteriologischen und molekularbiologischen Untersuchung unterzogen.

2.2 Bakteriologie

Es wurden Hoden und Nebenhoden, beim Vorliegen von Uteri Gewebe aus einem Uterushorn und dem Uteruskörper, einer bakteriologischen Untersuchung zugeführt.

Für die Direktkultur wurden neben Traubenzuckerblutagar (Columbia Agar, Trockennährboden Fa. Oxoid oder Merck, Kälberblut, 40%ige Glukoselösung), der 3 Tage bei 37 °C aerob inkubiert wurde, Schafblutagar (Columbia Agar, Trockennährboden Fa. Oxoid oder Merck, Schafblut) und Brucella-Selektivagar (Columbia Agar, Trockennährboden Fa. Oxoid oder Merck, Schafblut, Brucella-Selektivsupplement SR 083 Fa. Oxoid) für eine fünftägige, mikroaerobe (10 bis 12 Vol. % CO₂) Bebrütung bei 37 °C verwendet. Anreicherungskulturen (Bacto Brucella-Bouillon, Fa. DIFCO, Brucella-Selektivsupplement SR 083,

Fa. Oxoid) wurden nach 5- und 10-tägiger microaerobischer Inkubation bei 37 °C auf Schafblut- und Brucella-Selektivagar ausgestrichen und diese 5 Tage microaerob bei 37 °C inkubiert.

Zur Ermittlung verdächtiger Kolonien (klein, grauweiß, rund, glänzend) wurden die Kulturen mit einem Plattenmikroskop geprüft. Handelte es sich bei anschließenden Tests um Gram-negative, Stamp-positive, Katalase- und Oxidase-positive sowie Harnstoffspaltende Bakterien, wurden diese zur endgültigen Bestätigung mittels PCR untersucht.

Alle isolierten Brucellen-Stämme wurden zur Erregertypisierung an das Nationale Referenzlabor für Brucellose in Jena geschickt.

2.3 PCR

Die Nukleinsäure-Extraktion erfolgte aus Organmaterial bzw. aus Kulturen mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Fa. Roche). Die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde nach Kulakov *et al.* (1992) als Screening-Methode zum Nachweis von *Brucella* spp.-DNA durchgeführt.

Die Detektion des 700 bp großen Produktes erfolgte nach Elektrophorese im Agarosegel anhand der Basenpaarlänge.

Alternativ wurde die PCR nach Baily *et al.* (1992) eingesetzt, die mit einem 224 bp-Produkt sensitiver war, jedoch unter unseren Laborbedingungen aus Organmaterial teilweise auch unspezifische, etwas größere Amplifikate generierte.

Zur Bestätigung wurde in diesen Fällen eine Restriktion mit HaeIII verwendet, welche aus der *Brucella suis*-Referenz Restriktionsfragmente von 128, 80 und 16 bp erzeugt.

Beide PCR sind ursprünglich lediglich zur Identifizierung von Kulturen, nicht zum *Brucella* spp.-Nachweis aus Organmaterial vorgesehen.

3 Ergebnisse

In 26 Fällen von insgesamt 888 Einsendungen konnte aufgrund von Erreger- und/oder Genomnachweisen die Diagnose Brucellose bzw. Brucelleninfektion gestellt werden. Das entspricht einer Häufigkeit von 2,9 %.



Abb. 1: Herdförmig-nekrotisierende Orchitis, rechts unveränderter Hoden



Abb. 2: Eitrig-nekrotisierende Orchitis, links unveränderter Hoden



Abb. 3: Eitrige Epididymitis



Abb. 4: Nebenhodenabszesse

3.1 Pathologisch-anatomisch und histologisch

Pathologisch-anatomische Veränderungen lagen bei insgesamt 14 Probeneinsendungen vor. Hierbei handelte es sich ausschließlich um eingesandte Hoden und Nebenhoden erlegter Keiler, während die seziierten Tierkörper keine Anzeichen einer Brucelleninfektion zeigten, und auch die weiterführenden Untersuchungen in diesen Fällen negativ für Brucellen verliefen.

Typische Organveränderungen waren herdförmig-nekrotisierende Orchitiden, eitrig-nekrotisierende Orchitiden mit Umwandlung des Hodenparenchyms in eine mörtelartige Masse, Epididymitiden, Nebenhodenabszesse und Hodenatrophie (Abbildungen 1 bis 5). Bei einigen Hoden fanden sich Nebenhodenzysten, denen aber keine weitere pathologische Bedeutung beigemessen wurde.

Histologische Veränderungen lagen in Form von geringgradigen herdförmigen Tubulusepitheldegenerationen bis hin zu hochgradigen multifokalen pyogranulomatösen Entzündungsprozessen vor (Abbildung 6).

3.2 Bakteriologisch und molekularbiologisch

Ein bakteriologischer Erregernachweis gelang in 17 Fällen. 14 Mal konnten Brucellen aus dem Direktausstrich, 3 Mal erst aus der Anreicherungskultur isoliert werden.

Die Erregertypisierungen am Nationalen Referenzlabor für Brucellose ergaben in allen Fällen *Brucella suis* Biotyp 2. Molekulare Feintypisierungen zeigten allerdings Unterschiede zu den Isolaten aus den betroffenen Freilandhaltungsbetrieben (Roost *et al.*, 2010). Die PCR erbrachte insgesamt 20 Mal ein positives Ergebnis. Bei 11 Einsendungen gelang sowohl der Genomnachweis mittels PCR als auch die bakteriologische Erregerisolierung.

Der Erreger- und/oder Genomnachweis gelang sowohl aus pathologisch veränderten Hoden und Nebenhoden als auch aus unveränderten. So konnte bei den 14 pathologisch-anatomisch veränderten Hoden die Verdachtsdiagnose Brucellose in allen Fällen mit bakteriologischen und/oder molekularbiologischen Methoden bestätigt werden, während bei 12 Hoden Brucellen und/

oder deren Genom nachgewiesen wurden, die makroskopisch keine Veränderungen zeigten. Hier konnte in 5 Fällen allein der Erreger isoliert werden, 5 Mal war nur die PCR positiv, und bei 2 Hodeneinsendungen gelangen sowohl der bakteriologische Erreger- als auch der molekularbiologische Genomnachweis.

In Tabelle 1 sind die 26 Fälle, in denen ein Erreger- und/oder Genomnachweis erfolgte, dargestellt.

4 Diskussion

Es wurden insgesamt 855 Hodeneinsendungen und 33 Tierkörper pathologisch, bakteriologisch und molekularbiologisch untersucht. Es konnte sowohl bei pathologisch veränderten Hoden als auch bei solchen, die in der Sektion ohne besonderen Befund blieben, eine Brucelleninfektion nachgewiesen werden.

Die Nachweisrate von 2,9 % überstieg die Erwartungen besonders aus dem Grund, dass 46 % der Hoden, bei denen Brucellen und/oder deren Genom nachgewiesen werden konnten, makroskopisch völlig unverändert erschienen. Gründe hierfür könnten eine frische Infektion sein, bei der es noch zu keinen Organveränderungen gekommen war, oder der ursprüngliche »Herd« ist in anderen Organen zu suchen. So zeigte sich beispielsweise bei Untersuchungen aus den USA von *Stoffregen et al.* (2007), bei denen 80 Wildschweine mit Fallen gefangen, euthanasiert, seziiert und mit bakteriologischen, serologischen und molekularbiologischen weiterführenden Methoden untersucht wurden, dass ein Erregernachweis am erfolgreichsten aus akzessorischen Geschlechtsdrüsen und Lymphknoten gelang.

Daraus ergibt sich auch die Möglichkeit, dass eventuell bei weiteren Wildschweinen dieses Programms ein Erreger- und/oder Genomnachweis gelingen wäre, wenn zusätzlich Organe wie Lymphknoten, Samenblasendrüse, Harnröhrenzweibeldrüse und Prostata untersucht worden wären. Da dieses Programm aber nur unter Mithilfe der Jägerschaft möglich war, blieb die Probennahme auf Hoden und Nebenhoden beschränkt.

Bei 54 % der *Brucella*-positiven Hoden lagen bei der Sektion typische patholo-



Abb. 5: Hodenatrophie, links unveränderter Hoden

gisch-anatomische Veränderungen vor. Eine wichtige Erkenntnis ist die, dass bei allen Hoden mit typischen makroskopischen Veränderungen auch ein Erreger- und/oder Genomnachweis gelang. Das heißt für die Auswahl von Untersuchungsmaterial, dass unbedingt solche Tiere zur Untersuchung gelangen sollten, bei denen schon äußerlich Hodenveränderungen wie Asymmetrien festzustellen sind. Somit könnte durch gezielte Probennahme eine Vorselektion erfolgen, Ressourcen gespart und effektiv ein Überblick über das Krankheitsgeschehen im Schwarzwildbestand geschaffen werden.

Die im Untersuchungsprogramm angewandten PCR-Methoden sind ursprünglich nicht für den DNA-Nachweis aus Organmaterial vorgesehen, sondern für die Abklärung *Brucella*-verdächtiger Bakterienkulturen. Die Tatsache, dass aus Organmaterial mittels PCR mehr Brucellen-Infektionen nachgewiesen werden konnten als mit der bakteriologischen Direktkultur, zeigt aber, dass sowohl die PCR nach *Baily et al.* (1992) als auch die nach *Kulakov et al.* (1992) an Organmaterial sehr gut funktioniert. Weiterhin bietet sie den Vorteil der sehr schnellen Er-

gebnisfindung.

Von 17 bakteriologischen Brucellenachweisen gelang die Erregerisolierung in 3 Fällen erst nach der Anreicherungskultur. Es sollte daher zum bakteriologischen Nachweis von *B. suis* neben der Direktkultur (aerob und microaerob) auf Hammelblutagar und *Brucella*-Selektivagar eine Anreicherungskultur über mindestens zehn Tage durchgeführt werden.

5 Fazit

Zusammenfassend ist zu sagen, dass *Brucella suis* in der Wildschweinpopulation Mecklenburg-Vorpommerns nach unseren Untersuchungen mit einer Erreger-Prävalenz von 2,9 % vorhanden ist. Das Schwarzwild stellt als Erregerreservoir durchaus eine potentielle Gefahr für Hausschweinebestände dar. Da molekulare Feintypisierungen der aus Wildschweinproben gewonnenen Isolate aber Unterschiede zu denen aus betroffenen Freiland Schweinehaltungen zeigten (*Roost et al.*, 2010), konnte anhand dieser Untersuchungen eine direkte Übertragung aus der Schwarzwildpopulation auf im Freiland gehaltene Hausschweine nicht bewiesen werden.

Was die Methodik betrifft, so sollte die Brucellen-Diagnostik mit verschiedenen Methoden als Komplexuntersuchung durchgeführt werden, wobei die Wahl der entsprechenden Methoden vom Untersuchungsziel abhängt.

Danksagung

Wir danken Herrn Dr. Falk Melzer, Friedrich Loeffler Institut, Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen, Nationales Referenzlabor für Brucellose für die Durchführung der Erregertypisierungen und die gute Zusammenarbeit.

Literatur

- Baily, G. G., Krahn, J. B., Drasar, B. S., Stoker, N. G. (1992): Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* 95 (4), 271-275.
- Dedek, J. (1983): Zur Epizootiologie der Schweinebrucellose unter besonderer Berücksichtigung von Erregerreservoirien. *Mh. Vet. Med.* 38, 852-856.
- Fenske, G., Pulst, H. (1973): Die epizootiologische Bedeutung der Hasen- und Wildschweinbrucellose. *Mh. Vet. Med.* 28, 537-541.
- Godfroid, J., Cloeckaert A., Liautard, J. P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B., Letesson, J. J. (2005): From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Review. Vet. Res.* 36 (3), 313-26.
- Hofer, E., Reisp, K., Revilla-Fernandez, S., Plicka, H., Romanek, G., Bago, Z., Winter, P., Köfer, J. (2010): Isolierung von *Francisella tularensis* und *Brucella suis* beim Rotfuchs. *Tierärztl. Umschau* 65 (6), 229-232.
- Kulakov, Y. K., Gorelov, V. N., Motin, V. L., Brukhansky, G. V., Skavronskaya, A. G. (1992): A highly sensitive nonisotopic DNA hybridization system using amplification (polymerase chain reaction) for identification and indication of brucella. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusisol.*, (7-8), 23-27.
- Melzer, F., Lohse, R., Nieper, H., Liebert, M., Sachse, K. (2006): A serological study on brucellosis in wild boars in Germany. *Eur. J. Wildl. Res.* 53, 153-157.
- Pannwitz, S. (1984): Serologische Übersichtsuntersuchungen auf Brucellose bei Wildschweinen. *Mh. Vet. Med.* 39, 627-628.
- Roost, H., Seelmann, M., Konow, M., Klopries, M., Melzer, F., Wölk, R., Kay, M., Dey, E., Mildner, H., Heyne, H. (2010): Untersuchungen zur Früherkennung und Überwachung der Schweinebrucellose (*Brucella suis*) in Freilandhaltungen in Mecklenburg-Vorpommern. *Tierärztl. Umschau* 65 (7-8), 278-284.
- Stoffregen, W. C., Olsen, S. C., Wheeler, C. J., Bricker, B. J., Palmer, M. V., Jensen, A. E., Halling, S. M., Alt, D. P. (2007): Diagnostic characterization of feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 227-237.

Korrespondenzadresse:

Dr. Sascha Gerst, Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V), Thierfelderstraße 18, 18059 Rostock, Sascha.Gerst@lallf.mvnet.de

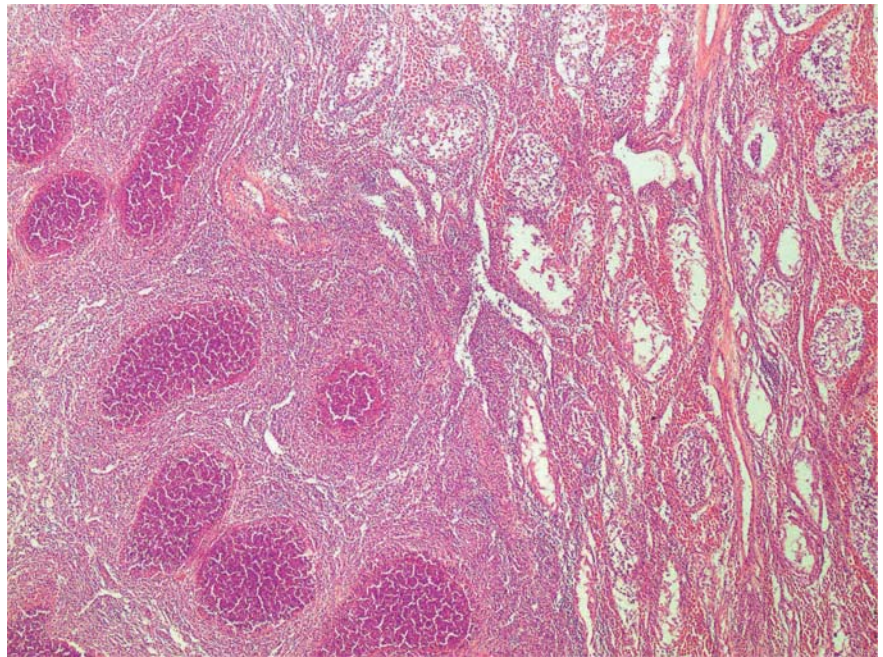


Abb. 6: Pyogranulomatöse Orchitis (links im Bild)

Tabelle 1: Untersuchungsergebnisse der Hodeneinsendungen mit Brucellennachweis

pathologisch-anatomisch	PCR	bakteriologisch	
		Direktausstrich	Anreicherungskultur
o.b.B.	pos.	neg.	neg.
o.b.B.	pos.	neg.	neg.
o.b.B.	pos.	neg.	neg.
o.b.B.	pos.	neg.	neg.
o.b.B.	pos.	neg.	n.d.
o.b.B.	neg.	neg.	pos.
o.b.B.	neg.	pos.	pos.
o.b.B.	n.d.	pos.	n.d.
o.b.B.	n.d.	pos.	n.d.
o.b.B.	pos.	pos.	n.d.
o.b.B.	n.d.	pos.	pos.
o.b.B.	pos.	pos.	n.d.
eitrige Epididymitis	pos.	pos.	pos.
abszedierende Epididymitis	pos.	neg.	neg.
abszedierende Epididymitis	neg.	neg.	pos.
abszedierende Epididymitis	pos.	neg.	pos.
abszedierende Epididymitis	pos.	pos.	n.d.
eitrig-abszedierende Epididymitis	pos.	pos.	pos.
nekrotisierende Orchitis, abszedierende Epididymitis	pos.	pos.	pos.
eitrig-nekrotisierende Orchitis, Epididymitis	pos.	neg.	neg.
eitrig-nekrotisierende Orchitis, abszedierende Epididymitis	pos.	neg.	neg.
eitrig-nekrotisierende Orchitis, Epididymitis	pos.	pos.	pos.
eitrig-nekrotisierende Orchitis, eitrig-e Epididymitis	pos.	pos.	pos.
eitrig-nekrotisierende Orchitis, Epididymitis	pos.	pos.	pos.
Atrophie	pos.	neg.	neg.
Atrophie, eitrig-nekrotisierende Orchitis	pos.	pos.	pos.

pos.: positiv; neg.: negativ; o.b.B.: ohne besonderen Befund; n.d.: nicht durchgeführt