FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Amtliche Methodensammlung

Rauschbrand
(Clostridium chauvoei)

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Rauschbrand (*Clostridium chauvoei*)

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Der Rauschbrand ist eine seuchenhaft und akut verlaufende, infektiöse, aber nicht kontagiöse Gasödemkrankheit, die meist junge Rinder sowie gelegentlich Schafe bzw. Ziegen befällt und durch die metastatische Bildung von Gasödemen in den großen Muskelpartien gekennzeichnet ist. Der Erreger, *Clostridium (C.) chauvoei* (manchmal auch als *C. feseri* bezeichnet) ist ein grampositives, endosporenbildendes, anaerobes Stäbchenbakterium. Die Infektion des Rindes erfolgt meist über den Verdauungstrakt, die *C. chauvoei*-Infektion des Schafes ist dagegen eine Wundinfektion. Der seuchenhafte Verlauf beim Rind macht die vorrangige Bekämpfung des Rauschbrandes gegenüber den anderen Clostridieninfektionen erforderlich.

1.2 Klinische Symptomatik

Gasig-knisternde, "rauschende" Schwellungen an Hals, Schulter, Rücken, Oberschenkel, zugleich schwere Allgemeinstörungen. Tod meist schon nach mehreren Stunden, Krankheit dann erst feststellbar. Bei Schafen tritt Rauschbrand vorwiegend als reine Wundinfektionskrankheit auf, z. B. nach Verletzungen, bei Geburten, als Folge von Hundebissen oder nach dem Scheren. Auch hier knisternde Anschwellungen.

1.3 Differentialdiagnose

Andere Gasödemerreger, insbesondere von *C. septicum*, dem Erreger des Pararauschbrandes. *C. septicum* verursacht bei Schafen Wund- und Geburtspararauschbrand, tritt aber auch bei anderen Tieren als Gasödemerreger in Erscheinung. Bei den Gasödeminfektionen sind weitere Clostridienspezies, besonders *C. novyi, C. perfringens, C. histolyticum, C. sordellii* und *C. fallax* differentialdiagnostisch zu berücksichtigen. Des Weiteren ist Milzbrand auszuschließen.

1.4 Diagnostische Indikation

Abklärung eines Verdachts und/oder Feststellung eines Rauschbrandausbruchs gemäß Verordnung zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand ~~vom 23. Mai 1991 (BGBl. I S. 1172)~~ in der jeweils geltenden Fassung

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Staatliche Veterinäruntersuchungsämter sowie NRL Rauschbrand am FLI, Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen, Jena

1.6 Rechtsgrundlagen

- Tiergesundheitsgesetz in der jeweils geltenden Fassung
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils geltenden Fassung
- Verordnung zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand ~~vom 23. Mai 1991 (BGBl. I S. 1172)~~ in der jeweils geltenden Fassung.

~~Bislang gibt es keine zugelassenen Diagnostika, daher ist jeweils eine Ausnahmegenehmigung der zuständigen obersten Landesbehörde notwendig.~~

2. Untersuchungsmaterial

Aufgrund des schnellen und meist letalen Krankheitsverlaufes konzentriert sich die Diagnose fast ausschließlich auf postmortale Nachweisverfahren. Bei Tieren, die später als 24 Stunden *post mortem* zur Sektion gelangen, ist eine exakte Diagnosestellung infolge der schnellen postmortalen Zersetzung des Gewebes und Einwanderung verschiedener Clostridienspezies ("*post-mortem*-invader") erschwert. Bei Gasödeminfektionen sind typisch veränderte Gewebeproben möglichst schnell steril zu entnehmen. Die Aufbewahrung der Proben erfolgt bei 4 °C. Bei längerer Lagerdauer (> 24 h) empfiehlt sich die Aufbewahrung bei -20 °C, ggf. können Gewebeproben (haselnussgroße Stücke) auch in Alkohol konserviert werden.

Einsendungen an das Labor:

Bitte verwenden Sie das Einsendeformular, das auf der Internetseite des Labors zu finden ist: https://www.fli.de/de/institute/institut-fuer-bakterielle-infektionen-und-zoonosen-ibiz/referenzlabore/nrl-fuer-rauschbrand/.

3. Untersuchungsgang

3.1 Bakteriologische Untersuchung, kultureller Nachweis

Clostridien haben die Fähigkeit zur Bildung von Endosporen, die im Direkt- (Original-)Präparat mittels Gramfärbung oder Sporenfärbung nachweisbar sind und bereits wichtige Orientierungen geben können.

Die primäre Anzucht von Clostridien aus Untersuchungsmaterial erfolgt vorwiegend auf festen Nährböden als anaerobe Oberflächenkultur. Ergänzend können flüssige Anreicherungskulturen angelegt werden, die nach erfolgtem Wachstum zur Bakterienisolierung auf feste Medien ausgeimpft werden.

Eine selektive Anzüchtung von Clostridien, die in flüssigem Untersuchungsmaterial bzw. Aufschwemmung von festem Material in Sporenform vorkommen, kann nach Erhitzen der Proben für 15 Minuten bei 75 °C erfolgen. Alternativ kann auch eine Sporenselektion mit Ethanol vorgenommen werden, hierbei sollte das Verhältnis Ethanol / Probenmaterial etwa 70 / 30 betragen.

Rauschbrand (*Clostridium chauvoei*)

Kulturmedien

Für die Anzucht, Isolierung und Differenzierung werden Nährmedien verwendet, auf denen *C. chauvoei* optimal wächst und charakteristische Wuchseigenschaften zeigt:

- Blutagar (Nähragar (z. B. Sifin) mit 5 % Kälberblut)
- Hefeextrakt-Cystein-Agar mit Schafblut nach Beerens (z. B. Oxoid PB5101A)
- Schaedler-Agar (z. B. Oxoid PB5034A)
- Laktose-Eigelb-Agar (Anhang): zur Beurteilung einiger Identifizierungsmerkmale, wie Laktosespaltung, Lecithinase- und Lipasebildung.
- Geeignete flüssige Kulturmedien sind:
- Bouillon nach Selzer (Anhang)
- RCM (Reinforced Clostridium Medium, z. B. Merck 105411)
- Leber-Leberbouillon nach Tarozzi (Anhang)

Selektivmedien sind im Handel erhältlich, haben sich aber nur für wenige Clostridienspezies bewährt, da durch die Empfindlichkeit der meisten Clostridien gegenüber den in den Nährböden befindlichen Hemmstoffen die Keimzahl stark reduziert wird.

Kulturbedingungen

Die Bebrütung erfolgt unter anaeroben Verhältnissen, d. h. in Anaerobiertöpfen unter Einsatz von Gas-Entwickler-Kits (Gas Pak [BBL], Anaerocult A [Merck], AnaeroGen [Oxoid]) oder der Gasaustauschtechnik bzw. in Anaerobier-Brutschränken. Es empfiehlt sich, die Anaerobiose im Kulturgefäß durch Mitführen eines Redoxindikators (z. B. Resazurin Anaerobierindikator BR0055B, Oxoid) zu prüfen. Eine Vorreduzierung der Agarplatten im Anaerobiergefäß verbessert das Wachstum und damit die Isolierungsrate. Die flüssigen Nährmedien sollen unmittelbar vor der Verwendung 10 Minuten ausgekocht und wieder abgekühlt werden.
Da die meisten Clostridienspezies relativ schnell wachsen, kann die Ablesung der Kulturplatten bzw. Kontrolle der Bouillonkulturen nach einer anaeroben Bebrütung von 1 bis 3 Tagen bei 37 °C erfolgen.

Identifizierung und Differenzierung

C. chauvoei ist ein grampositives, endosporenbildendes, anaerobes Stäbchenbakterium. Wie die meisten Clostridien bildet *C. chauvoei* auf festen Nährböden oder in flüssigen Medien Sporen, die im Phasenkontrastmikroskop oder mittels Gram- bzw. Sporenfärbung nachgewiesen werden können. In älteren Kulturen treten auch gramlabile Stäbchen auf. *C. chauvoei* wächst als strikter Anaerobier nicht auf aerob bebrüteten Nährböden.
Auf Blutagar bildet *C. chauvoei* nach 24 bis 48 Stunden kleine (1 bis 2 mm), runde, flache bis leicht gewölbte, meist durchsichtige Kolonien mit deutlicher (beta-)Hämolyse. Weitere Wuchsformen wie gelappter Rand, unregelmäßiger Rand, wurzelförmige Ausläufer, Kolonien mit Randwulst, radiäre Oberflächenstruktur, graue Koloniefarbe, beige Koloniefarbe und weitere, atypische Wuchsformen können vorkommen.

Auf Schaedler-Agar und auf Hefeextrakt-Cystein-Agar mit Schafblut nach Beerens bildet *C. chauvoei* nach 24 bis 48 Stunden etwas größere Kolonien als auf Blutagar, die (beta-)Hämolyse ist ebenfalls deutlich ausgeprägt, die Kolonien erscheinen weiß bis grau, auf Hefeextrakt-Cystein-Agar matt, die Kolonieform variiert.
Auf Laktose-Eigelb-Agar wächst *C. chauvoei* Lactose positiv (gelb), Lipase (perlmuttartiges Schillern) und Lecithinase (Trübung des NB) negativ.
C. septicum wächst auf Blutagar meist als Bakterienrasen mit schwacher Hämolyse, ebenfalls häufig zu beobachten sind durchsichtige Kolonien unterschiedlicher Größe, unregelmäßiger Rand, wurzelförmige Ausläufer. Atypische Wuchsformen, wie bei *C. chauvoei* beschrieben, können vorkommen.
Auf Schaedler-Agar wächst *C. septicum* meist als Bakterienrasen mit unvollständiger Hämolyse.
Auf Hefeextrakt-Cystein-Agar mit Schafblut nach Beerens bildet *C. septicum* meist keinen Rasen und bildet nach 24 bis 48 Stunden relativ große, weiß-graue Kolonien, die im Zentrum teilweise erhaben sind, der Kolonierand, bisweilen auch die ganze Kolonie, erscheint matt.
Auf Laktose-Eigelb-Agar wächst *C. septicum* Lactose positiv (gelb), Lipase (perlmuttartiges Schillern) und Lecithinase (Trübung des NB) negativ.

Die weitere biochemische Prüfung kann in einem Fermentations-Basis-Medium mit Zuckerzusatz (Schau, 1988, Anhang) erfolgen. Die Bebrütung erfolgt mindestens 3 bis 5 Tage anaerob bei 37 °C. Die beiden Erreger gleichen sich in vielen Eigenschaften. Nach Bergey's Manual of Systematic Bacteriology lässt sich *C. chauvoei* am einfachsten durch die Fermentation von Saccarose und die ausbleibende Verstoffwechselung von Cellobiose und Trehalose von *C. septicum* unterscheiden.
Weitere differentialdiagnostisch bedeutsame Clostridienspezies sind *C. novyi*, *C. perfringens*, *C. histolyticum*, *C. sordellii* und *C. fallax*. Sie können durch das Wachstum auf Laktose-Eigelb-Agar und weitere Reaktionen in der Bunten Reihe abgegrenzt werden.
Da die biochemische Prüfung aufwändig ist, und bei schlechtem oder ausbleibendem Wachstum im Basis-Medium die Prüfparameter falsch negativ beurteilt werden können, ist ggf. eine weiterführende Speziesdifferenzierung durch Sequenzierung eines Teilstücks der 16S-rDNA zu empfehlen. Geeignete Primer (16SUNI-R und 16SUNI-L) und ein Amplifikationsverfahren sind beschrieben worden (Kuhnert *et al.*, 1996).

Tabelle 1: Differenzierung von *C. chauvoei* und *C. septicum* (modif. nach Al-Khatib, 1969)

Merkmale	*C. chauvoei*	*C. septicum*
Biochemie		
Saccharose	+	-
Cellobiose	-	+
Trehalose	-	+
Salicin	-	+/-
Äskulin	-	+
Immunfluoreszenz		
C. chauvoei	+	-

Rauschbrand (*Clostridium chauvoei*)

C. septicum	-	+

3.2 Nachweis durch direkte Immunfluoreszenz

In der Routinediagnostik ist der direkte Fluoreszenztest zum Nachweis von *C. chauvoei* geeignet, der Nachweis von *C. septicum* fällt nach Erfahrungen des NRL nicht für alle Stämme positiv aus. Entsprechende Antiseren werden angeboten (Anhang). Es können sowohl Organ-Abklatsch-Präparate als auch Kulturen (möglichst nach ca. 24 Stunden anaerober Inkubation) untersucht werden. Entsprechende Positiv- und Negativkontrollen sind mitzuführen. Bezüglich der Durchführung wird auf die Angaben des Herstellers verwiesen.

3.3 Nukleinsäurenachweis in der PCR

Zum Nachweis von *C. chauvoei* und *C. septicum* mittels PCR eignen sich DNA-Präparationen aus Gewebeproben und aus Kulturmaterial. Die DNA kann durch Extraktion mit kommerziell erhältlichen DNA-Extraktionskits nach Angaben der Hersteller gewonnen werden (z. B. DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen).

Nachweis von *C. chauvoei*

Die PCR-Methode nach Sasaki *et al.*, 2000 ermöglicht den spezifischen Nachweis von *C. chauvoei*. Die hierfür verwendeten PCR-Primersequenzen ermöglichen die Amplifikation eines 509 bp. Fragmentes der 16-23S-rDNA Spacerregion aus dem Genom von *C. chauvoei*.

Literatur:

Sasaki *et al.*, 2000. Rapid and direct detection of *Clostridium chauvoei* by PCR of the 16S-23S rDNA spacer region and partial 23S rDNA sequences. *J. Vet. Med. Sci.* 62 (12): 1275-1281.

Primer: IGSC4: 5` - GAATTAAAACAACTTTATTAACAAATG - 3`

Primer: 23UPCH: 5` - GGATCAGAACTCTAAACCTTTCT - 3`

Kontroll-DNA (*Clostridium chauvoei*)

Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an die Angaben in Sasaki *et al.*, 2000. Pro Reaktionsansatz wird ein Volumen von 50 µl und eine Hot-Start-Polymerase (Qiagen) verwendet. Die Reagenzienzusammensetzung für einen Reaktionsansatz ist in dem Musterprotokoll aufgeführt. Für jeden durchzuführenden PCR-Ansatz werden mindestens zwei Kontrollen mitgeführt: 1) Für die Positivkontrolle wird DNA des Typstammes von *C. chauvoei* (ATTC 10092) verwendet. 2) Als Negativkontrolle (Reagenzienkontrolle) wird dem Reaktionsansatz anstelle von DNA lediglich Reinstwasser zugefügt. Es kann das in dem PCR-Musterprotokoll aufgeführte Temperatur-Zeit-Profil mit der entsprechenden Zyklusanzahl verwendet werden.

PCR - Mix (für eine 50 µl Reaktion)		Arbeits-konzentration	Programm				
5	µl Puffer (10 x) (inkl. 15 mM $Mgcl_2$)	1x	Init.Denaturierung	14	Min	95	ºC
1	µl dNTP-Mix (10 mM)	0,2 mM					
2,5	µl Primer IGSC4 (10µM)	0,5 µM	Denaturierung	1	Min	95	ºC
2,5	µl Primer 23UPCH (10µM)	0,5 µM	Annealing	1	Min	55	ºC
0,25	µl *Taq*-Pol. (5 U/µl)	0,025 U/µl	Elongation	1	Min	72	ºC
37,75	µl H_2O		Finale Extension	5	Min	72	ºC
			Kühlung			8	˚C
			Zyklenzahl		35		

Eine DNA-Probe in einem PCR-Reaktionsansatz gilt als positiv getestet, wenn bei der nachfolgend durchgeführten gelelektrophoretischen Untersuchung 1.) ein Amplifikat mit einer Fragmentlänge von 509 bp nachgewiesen werden kann, 2.) kein Amplifikationsprodukt bei der Negativkontrolle vorhanden ist, 3.) bei der Positivkontrolle ein Amplifikationsprodukt mit einer Fragmentgröße von 509 bp. nachgewiesen werden konnte. Eine DNA-Probe gilt als negativ getestet, wenn kein Amplifikat nachgewiesen werden konnte und die Positiv- und Negativkontrollen eindeutig positiv bzw. negativ sind. Falls die Kontrollreaktionen keine eindeutigen Ergebnisse geben, ist der Ansatz zu wiederholen.

Nachweis von *C. chauvoei* und *C. septicum*

Die PCR-Methode nach Sasaki *et al.*, 2001 ermöglicht den spezifischen Nachweis von *C. chauvoei* und *C. septicum* bzw. die Diskriminierung beider Spezies. Das hierfür verwendete PCR-Primerpaar ermöglicht die Amplifikation eines 522 bp. Fragmentes der 16-23S-rDNA Spacerregion aus dem Genom von *C. chauvoei*, bzw. die Amplifikation eines entsprechenden 594 bp. Fragmentes aus dem Genom von *C. septicum*.

Literatur:

Sasaki *et al.*, 2001. Amplification of the 16-23S rDNA spacer region for rapid detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Research in Veterinary Science*, 71: 227-229

Primer: IGSCS: 5` - GAAAATTGCACATGAATTAAA - 3`

Primer: 23UPCH: 5` - GGATCAGAACTCTAAACCTTTCT - 3`

Kontroll-DNA (*Clostridium chauvoei*)

Kontroll-DNA (*Clostridium septicum*)

Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an die Angaben in Sasaki *et al.*, 2001. Pro Reaktionsansatz wird ein Volumen von 50 µl und eine Hot-Start-Polymerase (Qiagen) verwendet. Die Reagenzienzusammensetzung für einen Reaktionsansatz ist in dem Musterprotokoll aufgeführt. Für jeden durchzuführenden PCR-Ansatz werden mindestens drei Kontrollen mitgeführt: 1.) und 2.) Für die beiden Positivkontrollen wird jeweils DNA der Typstämme von *Clostridium chauvoei* (ATTC 10092) und *Clostridium septicum* (ATTC 12464) verwendet.

3.) Als Negativkontrolle (Reagenzienkontrolle) wird dem Reaktionsansatz anstelle von DNA lediglich Reinstwasser zugefügt. Es kann das in dem PCR-Musterprotokoll aufgeführte Temperatur-Zeit-Profil mit der entsprechenden Zyklusanzahl verwendet werden.

PCR - Mix (für eine 50 µl Reaktion)		Arbeits-konzentration	Programm				
5	µl Puffer (10 x) (inkl. 15 mM $Mgcl_2$)	1x	Init. Denaturierung	14	Min	95	°C
1	µl dNTP-Mix (10 mM)	0,2 mM					
2,5	µl Primer IGSCS (10µM)	0,5 µM	Denaturierung	1	Min	95	°C
2,5	µl Primer 23UPCH (10µM)	0,5 µM	Annealing	1	Min	55	°C
0,25	µl *Taq*-Pol. Hotstart(5 U/µl)	0,025 U/µl	Elongation	1	Min	72	°C
37,75	µl H_2O		Finale Extension	5	Min	72	°C
			Kühlung			8	°C
			Zyklenzahl		35		

Eine DNA-Probe gilt als positiv getestet auf *C. chauvoei* bzw. *C. septicum*, wenn bei der nachfolgend durchgeführten gelelektrophoretischen Untersuchung 1.) ein Amplifikat mit einer Fragmentlänge von 522 bp (bei *C. chauvoei*) bzw. von 594 bp (bei *C. septicum*) nachgewiesen werden kann, 2.) kein Amplifikationsprodukt bei der Negativkontrolle vorhanden ist, 3.) bei den Positivkontrollen jeweils Amplifikationsprodukte mit einer Fragmentgröße von 522 bp. und 594 bp nachgewiesen werden konnten. Eine DNA-Probe gilt als negativ getestet, wenn kein Amplifikat nachgewiesen werden konnte und die Positiv- und Negativkontrollen eindeutig positiv bzw. negativ sind. Falls die Kontrollreaktionen keine eindeutigen Ergebnisse geben, ist der Ansatz zu wiederholen.

3.4 Nukleinsäurenachweis in der Real-Time PCR

Zum Nachweis von *C. chauvoei* und *C. septicum* mittels Real-Time PCR eignen sich DNA-Präparationen aus Gewebeproben und aus Kulturmaterial. Die DNA kann durch Extraktion mit kommerziell erhältlichen DNA-Extraktionskits nach Angaben der Hersteller gewonnen werden (z. B. DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen).

Die Real-Time PCR nach Lange *et al.*, 2010 ermöglicht den spezifischen Nachweis von *Clostridium chauvoei* und/oder *Clostridium septicum*. Bei dieser Real-Time PCR wird ein 149 bp Fragment des *spo0A* Genes von *C. chauvoei* bzw. *C. septicum* unter Verwendung der Primer RT-SpoF und RT-SpoR amplifiziert. Die PCR-Produkte beider Clostridienarten werden daraufhin jeweils während des PCR-Laufes mittels einer spezies-spezifischen HEX- bzw. FAM-markierten DNA-Sonde (RT-chau, RT-sept) detektiert. Bei jedem Reaktionsansatz wird eine interne Amplifikationskontroll-DNA (IAC) mitgeführt, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen, die auf PCR-inhibierende Substanzen zurückzuführen sind. IAC ist ein 712 bp Fragment des Vektors pEGFP-1 (BD Bioscience Clontech), welches unter Verwendung der Primer EGFP-15F und EGFP-10R generiert

werden kann (siehe Hoffmann *et al.*, 2006). Unter Verwendung der IAC-DNA und der Primer EGFP-1-F und EGFP-2-R, wird während der Amplifikation ein 132 bp Fragment gebildet, welches spezifisch mit der CY5-markierten EGFP-Sonde detektiert wird.

Literatur:

M. Lange, H. Neubauer, C. Seyboldt., (2010): Development and validation of a multiplex Real-Time PCR for detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Molecular and Cellular Probes*; 24:204-10

B. Hoffmann, K. Depner, H. Schirrmeier, M. Beer, (2006): A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods*; 136:200-9

Reagenzien:

Brilliant II QPCR Low ROX Master Mix (Art. Nr. 600806, Agilent Technologies, Böblingen)

PCR-Primer:

RT-SpoF (10 µM)	5`- CWCAAAGAGCTATTACTTTAGGAG -3`
RT-SpoR (10 µM)	5`- AGSTRCTTCTGTTTCTACAACTG -3`
EGFP-1-F (5 µM)	5`- GACCACTACCAGCAGAACAC -3`
EGFP-2-R (5 µM)	5`- GAACTCCAGCAGGACCATG -3`

DNA-Sonden:

EGFP (5µM):	5`- CY5 - AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA - BHQ2 -3`
RT-chau (10 µM):	5`- HEX - ACGGTGCTCCTACAGAATCCATTAGA - BHQ1 -3`
RT-sept (10µM):	5`- FAM - ATGGTGTTCCTACAGAAGCAGTTAGA - BHQ1 -3`

Kontroll-DNA: *Clostridium chauvoei* (ATTC 10092), *Clostridium septicum* (ATTC 12464)

Interne Amplifikationskontroll-DNA (IAC)

Geräte und Materialien:

MX3000p Real-Time PCR Cycler (Stratagene, Heidelberg)

PC mit MX3000p – MxPro Software (Version 4.01, Stratagene, Heidelberg)

Mx3000p Optical Strip Caps, (Agilent Technologies, Böblingen, Art. Nr. 401425)

Mx3000p Strip Tubes, (Agilent Technologies, Böblingen, Art. Nr. 401428)

Rauschbrand (*Clostridium chauvoei*)

Pro Reaktionsansatz wird ein Volumen von 25 µl verwendet. Die Reagenzienzusammensetzung für einen 25 µl Reaktionsansatz ist in dem Musterprotokoll aufgeführt. Jeder Reaktionsansatz ist mindestens doppelt anzusetzen. Für jeden durchzuführenden PCR-Lauf werden die folgenden Kontrollen mitgeführt: 1.) Als Positivkontrollen werden DNA-Präparationen der Typstämme von *Clostridium chauvoei* (ATTC 10092) und *Clostridium septicum* (ATTC 12464) verwendet. 2.) Es wird eine interne Amplifikationskontroll-DNA (IAC) mitgeführt. 3.) Als Negativekontrolle (Reagenzienkontrolle) wird dem Reaktionsansatz anstelle von Proben-DNA lediglich Reinstwasser zugefügt. Es kann das in dem PCR-Musterprotokoll aufgeführte Temperatur-Zeit-Profil mit der entsprechenden Zyklusanzahl verwendet werden.

PCR-Mastermix (für eine 25 µl Reaktion)		Arbeitskonzentr./µ Reaktionsansatz	Programm				
12.5	µl Brilliant II QPCR Low ROX Master Mix	1x	Denaturierung	10	Min	95	°C
4.0	µl H_2O						
1.0	µl Primer RT SpoF (10µM)	400 nM	Denaturierung	30	s	95	°C
1.0	µl Primer RT SpoR (10µM)	400 nM	Annealing	60	s	58	°C
1.0	µl Primer EGFP-1-F (5 µM)	200 nM					
1.0	µl Primer EGFP-2-R (5 µM)	200 nM					
0.75	µl Sonde RT-chau (10 µM)	300 nM	Zyklen	40			
0.75	µl Sonde RT-sept (10µM)	300 nM					
1.0	µl Sonde EGFP (5µM)	200 nM					
1.0	µl IAC (100 fg/µl)	4 fg					

Eine DNA-Probe in einem PCR-Reaktionsansatz gilt als positiv getestet auf *C. chauvoei* und/oder *C. septicum*, wenn 1.) der jeweilige CT-Wert 38.5 oder kleiner ist, 2.) die Reagenzienkontrolle negativ ist, 3.) die entsprechende Positivkontrolle positiv ist. Der PCR-Ansatz ist zu wiederholen, falls ein CT-Wert für die HEX- bzw. FAM-markierten DNA-Sonden bei der Reagenzienkontrolle zu beobachten ist. Bei CT-Werten von 38.5 bis 39.0 ist die PCR mit der Proben-DNA zu wiederholen und zusätzlich eine entsprechende konventionelle PCR je nach Erfordernis durchzuführen. Eine Probe gilt als negativ getestet, wenn 1.) kein CT-Wert vorliegt bzw. der CT-Wert größer als 39.0 ist, 2.) die entsprechende positive Kontroll-DNA positiv ist, und 3.) die interne Amplifikationskontrolle auf keine Inhibition bei der Amplifikationsreaktion hinweist (es liegen vergleichbare bzw. nicht wesentlich höhere CT-Werte der IAC zu den CT-Werten der anderen PCR-Reaktionsansätze vor).

Bislang gibt es keine zugelassenen Diagnostika, daher ist jeweils eine Ausnahmegenehmigung der zuständigen obersten Landesbehörde notwendig.

Literatur

Al-Khatib, G., (1969): Beiträge zur Clostridiendifferenzierung VI. Zur Differenzierung von Cl. septicum und Cl. chauvoei. Arch. exper. Vet. med. 23, 963-970.

Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2 / Peter H. A. Sneath [Hrsg.]; Mair, Nicholas S. David Hendricks Bergey [Begr.] Baltimore [u. a.]: Williams & Wilkins, 1986. ISBN: 0-683-07893-3

Hoffmann B, Depner K, Schirrmeier H, Beer M. (2006) A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods*;136:200-9

Köhler, B., (1987): Clostridien-Infektionen und -Intoxikationen. In: Beer, J.: Infektionskrankheiten der Haustiere, 3. Aufl., Teil II, S. 693-744, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

Kuhnert, P., Capaul, S.E., Nicolet, J., Frey, J., (1996): Phylogenetic positions of Clostridium chauvoei and Clostridium septicum based on 16S rRNA gene sequences. Int J Syst Bacteriol. 46(4):1174-6.

Lange, M., Neubauer, H., Seyboldt, C., (2010): Development and validation of a multiplex real-time PCR for detection of Clostridium chauvoei and Clostridium septicum. Mol Cell Probes. 24(4):204-10.

Sasaki, Y., Yamamoto, K., Amimoto, K., Kojima, A., Ogikubo, Y., Norimatsu, M., et al. (2001): Amplification of the 16S-23S rDNA spacer region for rapid detection of Clostridium chauvoei and Clostridium septicum. Res Vet Sci;71:227-9.

Sasaki, Y., Yamamoto, K., Kojima, A., Tetsuka, Y., Norimatsu, M., Tamura, Y., (2000:) Rapid and direct detection of Clostridium chauvoei by PCR of the 16S-23S rDNA spacer region and partial 23S rDNA sequences. J Vet Med Sci;62:1275-81.

Schallehn, G., (1990): Isolierung und Identifizierung von Clostridien. Zbl. Bakt. 274, 259-280.

Schau, H.-P., (1988): Clostridium. In: Bernhardt, H. u. Knoke, M.: Humanpathogene Anaerobier 1. Aufl., S. 67-90, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

Selzer, J., Hofmann, F., Rex, G., Wilm, M., Mann, M., Just, I., Aktories, K., (1996): Clostridium novyi alpha-toxin-catalyzed incorporation of GlcNAc into Rho subfamily proteins. J Biol Chem;271(41):25173-7

Anhang

SELZER Bouillon (Selzer *et al.*, 1996)

1. Rezeptur:

30 g Trypton
20 g Hefeextrakt
4 g Glukose
1 g L-Cysteinhydrochlorid
ad 1000 ml H2O dest

2. Herstellungsvorschrift:

pH 7,2 einstellen, Autoklavieren 15 min bei 121 °C

Laktose-Eigelb-Agar

Zu 500 ml fertig zubereitetem Columbia-Agar (Oxoid) werden 5 g Laktose zugegeben. Nach Lösen im Dampftopf Abkühlung auf 50 °C. Danach Zugabe von 5 ml einer 0,4%igen Bromkresolpurpurlösung und 50 ml Eigelb-Emulsion (Oxoid). Einstellen auf einen pH-Wert von 7,4.

Leber-Leberbouillon nach Tarozzi

Frische Leber von Schwein oder Rind, die von Bindegewebe befreit wurde, in bohnengroße Stücke schneiden, mit der zwei- bis dreifachen Menge Leberbouillon 30 min im Dampftopf kochen. Nach dem Abkühlen durch Faltenfilter bis zur völligen Klarheit filtrieren. Die zurückbleibenden Leberstückchen spült man unter der Wasserleitung kräftig ab, verteilt sie zu je 2 bis 3 Stück auf Reagenzgläser, übergießt sie mit der dreifachen Menge (8 bis 10 ml) der filtrierten Bouillon (pH-Wert 7,4 bis 7,8) und autoklaviert 15 min bei 120 °C.

Fermentations-Basis-Medium (Schau 1988)

Trypticase	20,0 g	
Hefeextrakt	2,0 g	
NaCl	2,5 g	
Na-Thioglykolat	0,5 g	
Cystein-Hydrochlorid	0,25 g	
Na2SO3	0,1 g	
Aqua dest.	ad 1000,0 ml	pH-Wert 7,2

Jedem Röhrchen mit 5 ml Medium werden 0,5 ml einer 10%igen sterilfiltrierten Lösung des jeweils zu prüfenden Zuckers zugegeben. Nach Beimpfen werden im Anschluss an die Bebrütung 0,1 ml Indikatorlösung hinzugegeben.

Indikator: Methylrot 0,1 g, Bromthymolblau 0,3 g, 96%iger Äthylalkohol 300 ml, Aqua dest. 300 ml.

Der Farbumschlag des Indikators von Grünblau nach Gelb bzw. Rot zeigt eine Fermentierung des betreffenden Zuckers an.

FITC Konjugate für direkten FA-Nachweis von *C. chauvoei* und *C. septicum*

Zu beziehen über:

~~QIAGEN Leipzig GmbH~~
~~(ehemals Labor Diagnostik GmbH Leipzig)~~
~~Deutscher Platz 5b · D-04103 Leipzig~~
~~Tel.: +49 (0)341/12454 0~~
~~Fax: +49 (0)341/12454 60~~
~~www.lab-leipzig.de~~
~~info@lab-leipzig.de~~

INDICAL BIOSCIENCE GmbH
Deutscher Platz 5b
04103 Leipzig
Germany
Tel.: + 49 341 12454 26, + 49 341 12454 0
Fax: + 49 341 12454 60
www.indical.com

VMRD Produktkatalog ~~2014~~
Katalog-Nr.
C. chauvoei FA Konjugat 1 ml
CJ-F-CCO-1ML
C. septicum FA Konjugat 1 ml
CJ-F-CSE-1ML

Typstämme

Clostridium chauvoei, Bezeichnung verschiedener Sammlungen: DSM-7528, ATCC 10092, NCIMB 10665
Clostridium septicum, Bezeichnung verschiedener Sammlungen: DSM-7534, ATCC 12464, CIP 61.10, NCIMB 547, NCTC 547

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald – Insel Riems, www.fli.de