

Schlussbericht

Verbundprojekt

Chipbasiertes Detektionssystem für den Nachweis von Tierseuchen

(ATLAS: **A**utonomes-**T**ierseuchen-**L**ab-on-a-**C**hip-**S**ystem)

Im Rahmen der Bekanntmachung
Detektionssysteme für chemische, biologische, radiologische, nukleare und explosive
Gefahrstoffe (CBRNE-Gefahren) im Sicherheitsforschungsprogramm der Bundesregierung

Teilvorhaben

Grundlegende Untersuchungen für ein Lab-on-a-Chip-System zum vor-Ort-Nachweis von Rauschbrand

Gefördert durch das BMBF
FKZ 13 N 9520

Laufzeit: 01.11.07 - 31.01.11

Autoren:

Christian Seyboldt, Martin Lange
Friedrich-Loeffler-Institut FLI
Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen
NRL Rauschbrand

Inhalt

I Kurze Darstellung	3
1. Aufgabenstellung	3
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	3
3. Planung und Ablauf des Vorhabens	4
4. Wissenschaftlich-technischer Stand	6
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	7
II Eingehende Darstellung	8
1. Erzielte Ergebnisse	8
2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	15
3. Die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	16
4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	16
5. Während der Durchführung bekannt gewordene Fortschritte auf dem Vorhabensgebiet	17
6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen	17
7. Literaturverzeichnis	18

I Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Die agrartechnische Infrastruktur zählt zu den kritischen Infrastrukturen, besonders im Hinblick auf biologische Gefährdungen. Wirksame Schutz- und Gegenmaßnahmen sowie Schadensbegrenzung sind abhängig von der schnellen Identifizierung der in Frage kommenden biologischen Agenzien, diese ist jedoch bis heute vor Ort nicht durchführbar. In diesem Verbundprojekt wurden deshalb Forschungsarbeiten für ein neuartiges Detektionssystem zum Nachweis sicherheitsrelevanter Tierseuchen durchgeführt. In dem Projekt sollte die Konstruktion und der Aufbau eines neuartigen, modularen Lab-on-a-chip Systems als Labormuster vorangetrieben werden, das zum Nachweis verschiedener Erreger bzw. Erregergruppen für Tierseuchen eingesetzt werden kann.

Im Teilprojekt Rauschbrand waren die Arbeitsziele im Wesentlichen in drei Schwerpunkte gegliedert. Die Erarbeitung von Methoden zur effektiven Nukleinsäureaufreinigung zum Nachweis des Rauschbranderreger auch aus komplexen Matrices wie Futtermittel oder Boden bildete den ersten Schwerpunkt. Die erschwerenden Bedingungen, die durch das Vorliegen des Erregers als Spore gegeben sind, mussten hier berücksichtigt werden. Darüber hinaus sollte die zu erarbeitende Methodik Voraussetzungen für die spätere Automatisierbarkeit erfüllen. Ein weiterer Schwerpunkt des Teilprojektes war die Erarbeitung von PCR-Nachweisverfahren für *C. chauvoei*. Zunächst sollten in der Literatur beschriebene Verfahren etabliert und bewertet werden. Im Laufe des Projektes sollten dann eigens PCR-Nachweise entwickelt werden, die den Anforderungen des spezifischen und sensitiven Nachweises durch den DNA-Chip entsprechen. Ziel war die Entwicklung von PCR-Methoden, die es ermöglichen, mit den Produkten der PCR die Differenzierung von *C. chauvoei* von nahe verwandten Clostridien zu bewerkstelligen. Der dritte Schwerpunkt des Teilvorhabens waren schließlich Forschungsarbeiten zum Nachweis und zur Differenzierung des Rauschbrandes auf einem DNA-Chip.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Teilprojekt wurde in der Arbeitsgruppe Clostridien bearbeitet, in der auch das Nationale Referenzlabor für Rauschbrand angesiedelt ist. Die notwendigen technischen und personellen Voraussetzungen für die Durchführung von Forschungsvorhaben in anaerober Bakteriologie, speziell mit Clostridien, sind gegeben. Der Schwerpunkt liegt auf der mikrobiologischen und molekularbiologischen Diagnostik des Rauschbrandes (*C. chauvoei*) und von *C. botulinum*. Auf eine Stammsammlung des Nationalen Referenzlabors für Rauschbrand konnte zurückgegriffen werden.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt hatte eine Laufzeit von drei Jahren (01.11.2007-31.10.2010) mit einer zuwendungsneutralen Verlängerung von drei Monaten (bis 31.01.2011).

Beschreibung des Arbeitsplans des NRL Rauschbrand:

Ziel war die Erarbeitung einer modularen Lab-on-a-Chip (PCR-Chip und DNA-Chip) Methode zur Identifizierung und Typisierung von Clostridienspezies die seuchenartige Infektionen bei Haustieren auslösen können, insbesondere von Erregern des Gasödemkomplexes (*Clostridium septicum*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. histolyticum* und weitere) mit dem Schwerpunkt auf dem Erreger des Rauschbrandes (*C. chauvoei*). Hierzu sollten zunächst genetische Zielregionen auf ihre Eignung für die angestrebte Differenzierung überprüft werden, insbesondere die 16S rRNA-Gene sowie weitere Kandidatengene. In den einzelnen Zielregionen der Gene sollten spezies- und typ-übergreifend Bereiche mit hoher Diversität identifiziert werden, die von möglichst wenig variablen Bereichen flankiert werden. Aus den variablen Bereichen sollten dann geeignete Sonden für die Differenzierung auf dem DNA-Chip abgeleitet werden, während die wenig differierenden, flankierenden Bereiche für die Entwicklung von PCR-Systemen genutzt werden. Es wurde angestrebt, Zielregionen zu erfassen, die eine hohe Variabilität aufweisen und die gewünschte Differenzierung ermöglichen. Zusätzlich war es wichtig, beschriebene diagnostische PCR-Methoden zu etablieren und weiter zu optimieren, um die Ergebnisse, die mit den PCR-Chips und DNA-Chips erarbeitet werden sollten, zu überprüfen und zu bestätigen. Hierzu waren auch Sequenzierarbeiten zur Bestätigung der Zuordnung aufgrund von 16S rRNA- und alternativen Sequenzen geplant. Auf dieser Basis sollte dann die Erarbeitung und Testung von PCR-Chips und DNA-Chips erfolgen. Diese Anpassung der molekularbiologischen Diagnostik an die PCR-Bedingungen des Chipsystems (extrem schnelle Heiz- und Kühlraten) erfolgte mit Hilfe des SpeedCyclers der Analytik Jena AG. Schließlich war die Testung der Spezifität des erarbeiteten PCR- und DNA-Chipsystems mit geeigneten repräsentativen Laborstämmen zunächst ohne Matrixeffekte geplant. Parallel zum Aufbau der Nachweissysteme PCR-Chip und DNA-Chip war die Erarbeitung und Erprobung geeigneter DNA-Extraktionsmethoden für Sporen und vegetative Formen der ausgewählten Clostridienspezies aus den unterschiedlichen Matrices geplant. Durch die definierte Kontamination von verschiedenen Matrixsubstanzen sollte die Ermittlung der matrixabhängigen Sensitivität erfolgen.

Der Ablauf des Teilvorhabens des NRL-Rauschbrand entsprach im Wesentlichen der ursprünglichen Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung. Alle wesentlichen Ziele des Teilprojektvorhabens konnten erreicht werden. Folgende Abweichungen von der ursprünglichen Arbeits-, und Zeit-Planung ergaben sich im Laufe des Projektes:

Aufgrund technischer Probleme konnten der PCR-Chip und der DNA-Chip dem FLI Teilvorhaben NRL-Rauschbrand erst zum Anfang April 2010 zur Verfügung gestellt werden. Bezüglich des Arbeitspaketes „Konstruktion der DNA-Chip-Plattform“ wurden DNA-Sonden für alle Gasödemerreger abgeleitet und ihre Spezifität nachgewiesen. Umfangreiche Arbeiten zur Etablierung eines Protokolls zum Nachweis von Rauschbrand mit den zur Verfügung stehenden DNA-Sonden auf dem DNA-Chip des Projektpartners JCBI wurden durchgeführt. Es gelang jedoch nicht, einen zuverlässigen und reproduzierbaren Nachweis zu etablieren. Daher wurden die Arbeiten zur Validierung der Sonden anhand eines Mikroarrays der Firma Clondiag (jetzt Alere Technologies GmbH) durchgeführt. Die 23S-rDNA-Sonden konnten mit Hilfe des Mikroarraysystems der Firma Alere erfolgreich validiert werden. Während die Spezifität der *C. chauvoei* und *C. septicum* DNA-Sonden, die von dem spo0A Gen abgeleitet wurden, mit Hilfe eines Real-Time PCR-Assays validiert werden konnten (Lange, M., H. Neubauer, and 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(4):204-210.). Die Validierung der DNA-Sonden, konnte somit fristgerecht und erfolgreich an Laborstämmen und auch an klinischem Probenmaterial durchgeführt werden. Die Primer, die zum Nachweis der Gasödemerreger auf dem PCR-Chip ausgewählt wurden, konnten mit Hilfe des SpeedCyclers des Kooperationspartners Analytik Jena erfolgreich getestet werden. Da die offene PCR auf dem Chip ohne fluidische Ankopplung an die Detektionseinheit nicht den Projektzielen entsprach und parallel eine alternative PCR-Kartusche vom Projektpartner Analytik Jena entwickelt wurde, wurde auf eine Validierung des offenen PCR-Chip Systems verzichtet. Es wurde gemäß des Zeit- und Arbeitsplanes ein PCR-Protokoll erarbeitet, das die Geschwindigkeit der Heiz- und Kühlzyklen des PCR-Chips /PCR-Kartusche simuliert und eine robuste Amplifikation der nachzuweisenden DNA-Fragmente in 20 Minuten ermöglicht. Aufgrund technischer Schwierigkeiten konnte die alternative PCR-Kartusche vom Projektpartner Analytik Jena nicht innerhalb des Projektzeitraums zur Verfügung gestellt werden. Somit konnte die PCR-Kartusche auch nicht getestet werden.

Bezüglich der Nukleinsäureaufreinigungen des Rauschbranderregers aus den Matrices Gewebe, Futtermittel und Rinderkot, konnten die Projektziele, wie geplant erreicht werden. Aus der Matrix Boden konnte *C. chauvoei* DNA aus sterilisierter Gartenerde isoliert und mittels PCR nachgewiesen werden. Das Arbeitspaket: „Nukleinsäureaufreinigungen“ konnte damit fast vollständig erfolgreich abgearbeitet werden. Lediglich die Isolation von DNA des Rauschbranderregers aus der Matrix Boden (unsterile Gartenerde) gelang nicht.

4. Wissenschaftlich-technischer Stand

Einige Spezies der Gattung *Clostridium* sind Ursache seuchenhaft verlaufender Erkrankungen bei Tieren. Da die Erreger in Deutschland nur selten vorkommen, sind die entsprechenden Untersuchungseinrichtungen und Veterinärbehörden meist nicht auf ein gehäuftes Auftreten der Erreger und deren sichere Diagnosestellung vorbereitet. Der Rauschbrand ist eine seuchenhaft und akut verlaufende, infektiöse, aber nicht kontagiöse (keine Übertragung von Tier zu Tier) Gasödemkrankheit, die meist junge Rinder sowie gelegentlich Schafe bzw. Ziegen befällt. Infektionen mit diesem Erreger sind anzeigepflichtig. *Clostridium (C.) chauvoei* muss von anderen Gasödemerregern, insbesondere von *C. septicum*, dem Erreger des Pararauschbrandes, abgegrenzt werden. Der seuchenhafte Verlauf beim Rind macht die vorrangige Bekämpfung des Rauschbrandes gegenüber den anderen Clostridieninfektionen erforderlich.

Im Falle einer möglicherweise beabsichtigten Freisetzung anaerober Sporen der genannten Erreger ist es erste Priorität, die Eintragsquellen (evtl. Futter) und verseuchte Flächen zu erkennen, um die weitere Verbreitung zu verhindern und Gegenmaßnahmen ergreifen zu können. Die schnelle und sichere Diagnose ist insbesondere bei den anaeroben Sporenbildnern (Clostridien) noch nicht realisiert, sondern weitgehend von klassischen mikrobiologischen Verfahren abhängig, diese erfordern die relativ schwierige und aufwändige anaerobe Kultivierung. Molekularbiologische Nachweisverfahren für verschiedene Clostridienspezies sind beschrieben worden, jedoch basieren diese meist auf einer kulturelle Voranreicherung. Der direkte molekularbiologische Nachweis insbesondere von Sporen aus der schwierigen Probenmatrix wie z.B. Futter und Böden ist noch nicht realisiert.

C. chauvoei der Verursacher des Rauschbrandes ist ein grampositives, anaerobes, Endosporenbildendes Stäbchen. Die Sporen haben eine hohe Tenazität und können Boden und Futterflächen jahrelang kontaminieren. Der Rauschbrand kommt weltweit vor, tritt jedoch in einigen Gebieten regional gehäuft auf. In der Bundesrepublik Deutschland ist der Rauschbrand relativ selten. Als bodengebundene Krankheit ist der Rauschbrand fast ausschließlich in den küstennahen Weidegebieten der norddeutschen Tiefebene und in der Voralpenregion anzutreffen. In den so genannten Rauschbranddistrikten kann die Krankheit beim Weidevieh jährlich unterschiedliche, in Ausnahmehahren auch erhebliche Verluste verursachen.

Ein Ausbruch des Rauschbrandes im Sinne der Verordnung zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand vom 23. Mai 1991 (BGBl. I S. 1172) liegt vor, wenn dieser durch bakteriologische oder serologische Untersuchung festgestellt ist. *C. chauvoei* muss dabei von anderen Gasödemerregern, insbesondere von *C. septicum*, dem Erreger des Pararauschbrandes, abgegrenzt werden. Bei den Gasödeminfektionen sind weitere Clostridienspezies, wie *C. novyi*, *C. perfringens*, *C. histolyticum*, *C. sordellii* und *C. carnis*

differentialdiagnostisch zu berücksichtigen, darüber hinaus ist Milzbrand auszuschließen. Die Anordnung von Schutzmaßnahmen nach der Verordnung zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand (vom Mai 1991, BGBl. I S. 1172) bei Verdacht oder Ausbruch von Rauschbrand liegt im Ermessen der zuständigen Behörde. Insbesondere in der Voralpenregion wird von der Anordnung der Impfung gegen den Rauschbrand für Rinder, die auf so genannte Rauschbrand-alpen oder -weiden aufgetrieben werden sollen, Gebrauch gemacht.

Insgesamt ist der Rauschbrand in Deutschland selten, daher muss insbesondere in Gebieten in denen das natürliche Vorkommen nicht gegeben ist, damit gerechnet werden, dass das klinische Bild unbekannt ist. Rauschbrand verursacht beim Rind schwere Allgemeinstörungen verbunden mit hohem Fieber. Schwellungen mit Gasbildung, anfangs noch heiß und schmerzhaft, treten vor allem in den größeren Muskelpartien der Extremitäten und des Rumpfes auf. Die Schwellungen werden dann kalt und gefühllos, beim Betasten ist ein knisterndes Geräusch typisch. Der Tod tritt meist sehr schnell, innerhalb von 12 bis 48 Stunden ein. Aufgrund des schnellen und meist letalen Krankheitsverlaufes konzentriert sich die Diagnose fast ausschließlich auf postmortale Nachweisverfahren. Bei Tieren, die später als 24 h post mortem zur Sektion gelangen, ist eine exakte Diagnosestellung infolge der schnellen postmortalen Zersetzung des Gewebes erschwert.

Die Labordiagnose erfolgt durch Bakterienisolierung oder mittels direkter Immunfluoreszenz. Zur Ergänzung und Bestätigung der mikrobiologischen und serologischen Diagnose von *C. chauvoei* eignen sich PCR-Methoden (Kuhnert P et al., 1996; Kuhnert P et al., 1997; Sasaki Y et al., 2000). Insgesamt befassen sich jedoch auch international nur wenige Arbeitsgruppen mit *C. chauvoei*. Nachweise aus nicht klinischem Material wie Futtermittel oder Bodenproben sind bisher kaum beschrieben und relativ schwierig.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die zentralen Aufgaben und Ziele des Verbundes können folgendermaßen untergliedert werden: A) Gemeinsame Forschungsarbeiten zur Konstruktion eines modularen Lab-on-a-Chip- Systems bestehend aus: 1.) Probenaufarbeitung, 2.) PCR-Chip und 3.) DNA-Chip mit elektrischer Detektion. B) Datenmanagement-System. C) Begleitforschung mit der Analyse von Risiko- und Bedrohungspotentialen sowie Kosten-Nutzenanalyse.

Die einzelnen Aufgaben wurden von den Verbundpartnern in unterschiedlicher Zusammenarbeit angegangen: Bei den Forschungsarbeiten zur Konstruktion eines modularen Lab-on-a-Chip-Systems wurde für die Teilaufgabe Probenaufarbeitung durch die Verbundpartner NRL MKS, NRL Lungenseuche und das NRL Rauschbrand an unterschiedlichen Erreger- und Matrix-spezifischen Methoden geforscht, wobei der Partner

Analytik Jena mit der Tochterfirma AJ Innuscreen an der technischen Umsetzung der Methoden arbeitete und technische Lösungen anbot.

Die Bearbeitung der Teilaufgaben PCR-Chip und DNA-Chip mit elektrischer Detektion erfolgte in enger Zusammenarbeit der Partner FSU JBCI sowie des IPHT und Analytik Jena und der NRLs für MKS, Lungenseuche und Rauschbrand, die jeweils erregerspezifische Methoden für die beiden Module erarbeiteten.

Das Datenmanagementsystem wurde von der Firma Tecart in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Epidemiologie des FLI, FSU JBCI und Analytik Jena erarbeitet, wobei ein Anforderungskatalog des Datenmanagementsystems definiert wurde.

II Eingehende Darstellung

1. Erzielte Ergebnisse

Zusammenfassung

Die aus Sequenzierungen des *spo0A* Genes abgeleiteten PCR Primer und speziesspezifischen DNA-Sonden wurden für die Entwicklung und Validierung eines Real-Time PCR Assays verwendet. Der Assay ermöglicht eine simultane Detektion des Rauschbranderregers (*Clostridium chauvoei*) und Pararauschbranderregers (*Clostridium septicum*) aus klinischem Probenmaterial. Die Arbeit wurde veröffentlicht (Lange, M., H. Neubauer, and 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(4):204-210).

Die von uns entwickelten 23S-rDNA PCR-Primer und speziesspezifischen DNA-Sonden für die Gasödemerreger (*C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. histolyticum*, *C. carnis* und *C. haemolyticum* /*C. novyi*) wurden bezüglich ihrer Funktionalität und Spezifität mit Hilfe der Mikroarray-Technologie der Firma Alere (Clondiag) erfolgreich an Laborstämmen und an klinischem Probenmaterial validiert. Die Erstellung eines Manuskriptes zur Publikation ist in Vorbereitung. Mit Hilfe des Speedcyclers und des neuen Mikroarrays, konnte DNA des Rauschbranderregers aus klinischem Probenmaterial innerhalb von ca. 5 Stunden nachgewiesen werden.

Zurzeit stehen somit neben dem entwickelten Mikroarray Assay drei konventionelle PCR-Systeme und ein Real-Time PCR Assay zur Verfügung, die für eine Identifizierung von *C. chauvoei* bzw. die Abgrenzung zum Pararauschbrand verwendet werden können.

Bezüglich der Nukleinsäureaufreinigungen von *C. chauvoei* aus den Matrices Rinderkot, Futtermittel und Gewebe, konnte eine Verbesserung in der Nachweisgrenze erzielt werden.

1.1. Nukleinsäureaufreinigungen

Nukleinsäureaufreinigung aus Bakterienzellen / Sporen

Für die Nukleinsäureaufreinigung aus Bakterienzellen / Sporen wurde sowohl das DNA-Extraktionskit der Firma Qiagen (DNeasy Blood & Tissue Kit /Protokoll für Gram-positive Bakterien) als auch das innuSPEED Bacteria/Fungi DNA Kit der Firma Analytik Jena verwendet. Eine höhere Nukleinsäureausbeute wurde hierbei mit dem innuSPEED Bacteria/Fungi DNA Kit erzielt. Diese Methode umfasst einen zusätzlichen Homogenisationsschritt, wobei die Zellwände der Bakterien zertrümmert werden. Eine entsprechende Laborarbeitsanweisung wurde erstellt. Diese Methode ermöglicht die DNA-Extraktion aus Bakteriensuspensionen mit Sporen und vegetativen Zellen. So konnte nach dem Entfernen der vegetativen Zellen, DNA von *C. chauvoei* isoliert werden. Um den Anteil an *C. chauvoei* Sporen im Kulturmedium weiter zu erhöhen, wurden Kultivierungsversuche zur Sporenbildung und Sporenstabilität mit verschiedenen Medien durchgeführt.

Die von dem Projektpartner Analytik Jena verwendeten DNA-Extraktionskits ermöglichen eine automatische DNA-Extraktion mittels magnetischer Separation und des InnuPure C12 Gerätes. Damit ist eine Anpassung der Extraktionsmethoden an eine Vor-Ort-Extraktion mittels magnetischer Separation möglich.

Nukleinsäureextraktionen aus Gewebe

Für die Nukleinsäureextraktionen aus Gewebe wurde eine Laborarbeitsanweisung verfasst, die auf dem Protokoll des DNeasy Blood & Tissue Kit der Firma Qiagen basiert. Mit dieser Methode wurde DNA aus verschiedenen Geweben (Leber, Herz, Darm, Niere, Milz, Muskulatur) von 28 Tieren mit Verdacht auf Rauschbrand isoliert und nachfolgend mittels konventioneller PCR und/ oder Real-Time PCR untersucht. Es wurden ferner Nukleinsäureextraktionen mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit als auch mit dem innuPrep DNA Mini Kit (Analytik Jena) von Rinderhackfleisch durchgeführt, welches mit unterschiedlichen CFU von *C. chauvoei* vermischt wurde. Die Nachweisgrenze von *C. chauvoei* DNA mittels PCR wurde hier mit ca. 360 – 420 CFU/ g Rinderhackfleisch ermittelt.

Nukleinsäureextraktionen aus Boden

Für die DNA-Extraktionen aus der Matrix Boden wurden das InnuSPEED Soil DNA Kit und das InnuPep Stool Kit der Firma Analytik Jena verwendet. Aus sterilisierter Gartenerde konnte die DNA des Rauschbranderreger isoliert und nachfolgend mittels PCR nachgewiesen werden. Es wurde für dieses Protokoll eine entsprechende vorläufige Laborarbeitsanweisung erstellt. Die Nachweisgrenze für *C. chauvoei* liegt hier bei ca. 8.200 CFU /g sterilisierte Erde. Ein stabiler Nachweis von *C. chauvoei* aus nativer Gartenerde konnte hingegen nicht erfolgreich gezeigt werden. Wurden *C. chauvoei* Kulturen mit Gartenerde vermischt und sofort DNA extrahiert, so gelang der Nachweis von *C. chauvoei*.

Wurde die Gartenerde jedoch für 24 oder 48 Stunden inkubiert, so war der Nachweis von *C. chauvoei* nicht möglich.

Nukleinsäureextraktionen aus Rinderkot

Für Nukleinsäureextraktionen aus der Matrix Rinderkot wurde das innuPREP Stool DNA Kit (Analytik Jena) verwendet. DNA des Rauschbranderreger konnte mit dieser Extraktionsmethode aus nativem Rinderkot isoliert und nachfolgend mittels PCR nachgewiesen werden (300 - 20000 CFU /g Kot).

Nukleinsäureextraktionen aus Futtermittel

Für die Nukleinsäureextraktionen von *C. chauvoei* aus der Matrix Futtermittel wurden fein gemahlene Pellets eines Krafftutters verwendet, bestehend aus Gerste (30%), Hafer (10%), Weizen (10%), Erbsen (16%), Rapsexpeller (16%), Sojaextraktionsschrot (15%) und Perfect Zellmin (3%). Sowohl mit dem Innuspeed Soil DNA Kit (Analytik Jena) als auch mit dem innusPEED Bacteria/Fungi DNA Kit (Analytik Jena) konnte DNA von *C. chauvoei* aus dieser Matrix isoliert und nachfolgend mittels PCR nachgewiesen werden (400 – 4400 CFU / g Futtermittel).

1.2. PCR-Assays

1.2.1. PCR-Assays für die (Labor)-Diagnostik

Es wurden unter Verwendung bereits publizierter Primersequenzen (Sasaki et al. 2000; Sasaki et al. 2001) zwei PCR-Assays validiert, wodurch ein spezifischer Nachweis von *C. chauvoei*, und eine Abgrenzung zum Pararauschbranderreger *C. septicum* gewährleistet wird. Entsprechende Laborarbeitsanweisungen wurden erstellt. Der PCR-Assay, welcher auf Primersequenzen des Flagellings basiert (Sasaki et al. 2002), soll in der Rauschbranddiagnostik nur unter Vorbehalt eingesetzt werden, da durch Sequenzierungen des Flagellings gezeigt werden konnte, dass einer der PCR-Primer nicht für alle *C. chauvoei* Stämme spezifisch ist (Tabelle 1),(Lange et al. 2010). Basierend auf DNA-Sequenzen des spo0A Genes, wurden ferner zwei Primerpaare entwickelt, die jeweils einen Nachweis von *Clostridium sordellii* und *Clostridium perfringens* ermöglichen Diese PCR-Nachweise wurden an 28 Stämmen verschiedener *Clostridium* Spezies, 3 *C. sordellii* Stämmen, 2 *C. perfringens* Stämmen und an 29 klinischen Proben getestet.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener PCR-Assays bei der Testung von Stämmen von *C. chauvoei*, *C. septicum* und weiterer 26 verschiedener Clostridien-Spezies.

	Sasaki et al. (2000)	Sasaki et al. (2001)	Sasaki et al. (2002)	Lange et al (2010)
<i>C. chauvoei</i> Stämme (29)	29	29	26	29
<i>C. septicum</i> Stämme (38)	-	38	38	38
<i>Clostridium</i> ssp. (26)	-	-	-	-

Entwicklung und Validierung einer Real-Time PCR basierend auf Sequenzdaten des spo0A Gens

Als weitere genetische Zielregionen für die Entwicklung von PCR-Assays bzw. DNA-Sonden, wurde das Sporulationsgen *spo0A* ausgewählt. Ein Fragment des *spo0A* Gens von *C. chauvoei*, *C. septicum* und *C. carnis* wurde amplifiziert und sequenziert. Aus den Sequenzdaten konnten ein PCR-Primerpaar sowie jeweils speziesspezifische DNA-Sonden für *C. chauvoei* und *C. septicum* abgeleitet werden. Es wurde ein Real-Time PCR-Assay entwickelt und umfangreich an Laborstämmen (Tabelle 1) und klinischem Probenmaterial getestet (Tabelle2) und mit den Ergebnissen verglichen, die mit drei konventionellen PCR-Assays erzielt wurden (Lange et al. 2010). Die Real-Time PCR soll zukünftig in der Diagnostik von *C. chauvoei* und *C. septicum* eingesetzt werden. Eine entsprechende Laborarbeitsanweisung wurde erstellt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener PCR-Assays bei der Untersuchungen von klinischem Probenmaterial

Detection of *C. chauvoei* and *C. septicum* DNA in tissue samples by four PCR-assays.

Sample ^a	Host	Tissue ^b	Source	<i>C. chauvoei</i> (c) and <i>C. septicum</i> (s) identified by PCR				
				Sasaki et al., 2000 (16–23S rDNA)	Sasaki et al., 2001 (16–23S rDNA)	Sasaki et al., 2002 (<i>fliC</i>)	Real-time PCR this study (<i>spo0A</i>)	Threshold cycle (CT)
S0041/08 (M27-2)	cattle	liver ^(c)	Germany	c	c	c	c	27.79
S0041/08 (M27-3)	cattle	intestine	Germany	c	c	c	c	28.86
S0041/08 (M27-5)	cattle	musculature	Germany	c	c	c	c	29.18
S0041/08 (M28-2)	cattle	kidney	Germany	c	c	c	c	31.19
S0040/08 (M28-3)	cattle	liver ^(c)	Germany	c	c	c	c	33.52
S0040/08 (M28-4)	cattle	kidney	Germany	c	c	c	c	35.68
S0040/08 (M28-5)	cattle	spleen	Germany	c	c	c	c	27.51
S0040/08 (M28-6)	cattle	musculature	Germany	c	c	c	c	32.52
S0040/08 (M28-7)	cattle	intestine	Germany	c	c	c	c	37.87
S0098/08 (M35-2)	cattle	musculature ^(c)	Austria	c	c	c	c	31.18
S0099/08 (M35-3)	cattle	musculature ^(c)	Austria	c	c	c	c	32.51
S0100/08 (M35-4)	cattle	musculature ^(c)	Austria	c	c	c	c	32.76
S0101/08 (M35-5)	cattle	musculature ^(c)	Austria	c	c	c	c	31.55
S0105/08 (M35-8)	cattle	musculature ^(c)	Austria	c	c	c	c	29.95
S0103/08 (M35-7)	cattle	musculature ^(c, s)	Austria	c	c	c	c	29.90
S0102/08 (M35-6)	cattle	musculature ^(c, s)	Austria	c	c, -	c, s	c, s	31.73, 36.54
S0095/08 (M35-1)	uk	spleen ^(s)	Austria	–	s	s	s	30.46
S0097/08 (M36-2)	stag	musculature ^(s)	Austria	–	s	s	s	34.72
S0104/08 (M36-1)	cattle	musculature	Austria	–	s	s	s	35.25
S0141/09 (M63-9)*	cattle	intestine	Germany	–	s	–	s	35.86
S0143/09 (M63-17)*	cattle	musculature	Germany	–	s	–	s	34.43
S0143/09 (M63-18)*	cattle	intestine	Germany	–	s	–	s	34.55
S0143/09 (M63-19)*	cattle	spleen	Germany	–	s	–	s	37.43
S0143/09 (M63-21)*	cattle	uk	Germany	–	s	–	s	37.35
S0006/10 (C42-5)*	cattle	musculature	Germany	c	c	c	c	23.97
S0008/10 (C42-8)*	cattle	liver	Germany	c	c	c	c	24.86
S0011/10 (C43-6)*	lamb	musculature	Germany	–	s	s	s	26.31
S0012/10 (C44-1)*	lamb	musculature	Germany	–	s	s	s	29.24
S0022/10 (C45-5)	bull	liver ^(c)	Germany	c	c	c	c	22.92

uk: Unknown.

–: Negative.

^a Samples from animals; the designations shown in parenthesis refer to DNA-preparation numbers. Asterisks indicate that DNA preparations were performed from alcohol preserved tissue samples.

^b *C. chauvoei* and *C. septicum* strains isolated from tissue samples are indicated as (c) and (s), respectively.

Aus: Lange et al. 2010, Mol Cell Probes 24, pp 204-10

1.2.2. Anpassung der PCR-Nachweise an die thermischen Bedingungen des Chips

Um eine Anpassung der PCR-Nachweise an die physikalischen Bedingungen des Chips zu erreichen, wurden weitere Versuche mit dem SpeedCycler der Analytik Jena AG durchgeführt. Der SpeedCycler zeichnet sich durch schnelle Heiz- und Kühlraten aus. Es konnte ein PCR-Protokoll entwickelt werden, mit dessen Hilfe die Durchführung einer PCR mit den relevanten Primern in einem Reaktionsvolumen von 10 µl in der Zeitspanne von ca. 20 Minuten möglich ist.

1.3. Entwicklung von DNA-Sonden für die Erreger des Gasödemkomplexes

23S-rDNA

Durch die Sequenzierung einer variablen Region des 23S-rRNA Gens von 30 Clostridienarten, konnten speziesspezifische DNA-Sonden für *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. carnis*, *C. histolyticum*, *C. perfringens* und *C. sordellii* entwickelt werden. Für *C. haemolyticum* und *C. novyi* konnte eine DNA-Sonde entworfen werden, die für beide Arten spezifisch ist. Die 23S-rDNA Sonden für *C. chauvoei* und *C. septicum* wurden mittels Dot-Blot-Analyse an jeweils 20 *C. chauvoei* und *C. septicum* Stämme erfolgreich getestet. Erste

In-Situ-Hybridisierungsversuche mit der *C. septicum* spezifischen DNA-Sonde verliefen ebenfalls positiv und stellen eine weitere Applikationsmöglichkeit für die entwickelten rDNA-Sonden dar.

23S rDNA Sequenzierung von *C. chauvoei* und *C. septicum*

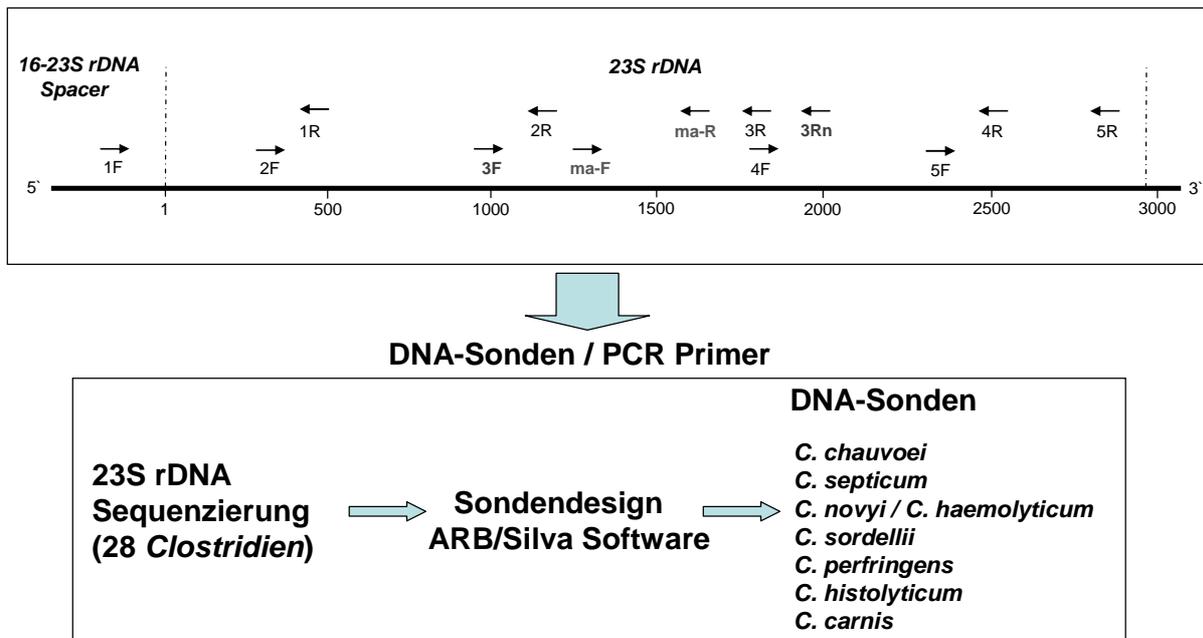


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Entwicklung von DNA-Sonden für die Erreger des Gasödemkomplexes für eine variable Region des 23S-rRNA Gens.

Validierung der 23S rDNA-Sonden mit der Mikroarray-Technologie der Firma Alere

Da ein solider Nachweis der Gasödemerreger mit Hilfe der entwickelten 23SrDNA-Primer und DNA-Sonden unter Verwendung des Hybridisierungschips der Jenaer Biochip Initiative nicht gezeigt werden konnte, wurden umfangreiche Tests an Laborstämmen (21 verschiedene *Clostridium* Spezies) und an klinischem Probenmaterial (28 Proben von 14 Tieren) mit dem Mikroarray-Assay der Firma Alere durchgeführt, um die Funktionalität und Sensitivität der PCR-Primer und DNA-Sonden zu verifizieren (Abb. 2). Hierbei konnte die Spezifität der entwickelten 23S-rDNA-Sonden durch Hybridisierungen mit biotinylierten PCR-Produkten mittels eines Mikroarray Assays (Array Tube, Alere) bestätigt werden.

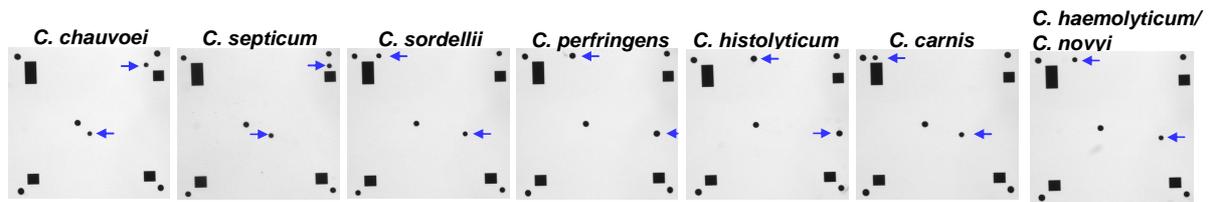


Abbildung 2: Hybridisierungsmuster der entwickelten 23S-rDNA-Sonden (Array Tube, Alere)

Tabelle 3: Ergebnisse der Untersuchungen von klinischem Probenmaterial (28 Proben von 14 Tieren) mit dem Mikroarray-Assay der Firma Alere (blauer Rahmen) und weiteren PCR-Assays.

Sample ^a	Array-ID	Host	Tissue ^b	Source	<i>C. chauvoei</i> (c), <i>C. septicum</i> (s), <i>C. perfringens</i> (p), <i>C. sordellii</i> (so), <i>C. novyi</i> type B (nb), <i>C. haemolyticum</i> / <i>C. novyi</i> (n/h) identified by four assays	Microarray 23S rDNA this study	PCR ^c <i>spo0A</i> this study	PCR ^d <i>spo0A</i> this study	PCR <i>EJC</i> (Sasaki et al. 2002)	Real-time PCR <i>spo0A</i> (Lange et al. 2010)
S0040/08	21969100	cattle	liver ^(c)	Germany	c, so	-	so	c	c	
S0040/08	21969101	cattle	kidney	Germany	c, so	-	so	c	c	
S0040/08	21969102	cattle	spleen	Germany	c, so, n/h	-	so	c, nb	c	
S0040/08	21969098	cattle	musculature	Germany	c, p, so	p	so	c	c	
S0040/08	21969240	cattle	intestine	Germany	c, p, so	p	so	c	c	
S0041/08	21969093	cattle	spleen	Germany	c, so	-	so	c	c	
S0041/08	21969082	cattle	liver ^(c)	Germany	c, p, so	p	so	c	c	
S0041/08	21969106	cattle	intestine	Germany	c, p, so	p	so	c	c	
S0041/08	21969107	cattle	musculature	Germany	c, p	p	-	c	c	
S0041/08	21969096	cattle	kidney	Germany	c, p, so	p	so	c	c	
S0042/08	21969081	horse	kidney	Germany	p, so, n/h	p	so	nb	-	
S0042/08	21969090	horse	spleen	Germany	p, so, n/h	p	so	nb	-	
S0042/08	21969092	horse	intestine	Germany	p, so, n/h	p	so	nb	-	
S0042/08	21969097	horse	liver	Germany	p, n/h	p	so	nb	-	
S0095/08	21969327	uk	spleen ^(c)	Austria	s, so	-	so	s	s	
S0097/08	21969332	stag	musculature ^(c)	Austria	s	-	-	s	s	
S0098/08	21969326	cattle	musculature ^(c)	Austria	p	p	-	c	c	
S0099/08	21969329	cattle	musculature ^(c)	Austria	c, so	-	-	c	c	
S0100/08	21969321	cattle	musculature ^(c)	Austria	c	-	-	c	c	
S0101/08	21969330	cattle	musculature ^(c)	Austria	c	-	-	c	c	
S0102/08	21969325	cattle	musculature ^(c, s)	Austria	c	-	-	c, s, nb	c, s	
S0103/08	21969328	cattle	musculature ^(c, s)	Austria	c	-	-	c	c	
S0104/08	21969334	cattle	musculature	Austria	s, n/h	-	-	s, nb	s	
S0105/08	21969333	cattle	musculature ^(c)	Austria	c, p	-	-	c	c	
S0143/09*	21969336	cattle	musculature	Germany	p, so, n/h	p	so	nb	s	
S0143/09*	21969335	cattle	intestine	Germany	p, so, n/h	p	so	nb	s	
S0143/09*	21969344	cattle	spleen	Germany	p, so, n/h	p	so	nb	s	
S0143/09	21969343	cattle	kidney	Germany	n/h	-	-	nb	s	

16-23S-rDNA Spacer

Aufgrund der relativ hohen DNA-Sequenzvariabilität der 16-23S-rDNA Spacerregion konnten speziesspezifische DNA-Sonden für *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. carnis* und *C. perfringens* abgeleitet werden.

Spo0A

Zwei speziesspezifische DNA-Sonden konnten aus den kürzlich von uns sequenzierten Sporulationsgen *spo0A* für *C. chauvoei* und *C. septicum* abgeleitet werden. Die Spezifität

dieser Sonden wurde mittels eines Real-Time PCR Assays an Laborstämmen und an klinischem Probenmaterial validiert (siehe Abschnitt 1.2.1).

Tabelle 4: Übersicht der entwickelten DNA-Sonden für die Erreger des Gasödemkomplexes

DNA-Sonden

Spezies	genetische Region			
	16-23S-rDNA Spacer	23S-rDNA	16S-rDNA	spo0A
<i>C. chauvoei</i>	★	★	★	★
<i>C. septicum</i>	★	★	-	★
<i>C. carnis</i>	★	★	-	-
<i>C. perfringens</i>	★	★	-	-
<i>C. sordellii</i>	★	★	-	-
<i>C. haemolyticum</i>	-	★	-	-
<i>C. novyi</i>	-	★	-	-
<i>C. histolyticum</i>	-	★	-	-

★ gemeinsame Sonde für beide Arten

1.4. DNA-Chip

Zusätzlich zu der ursprünglichen Planung wurde nun auch am NRL-Rauschbrand intensiv versucht, ein funktionsfähiges Protokoll mit den DNA-Hybridisierungschips der Jenaer BioChip Initiative zu entwickeln. Es wurden Versuche mit den Sonden der 16-23S-rDNA Spacerregion, des 23S-rRNA Gens und des spo0A Gens durchgeführt.

Die Durchführungsprotokolle wurden variiert, der Einfluss von Exonuklease, kleineren Amplifikationsprodukten und Helferoligonukleotiden wurde untersucht. Einzelne erfolgreiche Nachweisexperimente gelangen, waren jedoch nicht stabil reproduzierbar, so dass die Validierung der 23S rDNA-Sonden mit der Mikroarray-Technologie der Firma Alere durchgeführt wurde.

2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises im Teilprojekt Rauschbrand des ATLAS-Verbundprojektes sind die Personalausgaben für einen wissenschaftlichen Mitarbeiter und eine technische Mitarbeiterin. Der wissenschaftliche Mitarbeiter Herr Dr. Martin Lange war für die Durchführung, Auswertung und Organisation der wissenschaftlichen Arbeiten, Präsentation der Ergebnisse und die Koordination der Zusammenarbeit mit den

Projektpartnern verantwortlich. Die technische Assistentin Frau Christin Scharf war für die praktische Durchführung und Dokumentation der Arbeiten verantwortlich.

3. Die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die ausgeführte Arbeit am Teilprojekt Rauschbrand war aus unserer Sicht notwendig und angemessen.

4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die aus Sequenzierungen des *spo0A* Genes abgeleiteten PCR Primer und speziesspezifischen DNA-Sonden wurden für die Entwicklung und Validierung eines Real-Time PCR Assays verwendet. Der Assay ermöglicht eine simultane Detektion des Rauschbranderregers (*Clostridium chauvoei*) und Pararauschbranderregers (*Clostridium septicum*) aus klinischem Probenmaterial. Die Arbeit wurde veröffentlicht (Lange, M., H. Neubauer, and 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(4):204-210) und eignet sich zum Einsatz in Diagnostiklaboratorien.

Die von uns entwickelten 23S-rDNA PCR-Primer und speziesspezifischen DNA-Sonden für die Gasödemerreger (*C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. histolyticum*, *C. carnis* und *C. haemolyticum* /*C. novyi*) wurden bezüglich ihrer Funktionalität und Spezifität mit Hilfe der Mikroarray-Technologie der Firma Alere (Clondiag) erfolgreich an Laborstämmen und an klinischem Probenmaterial validiert. Die Erstellung eines Manuskriptes zwecks Publikation ist in Vorbereitung. Mit Hilfe des Speedcyclers und des neuen Mikroarray Assays, konnte DNA des Rauschbranderregers aus klinischem Probenmaterial innerhalb von ca. 5 Stunden nachgewiesen werden.

Zurzeit stehen somit neben dem entwickelten Mikroarray Assay drei konventionelle PCR-Systeme und ein Real-Time PCR Assay zur Verfügung, die für eine Identifizierung von *C. chauvoei* bzw. die Abgrenzung zum Pararauschbrand verwendet werden können.

Bezüglich der durchgeführten Nukleinsäureaufreinigungen von *C. chauvoei* aus den Matrices Rinderkot, Futtermittel und Gewebe, konnte eine Verbesserung in der Nachweisgrenze erzielt werden. Die DNA-Isolation und der Nachweis von *C. chauvoei* mittels PCR aus nativer Gartenerde waren nicht möglich. Ein Nachweis des Rauschbranderregers *C. chauvoei* mit dem Laboraufbau des Projektpartners Jenaer Bio-Chip Initiative konnte am FLI mit den getesteten DNA-Sonden bisher nicht stabil gezeigt werden.

Insgesamt stellen die Arbeiten einen beachtlichen Fortschritt für die Labordiagnostik des Rauschbrandes dar und bieten eine Grundlage für weitere Entwicklungen.

5. Während der Durchführung bekannt gewordene Fortschritte auf dem Vorhabensgebiet

Im April 2010 wurde ein Real-Time PCR Assay publiziert (Halm et al. 2010), welcher *C. chauvoei* mittels einer spezifischen 16S-rDNA Sonde detektiert und den Rauschbranderreger von *C. septicum* abgrenzt. Für das Projektvorhaben wurde eine 16S-rDNA Sonde ausgewählt, deren Spezifität auf identische Nukleotidunterschiede zwischen *C. chauvoei* und *C. septicum* basiert. Die von Halm et al. (2010) publizierte *C. chauvoei* spezifische DNA-Sonde kann somit als validiert betrachtet werden.

In 2008 sind weitere 16S-rDNA-Teilsequenzen von sieben *C. chauvoei* Isolaten (aus Indien) publiziert worden (Sathish und Swaminathan, 2008). Die neu sequenzierten 16S-rRNA-Genfragmente weisen bis zu 15 Nukleotidsubstitutionen zu der von Kuhnert et al. (1996) publizierten 16S-rDNA-Sequenz von *C. chauvoei* auf. Es muss daher die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass mehrere Subspezies von *C. chauvoei* existieren. Leider wurde bei den sieben erst kürzlich publizierten 16S-rDNA-Sequenzen, die Zielregion für die *C. chauvoei* spezifische 16S-rDNA-Sonde nicht sequenziert, daher kann zur Zeit die Spezifität dieser Sonde nicht überprüft werden.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen

2008

09.09.2008 Workshop „Detektionssysteme für CBRNE-Gefahren“ in Karlsruhe. Es wurde ein Poster mit Beiträgen der FLI-Teilprojekte Rauschbrand, Lungenseuche und Maul- und Klauenseuche präsentiert (Anlage). Auf der gleichen Veranstaltung wurde ein Vortrag mit der Vorstellung des Verbundprojektes präsentiert.

2009

Am 01.-02.10.2009 26. Jenaer Symposium CLOSTRIDIEN, Vortrag mit dem Titel: „PCR-basierende Nachweissysteme zur Detektion des Erregers des Rauschbrandes *Clostridium chauvoei*“.

Eine neu etablierte Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *C. chauvoei* und *C. septicum* wurde auf der 6th ClostPath Konferenz in Rom (19.-23.10.2009) als Poster vorgestellt (Anlage).

Filmbeitrag „Ideen zünden TV“ des BMBF „Seuchendetektion im Aktenkoffer-Format“

2010

Die Arbeiten des Teilprojektes und des Verbundes konnten in Form von Vorträgen und Posterbeiträgen im Rahmen der 3. Gemeinsamen Tagung von DGHM und VAAM in Hannover, 28.-31.03.2010 (1 Vortrag, 1 Poster), der Tagung der Fachgruppe Bakteriologie

und Mykologie der DVG in Jena, 22-24.06.2010 (3 Poster) (Anlage) und dem Nationalen Symposium für Zoonosenforschung 2010 in Berlin 07.-08.10.2010 (1 Poster) präsentiert werden.

5th Future Security Conference 2010, Berlin, September 7th – 9th, 2010. Topic: -Detection of Hazardous Materials- (1 Poster) (Anlage)

Artikel: Lange, M., H. Neubauer, and 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(4):204-210. (Anlage)

2011

Vortrag (Anlage) und Poster (Anlage) zum Verbund auf dem Workshop des BMBF „Sicherheit durch innovative Detektionstechnologien“ Nachweissysteme für chemische, biologische und explosive Gefahrstoffe 15.06.2011-16.06.2011 in Berlin

7. Literaturverzeichnis

Halm et al. (2010). Novel Real-Time PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* in *Clostrial* Myonecrosis. *J. Clin. Microbiol.* 48 (4): 1093-1098.

Lange et al. (2010). Development and validation of a multiplex real-time PCR for detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Mol. Cell. Probes*, in press, doi:10.1016/j.mcp.2010.03.003.

Kuhnert et al. (1996). Phylogenetic Position of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* based on 16S rRNA Gene Sequences. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 46: 1174-1176.

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.

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.

Sasaki et al. (2002). Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. *Veterinary Microbiology* 86: 257-267.

Sathish and Swaminathan (2008). Molecular characterization of the diversity of *Clostridium chauvoei* isolates collected from two bovine slaughterhouses: Analysis of cross-contamination. *Anaerobe* 14 (3): 190-199.