

Aus dem Department für Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Zentrum für Lebensmittelwissenschaften und öffentliches Veterinärwesen

(Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Martin Wagner)

Abteilung Hygiene und Technologie von Lebensmitteln

(Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Karin Schwaiger)

Nachweis von *Clostridium estertheticum* in österreichischen Rinderbetrieben

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Vanessa Zand

Wien, im Dezember 2024

Betreuer: Dr. med. vet. Samart Dorn-In

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht.

Ich habe die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitend Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Wien, den 20.12.2024

Vanessa Zand

ZUSAMMENFASSUNG

Clostridium (C.) estertheticum ist hauptverantwortlich für das Auftreten von „blown pack spoilage“ (BPS), also dem Verderb von vakuumverpacktem frischem Fleisch, das bei ordnungsgemäßer Temperatur und mit einwandfreier Verpackung gelagert wurde. Betroffen sind in der Regel Rind-, Lamm- und Wildfleisch, da diese eine lange Reifungsphase durchlaufen und sich Clostridien während dieser Lagerung vermehren können. Als Kontaminationsquelle für diese Bakterien gelten Kot und Haut der geschlachteten Tiere. Dennoch gibt es weltweit nur wenige Studien, die sich mit der Prävalenz von *C. estertheticum* im Kot und auf der Haut von Rindern beschäftigen.

Um das Vorkommen von *C. estertheticum* und der verwandten Spezies *C. frigoriphilum* in erwachsenen Rindern in Österreich einschätzen zu können, wurden für diese Studie 260 Kotproben und 260 Fellwischproben in 26 Betrieben in Salzburg und Tirol gewonnen und molekularbiologisch sowie kulturell untersucht. Die Proben wurden im Vorfeld mit Pepton-Yeast-Glucose-Starch (PYGS)-Bouillon bei 4 °C angereichert und anschließend einer DNA-Extraktion und einer qPCR unterzogen. Bei der verwendeten Sonden-qPCR Methode waren 22,3 % bzw. 11,2 % der getesteten Kotproben und 0,8 % bzw. 2,3 % der Fellwischproben positiv für *C. estertheticum* bzw. *C. frigoriphilum*. Insgesamt wurden 84 PCR-positive Proben einer kulturellen Untersuchung auf Columbia Blood Agar (CBA) unterzogen. Nach einer mindestens drei- bis vierwöchigen Inkubation bei 10 °C und nachfolgender Subkultivierung, konnten *C. estertheticum* und *C. frigoriphilum* aus 29,8 % (n = 25/84) der PCR-positiven Proben isoliert werden. Es kann daher bestätigt werden, dass Rinderkot eine wichtige Quelle für *C. estertheticum* darstellt, obwohl das Vorkommen dieses Bakteriums bei Rindern in Österreich als mäßig eingestuft wird.

ABSTRACT

Clostridium (C.) estertheticum is mainly responsible for the occurrence of “blown pack spoilage” (BPS), the spoilage of vacuum-packed fresh meat that has been stored at appropriate temperature and in intact packaging. Typically, beef, lamb, and venison are usually affected, as these undergo a long maturing phase, and clostridia can multiply during this storage. The considered sources of contamination for these bacteria are feces and skin of the slaughtered animals. Nevertheless, there are only few studies worldwide that focus on the prevalence of *C. estertheticum* in feces and on the skin of cattle.

To assess the occurrence of *C. estertheticum* and the related species *C. frigorophilum* in adult cattle in Austria, 260 fecal and 260 hide swap samples were collected from 26 farms in Salzburg and Tyrol and examined using molecular biological and culture methods in this study. The samples were primarily enriched in Peptone-Yeast-Glucose-Starch (PYGS)-broth at 4 °C and then subjected to DNA extraction and qPCR. Using the qPCR with probes, 22.3 % and 11.2 % of the tested fecal samples and 0.8 % and 2.3 % of the hide swap samples were positive for *C. estertheticum* and *C. frigorophilum*, respectively. A total of 84 PCR-positive samples underwent cultural examination on Columbia Blood Agar (CBA). After incubation at 10 °C for at least three to four weeks and subsequent subcultivation, *C. estertheticum* and *C. frigorophilum* were isolated from 29.8 % (n = 25/84) of the PCR-positive samples. It can therefore be confirmed that cattle feces are an important source of *C. estertheticum*, although the occurrence of this bacterium in cattle in Austria is classified as moderate.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

bidest.: bidestillatus

BPS: blown pack spoilage

bp: Basenpaare

C.: *Clostridium*

CBA: Columbia Blood Agar

DCA: Differential Clostridial Agar

IS: Iron Sulphite

LMSVG: Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz

NTC: No Template Control

PYGS: pepton-yeast-glucose-starch

RFU: Relative Fluorescence Unit

rRNA: ribosomale RNA

SCA: Sulfite Cycloserine Azide

spp.: species pluralis

subsp.: subspecies

TSC: Tryptose Sulphite Cycloserine

TSN: Tryptose Sulphite Neomycin

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG

ABSTRACT

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. <i>Clostridium</i> spp.	3
2.1.1. Kältetolerante <i>Clostridium</i> spp.	4
2.1.2. <i>Clostridium estertheticum</i>	4
2.2. Fleischverderb und Kontaminationsquellen	5
3. TIERE, MATERIAL UND METHODIK	7
3.1. Betriebe und Tiermaterial	7
3.2. Methodik	9
3.2.1. Studienaufbau	9
3.2.2. Referenz Clostridienstämme	11
3.2.3. Herstellung von Kulturmedium zur Anreicherung (PYGS)	11
3.2.4. Probenverarbeitung und -anreicherung	12
3.2.5. Molekularbiologische Untersuchung	13
3.2.5.1. DNA-Extraktion Probenanreicherung	13
3.2.5.2. DNA-Extraktion Reinkultur	15
3.2.5.3. Quantitative PCR (qPCR)	16
3.2.6. Mikrobiologische Untersuchung	18
3.3. Statistik	20
4. ERGEBNISSE	21
4.1. Molekularbiologische Untersuchung	21
4.1.1. Vergleichen der DNA-Extraktionsmethoden	21
4.1.2. qPCR-Ergebnis der Proben für Clostridien	22
4.2. Mikrobiologische Untersuchung und Spezies Identifizierung	26
5. DISKUSSION	29
6. LITERATURVERZEICHNIS	34

7. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	39
8. ANHANG.....	40
DANKSAGUNG	43

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Der Fleischverbrauch pro Kopf belief sich in Österreich 2023 auf 86,6 kg. Der Verbrauch sank zwar im Vergleich zu den vergangenen Jahren, jedoch sind es immer noch enorme Mengen an Fleisch, die jedes Jahr konsumiert werden (1). Im Jahr 2023 betrug der Selbstversorgungsgrad für Rindfleisch in Österreich 148 %. Dies bedeutet einen deutlichen Überschuss an im Inland produzierter Ware im Vergleich zum Verbrauch und damit Ware, die für den Export zur Verfügung steht (2). Der immer noch hohe Konsum bzw. die übermäßige Produktion von Rindfleisch in Österreich stellen eine enorme Belastung für das Klima dar. Die Herstellung bedarf einer großen Menge an Ressourcen, weshalb Verschwendung oder vermeidbarer Verderb verhindert werden sollten (3). Eine Art des Fleischverderbs, der bei vakuumverpacktem Fleisch auftritt, ist der sogenannte „blown pack spoilage“ (BPS). Er wird durch kältetolerante Clostridien, insbesondere durch *C. estertheticum*, hervorgerufen. *C. estertheticum* wurde erstmals 1989 im Vereinigten Königreich isoliert (4), seither wird über das Auftreten von kältetoleranten Clostridien im Zusammenhang mit BPS weltweit berichtet. Es sind zwar keine negativen gesundheitlichen Folgen durch den Verzehr von betroffenem Fleisch bekannt (5), jedoch ist das Inverkehrbringen und jegliche Verarbeitung solchen Fleisches in der Europäischen Union durch die VO (EG) Nr. 178/2002 (6) und in Österreich zusätzlich durch das Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz (LMSVG, BGBl. I Nr. 13/2006) untersagt (7).

Berichte von Fleischverderb durch kältetolerante Clostridien mit aufgeblähter Verpackung traten vor allem in Fleischbetrieben auf, welche entsprechende Waren lagern. Der Verderb geschieht meist ohne Verpackungsfehler und ohne Temperaturmissbrauch und stellt daher für Fleischproduzenten eine enorme Herausforderung dar (8). Durch das Entsorgen der betroffenen Chargen, kommt es zu großen wirtschaftlichen Verlusten (9). Da kältetolerante Clostridien in der Regel in Böden der gemäßigten und subtropischen Klimazonen vorkommen, werden die Bakterien beim Weidegang der Rinder aufgenommen. Dadurch stellen Fäkalien und die mit Erde und Kot kontaminierten Häute von geschlachteten Tieren eine Kontaminationsquelle für Rindfleisch dar. Die größte Herausforderung im Schlachtprozess ist daher der Schritt der Enthäutung (10).

Obwohl Rinderkot und -haut als wichtige Kontaminationsquellen für Fleisch gelten, gibt es weltweit nur wenige Studien über die Prävalenz von *C. estertheticum* in diesen Proben. Die meisten Studien beschäftigen sich mit dem Vorkommen von kältetoleranten Clostridien oder *C. estertheticum* in vakuumverpacktem Fleisch. Die Rinderhaltung ist in Österreich von großer Bedeutung und Alm- bzw. Weidehaltung sind in diesem Zusammenhang weit verbreitet. Aufgrund dessen ist das Anliegen dieser Studie einen ersten Überblick über die Prävalenz von *C. estertheticum* in Österreich zu geben. Diese Studie ist Teil eines Projekts zur Erhebung von Daten über kältetolerante Clostridien, insbesondere *C. estertheticum*, in Rindfleisch und Rindern (Kot und Haut) in Österreich. Die Ergebnisse dieser Studie sollen dazu beitragen das Risiko einer Kontamination mit *C. estertheticum* für Fleisch einzuschätzen. So können Strategien für die Anlieferung von Rindern zur Schlachtung und die Hygienemaßnahmen während der Schlachtung evaluiert werden, um das Risiko einer Kontamination zu minimieren.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. *Clostridium* spp.

Bei *Clostridium* spp. handelt es sich um eine große, heterogene Gattung von Mikroorganismen, die dem Phylum *Firmicutes* angehört und rund 231 beschriebene Spezies umfasst (11). Clostridien sind stäbchenförmig, zeigen sich in der Gram-Färbung meist positiv und die meisten Spezies wachsen nur unter strikt anaerober Atmosphäre, können Sulfat nicht reduzieren und sind in der Lage Endosporen zu bilden (11, 12). Die Stäbchen unterscheiden sich teils erheblich in Form und Länge, auch die Form der Sporen variiert von kugelförmig bis oval (11). Abhängig von der Clostridien-Spezies können die Endosporen zentrale, subterminale oder terminale Positionen einnehmen. Zellen, die Endosporen enthalten, wirken aufgrund der schlanken Beschaffenheit des Mutterzellsporangiums geschwollen (13). Endosporen von Clostridien sind resistent gegen extreme Umwelteinflüsse, wie zum Beispiel Hitze, einige Chemikalien und Austrocknung (11). Clostridien sind ubiquitär und werden häufig im Boden, in Ablagerungen am Meeresboden, in pflanzlichen und tierischen Produkten sowie im Verdauungstrakt und in infizierten Weichgewebswunden von Menschen und Tieren gefunden (13).

Zu den humanmedizinisch bedeutsamsten Spezies gehören unter anderem *C. perfringens* und *C. botulinum*, da sie schwere Erkrankungen wie Gasbrand bzw. Botulismus verursachen können (12). *C. perfringens* ist eine der am weitesten verbreiteten pathogenen Bakterien und kann im Boden und im Verdauungstrakt von Menschen und Tieren gefunden werden (13). Es ist in der Lage Wundinfektionen (z.B. Gasbrand), Enteritis und Enterokolitis auszulösen. Dies passiert durch die Produktion verschiedener Toxine, die sich je nach *C. perfringens*-Stamm unterscheiden (14). Die von *C. botulinum* produzierten Botulinum-Neurotoxine zählen zu den potentesten natürlichen Toxinen. Sie verursachen Botulismus, der meist mit den klinischen Symptomen einer akuten, afebrilen, symmetrisch absteigenden schlaffen Lähmung einhergeht (15). Es werden unter anderem Lebensmittelbotulismus, Wundbotulismus, Säuglingsbotulismus und Inhalationsbotulismus unterschieden, wobei Lebensmittelbotulismus die am häufigsten vorkommende Form in Europa darstellt (16). Lebensmittelbotulismus wird in vielen Fällen durch hausgemachte Konserven hervorgerufen und Patientinnen und Patienten zeigen gastrointestinale Symptome wie Erbrechen, Übelkeit und Diarrhoe (17).

2.1.1. Kältetolerante *Clostridium* spp.

Aufgrund noch fehlender Einteilung einiger Spezies umfasst der Begriff kältetolerant in dieser Arbeit sowohl psychrophile als auch psychrotrophe Stämme, die jeweils bei einer Temperaturspanne von -5 °C bis 20 °C (optimal bei 12 °C bis 15 °C) und von -5 °C bis 35 °C (optimal bei 25 °C bis 30 °C) wachsen (18). Kältetolerante Clostridien sind vor allem für den Verderb von gekühltem, vakuum-verpacktem Fleisch bekannt. Die bekannteste Spezies dieser Gruppe ist *C. estertheticum*. Der Verderb durch kältetolerante Clostridien, insbesondere durch die Spezies *C. estertheticum* und *C. gasigenes*, ist durch eine hohe Gasproduktion (einer Mischung aus H₂ und CO₂) gekennzeichnet und wird als „blown pack spoilage“ (BPS) bezeichnet (19). Andere kältetolerante Clostridien-Spezies, wie zum Beispiel *C. algidicarnis*, *C. frigoris*, *C. bowmanii* und *C. frigidicarnis*, verderben zwar ebenfalls vakuumverpacktes Fleisch, produzieren jedoch geringere Gasmengen (20).

Kältetolerante Clostridien kommen in Permafrostböden vor und breiten sich in allen Böden der gemäßigten und subtropischen Klimazonen aus. *C. bowmanii* und *C. frigoris* wurden beispielsweise erstmals aus Permafrostboden rund um einen Süßwassersee in der Antarktis isoliert (21) und *C. tagluense* wurde erstmals in der kanadischen Hocharktis entdeckt (22). Bei anderen Spezies wiederum erfolgte die Isolierung zuerst aus Fleisch. *C. estertheticum* wurde beispielsweise erstmals 1989 im Vereinigten Königreich aus vakuum-verpacktem Rindfleisch isoliert (4), *C. algidicarnis* wiederum wurde 1994 aus vakuum-verpacktem, gekühltem Schweinefleisch gewonnen (23) und auch *C. gasigenes* wurde erstmals 2000 aus vakuum-verpacktem Lammfleisch in Neuseeland isoliert (24).

2.1.2. *Clostridium estertheticum*

C. estertheticum ist die bekannteste psychrophile Clostridien-Spezies. Sie wurde in Fleisch aus unterschiedlichsten Ländern nachgewiesen, darunter Brasilien, Kanada, Deutschland, Irland, Neuseeland, die Schweiz und die Vereinigten Staaten (25). Namensgebend für das Bakterium ist die Fähigkeit Ester zu formen. Es wächst in einem Temperaturbereich zwischen -2 °C und 22 °C, mit einem Temperaturoptimum von 6 °C bis 15 °C (19). Da über 25 °C kein Wachstum mehr möglich ist, wird *C. estertheticum* zu den psychrophilen (kälteliebenden) Clostridien gezählt (26). Wachstum findet in einem pH-Bereich von 5,5–7,5 statt, optimal ist ein Bereich

zwischen 5,8 und 6,8. (19). *C. estertheticum* ist eines der hauptverantwortlichen Bakterien die BPS hervorrufen. Bei dieser Art des Fleischverderbs blähen sich Vakuumverpackungen mit Fleisch durch die Produktion hoher Gasmengen auf. Wasserstoff und Kohlendioxid sind die Hauptbestandteile des enthaltenen Gases (24, 4). Weitere Bestandteile sind Butyl-Ester, Buttersäure und Butanol, wodurch man bei *C. estertheticum* auf einen fermentativen Stoffwechseltyp mit Buttersäuregärung schließen kann (27). Der Geruch der geöffneten, von BPS betroffenen Packungen wird als schwefelhaltig, fruchtig, lösungsmittelartig und stark käsig beschrieben (24, 4). Butanol ist für die Entstehung des käsigen bzw. milchigen Geruchs verantwortlich (27).

C. frigoriphilum wurde erstmals 2005 aus Permafrostboden in Sibirien in Russland isoliert (28). Vergleicht man die 16S ribosomale RNA (rRNA)-Gene von *C. estertheticum* und *C. frigoriphilum*, sind sich diese sehr ähnlich und auch durch Sequenzierung nur schwer zu unterscheiden (29, 30). Dennoch sind die Stellen auf den 16S rRNA-Genen, an denen die qPCR-Sonden für *C. estertheticum* und *C. frigoriphilum* von Dorn-In et al. (2018) binden, ausreichend, um die beiden Arten durch Sonden-qPCR zu unterscheiden (29). Jedoch schlägt Wambui et al. (2021) aufgrund der starken Ähnlichkeit der Genome vor *C. frigoriphilum* als Subspezies von *C. estertheticum* zu reklassifizieren (30).

2.2. Fleischverderb und Kontaminationsquellen

Fleischverderb wird durch mikrobiologische und chemische Aktivität verursacht. Vor allem bei rohem Fleisch spielen mikrobiologische Faktoren eine wichtige Rolle. Fleisch von gesunden Tieren ist generell frei von Mikroorganismen. Zur ersten mikrobiellen Kontamination kommt es bei der Schlachtung, insbesondere während der Enthäutung des Rindes und der Entfernung des Magen-Darm-Trakts, wenn der Schlachtkörper in Kontakt mit einer Kontaminationsquelle (z.B. Tierhaut oder Kot) kommt. Während der Zerlegung des Schlachtkörpers können kontaminiertes Schlachtzubehör, Personal und Umweltfaktoren wie Wasser, Luft und Boden als Kontaminationsquellen für Pathogene oder Verderbserreger eine Rolle spielen (19). Die mikrobielle Belastung wird in erster Linie durch Fleischart, Prozessierung, Verteilung und Lagerung bestimmt. Neben der Lagerung beeinflussen sowohl intrinsische als auch extrinsische Faktoren, wie Sauerstoffverfügbarkeit, pH-Wert, Temperatur und konkurrierende Organismen

den Fleischverderb (19). Um Fleischverderb durch herkömmliche anaerobe Verderbserreger, wie Pseudomonaden, bei der Lagerung zu minimieren/vermeiden, wird Fleisch vakuumverpackt und kühlgelagert. Bei der Vakuumverpackung wird eine anaerobe Umgebung durch das Absaugen des Sauerstoffs erreicht und die Packung anschließend sofort versiegelt (19). Der Ausschluss von Sauerstoff verändert die Gaszusammensetzung und schafft so Hürden für aerobe Bakterien, erleichtert aber das Wachstum fakultativer (z.B. Milchsäurebakterien und *Enterobacteriaceae*) und strikter Anaerobier (31). Ein Verderb von Fleisch durch kältetolerante Clostridien tritt meist ohne Temperaturmissbrauch und ohne Verpackungsfehler auf (8).

Mögliche Quellen für eine Verunreinigung von Fleisch mit kältetoleranten Clostridien stellen unter anderem die Stallumgebung (Wände und Decke), Transportfahrzeuge und die Enthäutung der Tiere dar. Tierhäute können durch Fäkalien der Tiere und sich in der Erde befindliche Sporen kontaminiert werden (10).

3. TIERE, MATERIAL UND METHODIK

3.1. Betriebe und Tiermaterial

Diese Studie wurde von der Ethik- und Tierschutzkommission der veterinärmedizinischen Universität Wien auf ihre Übereinstimmung mit der Good Scientific Practice und den einschlägigen nationalen Rechtsvorschriften geprüft und befürwortet (Geschäftszahl ETK-047/03/2023).

Die Tierbesitzerinnen und Tierbesitzer wurden schriftlich, mittels eines Formulars (siehe Anhang), sowie mündlich über die Art der Eingriffe informiert und haben diesen sowie der anonymisierten Verarbeitung der gesammelten Daten per Unterschrift zugestimmt.

Im Rahmen der Studie wurden von März 2023 bis Juli 2023 insgesamt 520 Proben (davon 260 Kot- und 260 Fellwischproben) von 260 Rindern aus 26 Betrieben in den Bundesländern Salzburg und Tirol gewonnen. Die Anzahl der Rinder pro Betrieb variierte: 15 Betriebe hatten 12 bis 40 Rinder, 8 Betriebe hatten 55 bis 95 Rinder und 3 Betriebe hatten 101 bis 140 Rinder. Die beprobten Betriebe befinden sich im Bezirk Salzburg-Umgebung ($n = 17$), im Bezirk Zell am See ($n = 6$), im Bezirk Salzburg Stadt ($n = 2$) und im Bezirk Kitzbühel ($n = 1$). Die Lokalisation auf Gemeindeebene ist in Abbildung 1 ersichtlich.

Um ein zusätzliches Einfangen und Fixieren der Tiere zu vermeiden, erfolgte die Beprobung während der Fütterung, wobei die Tiere in ihren gewohnten Fressgittern fixiert wurden. Pro Betrieb wurden zehn erwachsene Tiere zur Probengewinnung herangezogen. Es wurde je eine Kot- und eine Fellwischprobe desselben Tieres genommen. Die Kotproben wurden rektal oder, wenn das Rind frischen Kot abgesetzt hatte und die Zuordnung zum Tier eindeutig möglich war, vom Boden genommen. Die Veterinärhandschuhe, die die Kotproben enthielten, wurden verknotet, um ein Auslaufen von Kot zu verhindern, und anschließend für den Transport in eine Styroporbox mit Kühllakku gelegt. Zur Gewinnung der Fellwischproben wurde ein 1 m² großer Bereich am Hinterviertel der Rinder mit einem angefeuchteten handelsüblichen Schwammtuch (S/Budget Schwammtuch, 18 x 10 x 0,3 cm) mehrmals vertikal und horizontal abgewischt. Danach wurde das Schwammtuch in einen Stomacherbeutel gepackt und für den Transport in die Styroporbox mit Kühllakku gegeben. Während des Transports betrug die Temperatur in der Styroporbox circa 10 (± 2) °C. Die Proben wurden innerhalb von 12 Stunden nach der

Probennahme an einen geeigneten Lagerplatz mit einer Temperatur von 4 °C gebracht und innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach der Beprobung in flüssigem Nährmedium homogenisiert und angereichert.

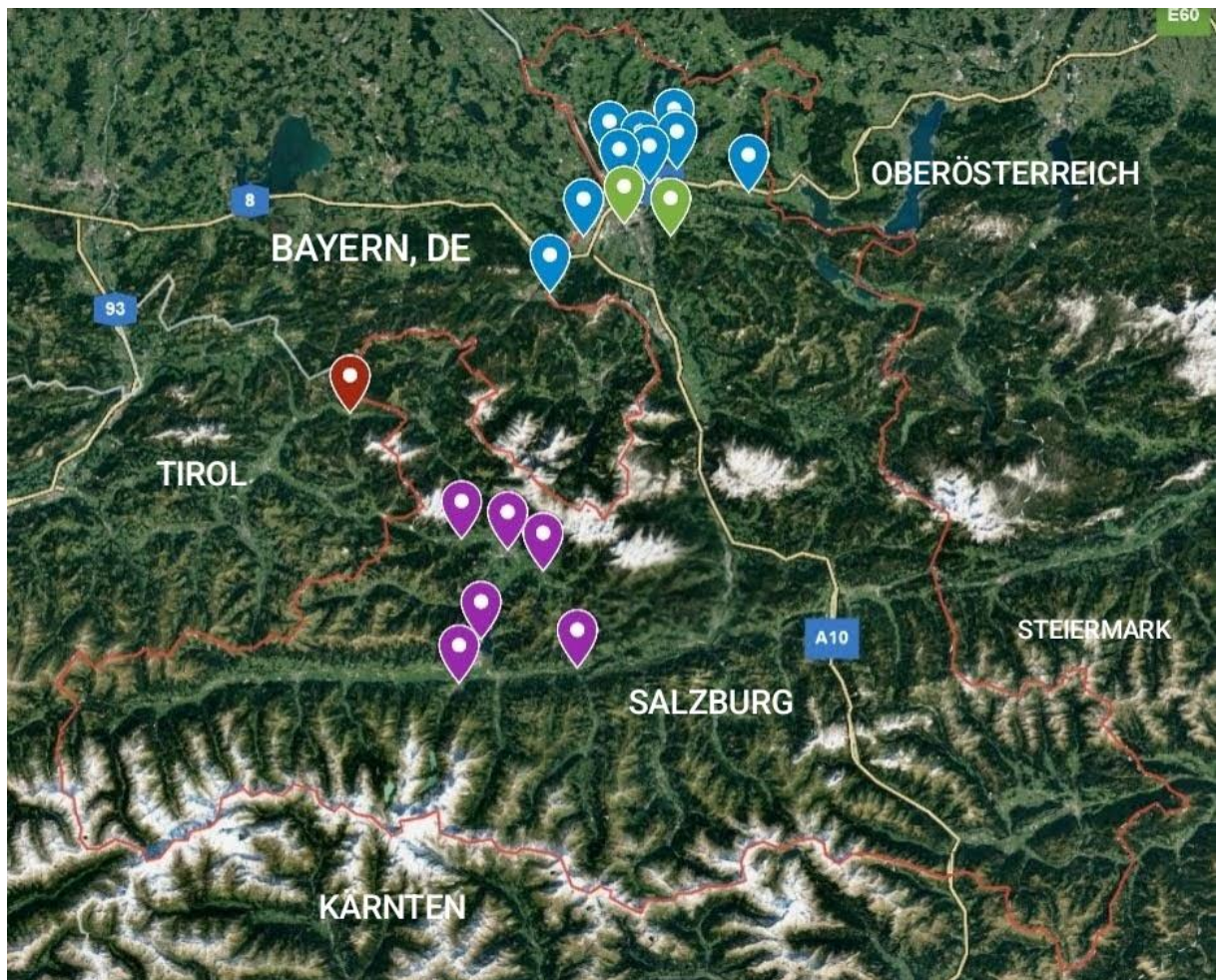


Abb. 1: Standorte der Betriebe nach Bezirken geteilt. Blau = Bezirk Salzburg Umgebung, Violett = Bezirk Zell am See, Grün = Bezirk Salzburg Stadt, Rot = Bezirk Kitzbühel

3.2. Methodik

3.2.1. Studienaufbau

Vor Beginn der Untersuchung wurde ein Nährmedium, Pepton-Yeast-Glucose-Starch (PYGS)-Bouillon, hergestellt (siehe Punkt 3.2.3). Die gewonnenen Kot- und Fellwischproben wurden, wie unter Punkt 3.2.4 beschrieben, verarbeitet und in der PYGS-Bouillon angereichert. Im Anschluss an die Anreicherung wurden eine DNA-Extraktion und eine multiplex qPCR mit Sonden durchgeführt.

Proben, die positive PCR-Ergebnisse für *C. estertheticum* oder *C. frigoriophilum* lieferten, wurden zur kulturellen Untersuchung herangezogen. Hierfür wurden die unbehandelten und erhitzten Anreicherungen auf Blutagarplatten aufgebracht (siehe Punkt 3.2.6). Im letzten Schritt wurden die gewonnenen Kolonien auf Blutagarplatten subkultiviert, um genügend Koloniematerial für die DNA-Extraktion und gegebenenfalls für andere Zwecke (z.B. für das Anlegen einer Stammsammlung per Kryokonservierung bei -80 °C) zu erhalten. Die gewachsenen Reinkulturen wurden einer DNA-Extraktion und qPCR unterzogen, um die Spezies der Isolate zu bestimmen. Abbildung 2 zeigt ein Schema des beschriebenen Studienaufbaus.

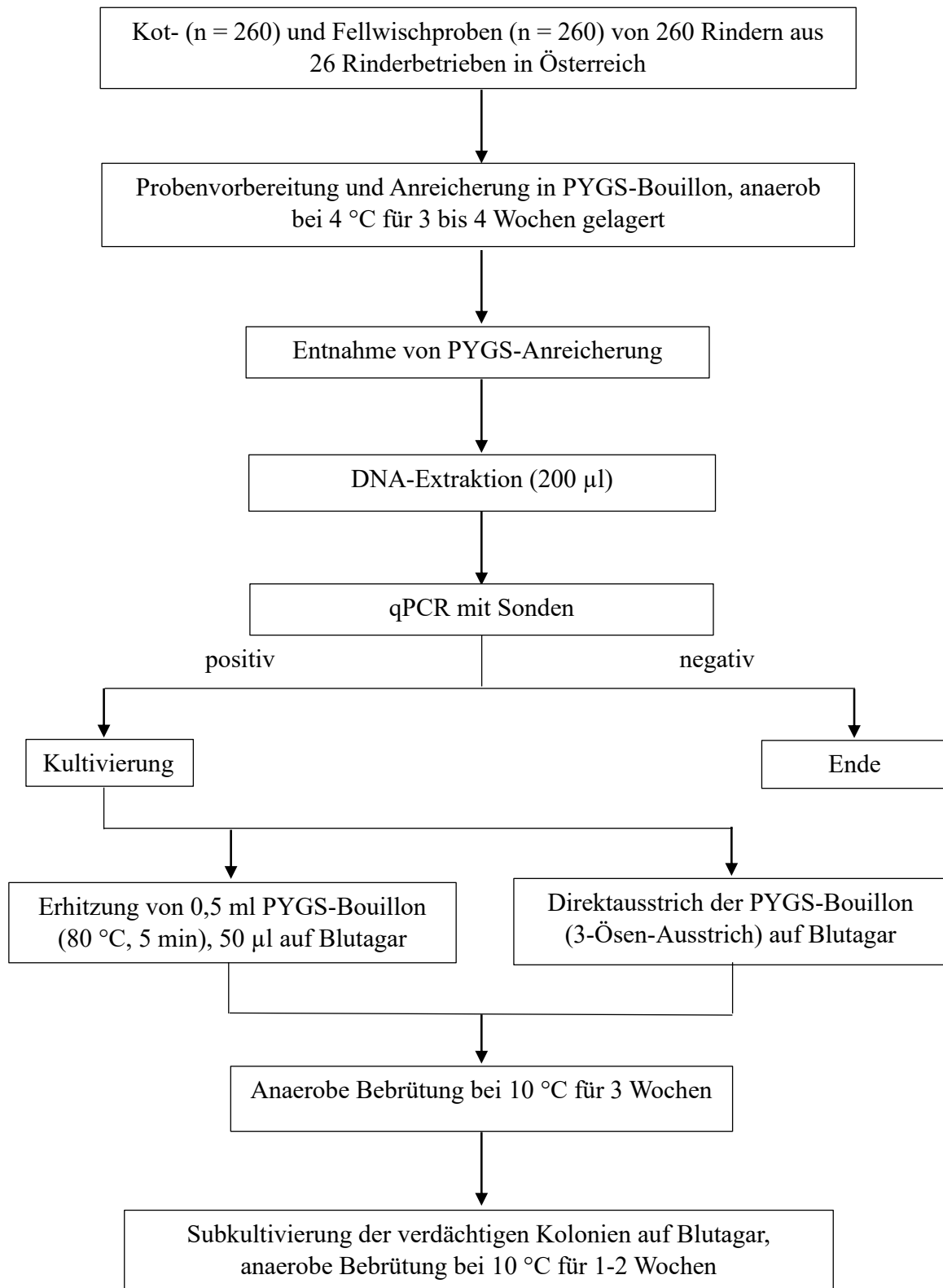


Abb. 2: Schema des Studienaufbaus

3.2.2. Referenz Clostridienstämme

Folgende Referenz-Clostridienstämme wurden in dieser Studie verwendet: *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* (DSM 8809), *C. frigoriphilum* (DSM 17811), *C. algidicarnis* (DSM 15099), *C. gasigenes* (DSM 12272), *C. bowmanii* und *C. tagluense*-like (jeweils isoliert aus Fleisch, bestätigt durch Sequenzierung der 16S rRNA-Gene, Dorn-In et al. (2018)) (29). Diese Clostridienstämme wurden in PYGS-Bouillon subkultiviert und bei 10 °C für vier Wochen bebrütet. *C. estertheticum*, *C. frigoriphilum*, *C. bowmanii* und *C. tagluense*-like wurden als Reinkultur der DNA-Extraktion unterzogen und als PCR-Positivkontrollen verwendet. Kotsuspensionen wurden künstlich mit den Spezies *C. estertheticum*, *C. algidicarnis* und *C. gasigenes* kontaminiert, um die Effizienz der DNA-Extraktionsmethode zu prüfen.

3.2.3. Herstellung von Kulturmedium zur Anreicherung (PYGS)

Die für die Anreicherung der Proben benötigte Pepton-Yeast-Glucose-Starch (PYGS)-Bouillon nach Lund et al. (1990) wurde mit den Komponenten, die in Tabelle 1, Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgelistet sind, hergestellt (28). Die Zutaten aus Tabelle 1 wurden in einer 1 Liter Flasche gemischt und anschließend bei 125 °C für 15 min autoklaviert.

Tab. 1: Komponenten PYGS-Bouillon

Komponenten	pro 1 L	Firma
Proteose Pepton	5 g	Oxoid,
Trypton	5 g	Merck
Hefeextrakt granuliert	10 g	Merck
Rindfleischextrakt	10 g	Oxoid, Thermofischer
Glucose-Monohydrat	2 g	Merck
Stärke löslich	1 g	Merck
Resazurin (0,001 g/L) von 1 % Stammlösung	0,1 ml	Sigma-Aldrich
Cystein HCl	0,2 g	Merck, Sigma Aldrich
Silicon-Entschäumer von 20 % v/v Lösung	0,25 ml	Merck

Salzlösung A	40 ml	Siehe Tab. 2
Salzlösung B	40 ml	Siehe Tab. 3

Tab. 2: Komponenten Salzlösung A

Komponenten	pro 1 L	Firma
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,265 g	Merck
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,48 g	Merck
NaCl	2 g	Merck

Tab. 3: Komponenten Salzlösung B

Komponenten	pro 1 L	Firma
KH_2PO_4	1 g	Merck
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1,3 g	Merck
NaHCO_3	10 g	Merck

3.2.4. Probenverarbeitung und -anreicherung

Zu den Schwammtuchproben (Fellwischproben) in den Stomacherbeuteln wurden je 50 ml PYGS-Bouillon hinzugefügt. Es wurden 10 g der Kotprobe in einen Stomacherbeutel eingewogen und mit 90 ml PYGS-Bouillon aufgefüllt. Danach wurden die Proben in einem Labor-Stomacher (BagMixer, Interscience) für 30 sec homogenisiert. Die Probensuspension (14 ml) wurde in ein Glasröhrchen überführt und anaerob (mittels AnaeroGenTM, Thermo ScientificTM/OxoidTM) bei 4 °C für vier bis sechs Wochen bebrütet.

3.2.5. Molekularbiologische Untersuchung

3.2.5.1. DNA-Extraktion Probenanreicherung

In Kotproben befinden sich unterschiedliche PCR-Inhibitoren, die die Amplifikation der qPCR verhindern. Daher spielt die Effizienz der DNA-Extraktionsmethode bei Kotproben eine große Rolle für den Erfolg der qPCR. Vor Beginn der Studie wurden drei DNA-Extraktionsmethoden an den PYGS-Anreicherungen der Kotproben getestet, QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen), High Pure Template Preparation Kit (Roche) und die Kombination von InhibitEX Buffer (Qiagen) und High Pure Template Preparation Kit (Roche). Die 0,9 ml Rinderkotprobe in der PYGS-Bouillon (Konzentration: 1 g zu 10 ml, ohne Anreicherung) wurden mit 100 µl Anreicherung verschiedener Clostridien-Isolate, *C. estertheticum*, *C. algidicarnis* und *C. gasigenes*, kontaminiert. Danach wurden die drei DNA-Extraktionsmethoden, jeweils doppelt angesetzt, einer qPCR 1 (siehe Abschnitt 3.2.5.3) unterzogen. Die Ct-Werte der Proben von allen drei DNA-Extraktionsmethoden wurden verglichen.

Nach der Überprüfung der Effizienz der DNA-Extraktionsmethoden wurde die Kombination aus InhibitEX Buffer (Qiagen) und High Pure Template Preparation Kit (Roche) als gute und kosteneffiziente Methode bewertet und dementsprechend für die PYGS-Anreicherungsproben in dieser Studie verwendet. Laut Angabe des Herstellers wird der InhibitEX Buffer verwendet, um die PCR-Inhibitoren der DNA zu entfernen, die häufig in Stuhlproben vorkommen.

Es wurden 200 µl der PYGS-Anreicherung in ein 1,5 ml Röhrchen überführt, dann wurde 1 ml InhibitEX Buffer hinzugefügt und für 15 sec gevortext. Anschließend wurde die Suspension bei 95 °C für 5 min in einem Thermomixer (Eppendorf) erhitzt, anschließend 15 sec gevortext. Um feste Bestandteile der Probe abzutrennen, wurde das Gemisch bei 20.000 x g für 1 min zentrifugiert. Zum Schluss wurden 200 µl des Überstandes in ein neues 1,5 ml Röhrchen überführt.

Die 200 µl wurden einer Extraktion mit dem High Pure Template Preparation Kit (Roche) unterzogen. Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt:

+ 200 µl Proben-Suspension

+ 10 µl Lysozyme (20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0): Endkonzentration = 1 mg/ml

- ↓
- 5 sec vortexen, kurz runterzentrifugieren (5 sec bei 8.000 x g)
 - Inkubation bei 37 °C, 30 min (ohne Schütteln!)
 - 5 sec vortexen

+ 200 µl Bindungspuffer

+ 40 µl Proteinase K (600 mAU/ml)

- ↓
- 5 sec vortexen, kurz runterzentrifugieren (5 sec bei 8.000 x g)
 - Inkubation bei 70 °C, 10 min (in Eppendorf-Thermomixer, ohne Schütteln!)

+ 100 µl Isopropanol

- ↓
- 5 sec vortexen, kurz runterzentrifugieren (5 sec bei 8.000 x g)
 - Filterröhrchen in ein Sammelröhrchen überführen
 - Auftragen von 500 µl in Filterröhrchen
 - Zentrifugation: 8.000 x g, 1 min
 - Durchfluss und Sammelröhrchen verwerfen
 - Filterröhrchen in neues Sammelröhrchen überführen

+ 500 µl Puffer zur Inhibitoren-Entfernung in das Filterröhrchen

- ↓
- Zentrifugation: 8.000 x g, 1 min
 - Durchfluss und Sammelröhrchen verwerfen
 - Filterröhrchen in neues Sammelröhrchen überführen

+ 500 µl Wasch-Puffer (erstes Waschen)

- ↓
- Zentrifugation: 8.000 x g, 1 min
 - Durchfluss und Sammelröhrchen verwerfen
 - Filterröhrchen in neues Sammelröhrchen überführen

+ 500 µl Wasch-Puffer (zweites Waschen)

- 
- Zentrifugation: 8.000 x g, 1 min
 - Durchfluss verwerfen
 - Filterröhrchen zurück in dasselbe Sammelröhrchen
 - Zentrifugation: 16.000 x g, 2 min
 - Durchfluss und Sammelröhrchen verwerfen
 - Filterröhrchen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß

+ 200 µl vorgewärmter Elutionspuffer (Vorwärmen des Elutionspuffer auf 70 °C)

- 
- Zentrifugation: 8.000 x g, 1 min
 - Filterröhrchen verwerfen

DNA liegt im Eluat vor; Aufbewahrung bei +2 bis +8 °C oder bei -20 °C, wenn es länger als eine Woche aufbewahrt werden soll.

3.2.5.2. DNA-Extraktion Reinkultur

Die einfache DNA-Extraktionsmethode (sogenannte Koch-Methode) wurde für die Reinkulturen bzw. die Kolonien aus Blutagar verwendet. Die Methode wurde bereits in anderen Studien von z.B. Dorn-In et al. (2022) und Mang et al. (2021) angewendet (33, 25). Die Arbeitsschritte sind folgende:

500 µl autoklaviertes bidest. Wasser in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen vorlegen



Einzelkolonie (oder pooled) der Reinkultur mit Impföse oder 10 µl Pipettenspitze (steril) „antupfen“

- 
- In das Wasser bringen
 - Wasser soll leicht trüb sein (zu viele Keime verhindern die Effizienz der DNA-Extraktion und damit die qPCR-Amplifikation)

100 µl Keimsuspension in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen übertragen



+ 5 µl Lysozyme (20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0): Endkonzentration = 1 mg/ml



- 5 sec vortexen, kurz runterzentrifugieren (5 sec bei 8.000 x g)
- Inkubation bei 37 °C für 30 min
- 5 sec vortexen, kurz runterzentrifugieren (5 sec bei 8.000 x g)

+ 10 µl Proteinase K (600 mAU/ml)



- 5 sec vortexen, kurz runterzentrifugieren (5 sec bei 8.000 x g)
- Inkubation bei 70 °C für 10 min (in Eppendorf-Thermomixer)
- 5 sec vortexen, kurz runterzentrifugieren (5 sec bei 8.000 x g)

bei 99 °C für 15 min kochen (in Eppendorf-Thermomixer)



Zentrifugieren bei 12.000 x g, 1 min



ca. 80 µl des Überstands in neues 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführen, Pellet verwerfen



Überstand für PCR verwenden. Bei baldiger Verwendung bei +2 bis +8 °C aufbewahren, für längerfristige Aufbewahrung (länger als eine Woche) bei -20 °C lagern.

3.2.5.3. Quantitative PCR (qPCR)

Die DNA-Extrakte wurden durch zwei qPCR-Verfahren (qPCR 1 und 2, siehe Tabelle 4) getestet. Die qPCR 1 wurde verwendet, um das Vorhandensein von Clostridien zu überprüfen. Proben, die ein nicht eindeutiges oder negatives Ergebnis in qPCR 1 (für Clostridien) lieferten, wurden folgend einer qPCR für universale Bakterien (qPCR 2) unterzogen, um den Erfolg der DNA-Extraktion zu bestätigen.

Hierzu wurden für die qPCR 1 das Primerpaar für Clostridien TM-F (34) und Cl642-R (29), sowie fünf Taqman-Sonden, die für die Gattung *Clostridium* spp. (33) und weitere vier Clostridien-Spezies (27) spezifisch sind, verwendet (siehe Tabelle 4). Der Zielabschnitt der PCR-Amplifikation ist das 16S rRNA-Gen. Die Fragmentgröße der Amplifikate beträgt circa 566 bp. Für die qPCR 2 wurden das Primerpaar für universale Bakterien 335-F (35) und Uni923-R (36) und eine universale Sonde Uni799 (36) verwendet (siehe Tabelle 4). Der Zielabschnitt der PCR-Amplifikation ist das 16S rRNA-Gen. Die Fragmentgröße der Amplifikate beträgt circa 604 bp.

Der Mastermix für die qPCR enthielt folgende Komponenten: 0,25 µM pro Primer, 0,1 µM pro Sonde, 10 µl SensiFast™ No-Rox Probe (Bioline™/Meridian™), 2 µl der jeweiligen DNA-Probe und RNA-freies Wasser. Mit Letzterem wurde das Gesamtvolumen auf 20 µl pro Reaktion aufgefüllt. Das qPCR-Protokoll in dem Gerät CFX Opus Real-Time PCR Systems (Bio-Rad™) startete mit initialer Denaturierung bei 95 °C für 5 Minuten. Für jeden der folgenden 40 Zyklen schloss eine Denaturierung bei 95 °C für 5 Sekunden an, gefolgt vom Annealing und der Elongation bei 60 °C für 30 Sekunden für qPCR 1 (für Clostridien) und bei 62 °C für 20 Sekunden für qPCR 2 (für universale Bakterien).

Um die Validität der qPCR zu zeigen, wurden Positiv- sowie Negativkontrollen beigelegt. Für jeden PCR-Lauf sind DNA-Extrakte von vier Clostridien-Spezies als Positivkontrollen mitgelaufen: *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* (DSM 8809), *C. frigoriphilum* (DSM 17811), *C. bowmanii* und *C. tagluense*-like (jeweils isoliert aus Fleisch). Die Positivkontrollen wurden verwendet, um die Korrektheit der Herstellung des Mastermix und der Durchführung der qPCR zu kontrollieren. Als „No Template Control, NTC“ fungiert Mastermix, dem RNA-freies Wasser statt DNA-Probe zugegeben wurde, um ausschließen zu können, dass der verwendete Mastermix DNA von Clostridien oder anderen Bakterien enthält und das Ergebnis dadurch verfälscht wurde.

Der Cut-Off der Relative Fluorescence Unit (RFU) wurde festgelegt (siehe Tabelle 5), um die Probe als positiv oder negativ bewerten zu können. Generierte eine der amplifizierten Proben einen RFU-Wert niedriger als der Cut-Off-Wert, so wurde die jeweilige Probe als „negativ“ bewertet.

Tabelle 4: qPCR-Verfahren für Clostridien und universale Bakterien und Sequenzen der Primer und Sonden

qPCR	Spezifität	Primer/Sonde	Farbstoff (5-3)		Sequenz, Richtung'
1	<i>Clostridium</i> spp.	Cl94-F	-	-	CGGCGGACGGGTGAGTAAC
		Cl642-R	-	-	CCTCTCCTGCACTCTAGA
	Universal Clostridien	Cl555	FAM	BHQ-1	CCTTTACRCCCAGTAAATCCGGAC
	<i>C. estertheticum</i>	Cest	Hex	BHQ-1	CAAAGGAATTTTTCGGAATTTCACTTTGAG
	<i>C. frigoriphilum</i>	Cfgrpl	Cy3.5	BHQ-2	CAAAGGAATAGTCTTCGGATTATTTCACT
	<i>C. bowmanii</i>	Cbow	Cy5	BHQ-2	CAAAGGATTCTCTTCGGAGATTCCAC
	<i>C. tagluense</i> -like	Ctag-like	Cy5.5	BBQ-650	CAAAGGATTTTCTTCGGAAAATTCCAC
2	Universal-Bakterien	Uni335-F	-	-	CADACTCCTACGGGAGGC
		Uni923-R	-	-	CTTGTGCGGGCCCCCGT
	Universal-Bakterien	Uni799	Cy5.5	BBQ-650	AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC

Tabelle 5: Relative Fluorescence Unit (RFU)-Cut-Off der jeweiligen Sonde

Sonde	Spezifität	RFU-Cut-Off
Cl555	<i>Clostridium</i> spp.	1000
Cest	<i>C. estertheticum</i>	500
Cfgrpl	<i>C. frigoriphilum</i>	50
Cbow	<i>C. bowmanii</i>	200
Ctag-like	<i>C. tagluense</i> -like	200
Uni799	Universale Bakterien	250

3.2.6. Mikrobiologische Untersuchung

Im Anschluss an die durchgeführte qPCR wurden Proben, die ein positives Ergebnis für *C. estertheticum* und/oder *C. frigoriphilum* lieferten, mittels kultureller Methoden weiter untersucht. Als Ausgangsmaterial wurde die PYGS-Anreicherung, welche auch für die qPCR

verwendet wurde, herangezogen. Hierzu wurden 0,5 ml der jeweiligen PYGS-Anreicherung in ein 1,5 ml Reaktionsröhrchen übertragen und für 5 min bei 80 °C in einem ThermoMixer™ (Eppendorf™) erhitzt, um die vegetativen Keime der „Nicht-Sporenbildern“ abzutöten (29). Dadurch wird ein Nachweis von hitzeresistenten Sporen, wie jene von Clostridien, erleichtert. Unmittelbar nach der Erhitzung wurden 50 µl der hitzebehandelten Proben mittels Tropfplattenverfahren auf eine Blutagarplatte (Columbia agar + 5 % sheep blood, CBA, BioMérieux™) aufgetragen. Parallel dazu wurde die jeweilige Probensuspension ohne Hitzebehandlung unter Einsatz einer 10 µl Impföse auf eine Blutagarplatte mittels 3-Ösen-Ausstrichverfahren ausgestrichen. Anschließend wurden die beiden Blutagarplatten anaerob für drei bis vier Wochen bei 10 °C bebrütet.

Von den bebrüteten Blutagarplatten wurden Kolonien mit unterschiedlichen Morphologien mittels Impföse entnommen und in 0,5 ml sterilem Wasser in einem 1,5 ml Röhrchen gelöst. Diese gemischten (pooled) Kolonien wurden einer DNA-Extraktion mittels Koch-Methode und einer qPCR unterzogen. Die pooled-Kolonie Proben, die in der qPCR für *C. estertheticum* und/oder *C. frigoriphilum* positive Ergebnisse brachten, wurden mittels 3-Ösen-Ausstrichverfahren auf neuen Blutagarplatten subkultiviert.

Die beimpften Blutagarplatten wurden anaerob für circa 14 Tage bei 10 °C bebrütet. Anschließend wurde die DNA der gewachsenen Einzelkolonien (n = 3 bis 6 Kolonien pro Probe) mittels Koch-Extraktionsmethode extrahiert. Die gewonnene DNA wurde einer qPCR 1 (für Clostridien) unterzogen, um zu prüfen, ob es sich um die Spezies *C. estertheticum* und/oder *C. frigoriphilum* handelt. Die qPCR 2 (für universale Bakterien) wurde verwendet, wenn die Ergebnisse von qPCR 1 negativ ausfielen. Wenn auch die qPCR für universale Bakterien negative Ergebnisse brachte, wurde die Proben-DNA mit dem High Pure Template Preparation Kit (Roche) extrahiert und mit der qPCR für Clostridien und ggf. für universale Bakterien erneut getestet.

3.3. Statistik

Anhand der Ergebnisse der qPCR und der kulturellen Methode wurde eine Prävalenz von *C. estertheticum* und *C. frigoriophilum* in den Kotproben, den Fellwischproben und den Rinderbetrieben berechnet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Molekularbiologische Untersuchung

4.1.1. Vergleichen der DNA-Extraktionsmethoden

Tabelle 6 zeigt die Ct-Werte der Sonde Cl555 der drei getesteten Extraktionsmethoden für Reinisolate von *C. estertheticum*, *C. gasigenes* und *C. algidicarnis*, außerdem die Werte einer nativen Kotprobe und drei Kotproben, die mit den bereits erwähnten Clostridien-Spezies kontaminiert wurden.

Die Extraktion der Reinisolate der *Clostridium*-Spezies wurde mit einem Ansatz durchgeführt, der zuerst mit dem DNA-Extraktionskit High Pure Template Preparation Kit (Roche) und danach mit dem QIAmp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) getestet wurde. Hier lieferte das High Pure Template Preparation Kit von Roche bei allen getesteten Isolaten niedrigere Ct-Werte als das Kit von Qiagen und wurde somit als effizientere DNA-Extraktionsmethode für die Reinkultur bewertet.

Nach der erfolgreichen DNA-Extraktion der Reinkultur wurde das DNA-Extraktionskit von Roche für native und kontaminierte Kotproben (im Doppelansatz) verwendet. Es erwies sich jedoch als ungeeignet für die DNA-Extraktion von Kotproben, da es keine PCR-Amplifikation der mit Clostridien kontaminierten Kotproben gab. Daher kam das DNA-Extraktionskit von Qiagen zum Einsatz. Obwohl die DNA-Extraktion von Kotproben mit dem QIAmp Fast DNA Stool Mini Kit als erfolgreich bewertet worden war, fielen die Ct-Werte relativ hoch aus. Außerdem erwies sich die Verwendung des Kits von Qiagen als sehr kostenintensiv. Informationen des Herstellers (Qiagen) zufolge ist der InhibitEX Buffer (Qiagen) das entscheidende Lösungsmittel, um die PCR-Inhibitoren in der Kotprobe zu entfernen. Daher wurde eine Kombination aus dem InhibitEX Buffer und dem Kit von Roche getestet. Diese Kombination zeigte für alle Proben die niedrigsten Ct-Werte und damit die effektivste DNA-Extraktion für Kotproben. Die Ct-Werte der kontaminierten Kotproben waren jedoch höher als die der Reinkulturen, vor allem bei jenen, die einer DNA-Extraktion mit dem Kit von Roche unterzogen worden waren. Hier sollte erwähnt werden, dass die Konzentration von allen drei *Clostridium*-Spezies in den Kotproben eine Log-Stufe niedriger ist als in der Reinkultursuspension, da sie 1:10 mit Kotsuspension verdünnt wurden.

Tab 6: Vergleich der Effizienz der DNA-Extraktionsmethoden: Ct-Werte der Sonde Cl555 (qPCR1) für die Gattung *Clostridium* spp.

	DNA-Extraktionsmethode		
	Roche ¹	Qiagen ²	InhibitEx ³ & Roche ¹
<i>C. estertheticum</i>	23,7	27,0	n.d.
<i>C. gasigenes</i>	22,2	24,9	n.d.
<i>C. algidicarnis</i>	31,5	32,2	n.d.
Kot (1K7) ⁴	33,0 (± 1,86)	32,3 (± 0,08)	31,8 (± 0,37)
Kot + <i>C. estertheticum</i>	N/A	30,3 (± 2,57)	28,3 (± 0,76)
Kot + <i>C. gasigenes</i>	N/A	29,2 (± 2,71)	26,7 (± 1,11)
Kot + <i>C. algidicarnis</i>	N/A	32,7 (± 0,64)	31,6 (± 0,54)

¹ High Pure Template Preparation Kit (Roche); ² QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) und ³ InhibitEX Buffer (Qiagen); n.d. = nicht durchgeführt; N/A = No applicable (keine Amplifikation). Höherer Ct-Wert deutet auf geringere DNA-Konzentration von Clostridien in der Probe. ⁴ 1K7 = Kot von Kuh Nr. 7 von Rinderbetrieb Nr. 1.

4.1.2. qPCR-Ergebnis der Proben für Clostridien

Nach einer vierwöchigen Anreicherung wurden alle Kot- und Fellwischproben einer DNA-Extraktion und qPCR für Clostridien (qPCR 1) unterzogen. Bei der Durchführung der qPCR wurden Positivkontrollen (DNA-Extrakte von *C. estertheticum*, *C. frigorophilum*, *C. bowmanii* und *C. tagluense-like*) und NTC (mit Wasser) mitgeführt. Alle qPCR-Läufe waren auswertbar. Abbildung 3 und Abbildung 4 zeigen exemplarisch die qPCR-Amplifikationskurve von Positivkontrollen und Fellwischproben.

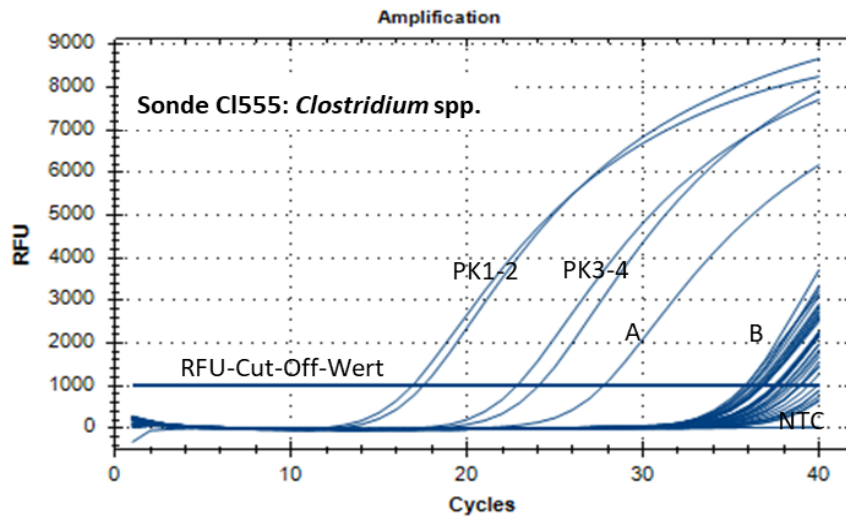


Abbildung 3: Beispiel-Ergebnis der qPCR von 40 Fellwischproben mit der Sonde CI555 für *Clostridium* spp. PK1, 2, 3 und 4 = Positivkontrolle mit der Reihenfolge *C. tagluense*-like, *C. bowmanii*, *C. estertheticum* und *C. frigoriphilum*; A = stark positive Fellwischprobe; B = schwach positive und negative Proben; NTC = No Template Control

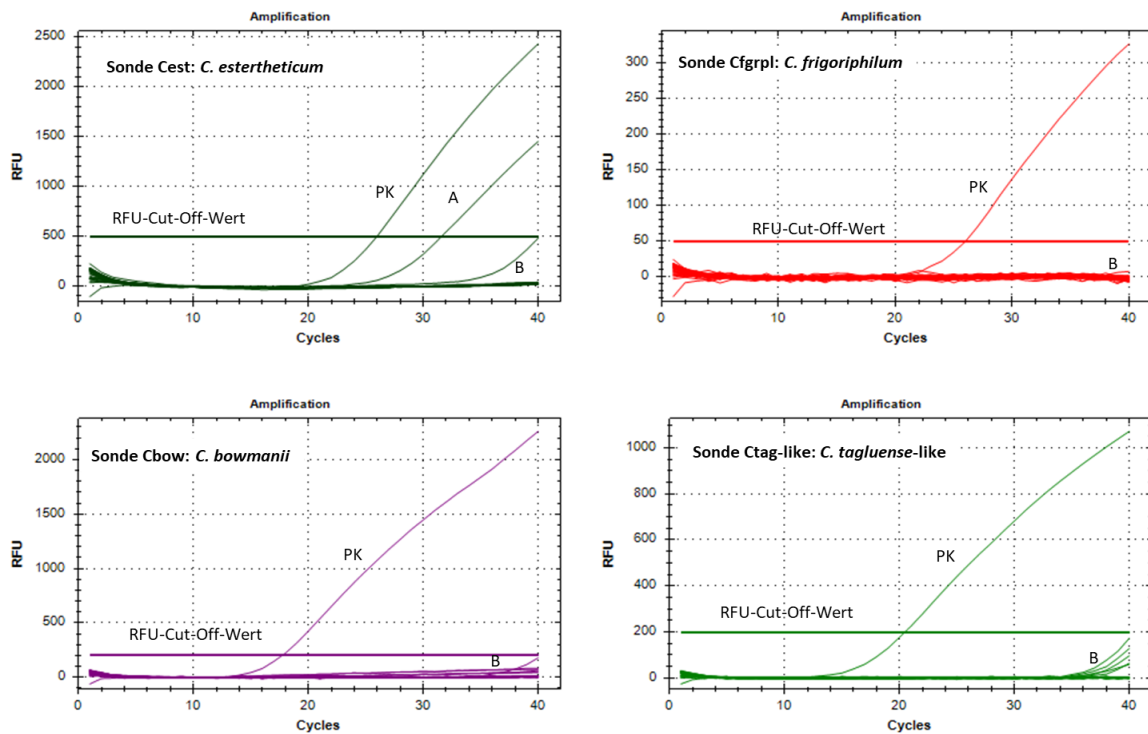


Abbildung 4: Beispiel-Ergebnis der qPCR von 40 Fellwischproben mit der Sonde für *C. estertheticum*, *C. frigoriphilum*, *C. bowmanii* und *C. tagluense*-like; PK= Positivkontrolle; A = positive Probe; B = negative Probe

Bei der Auswertung der qPCR für Clostridien wurde eine Unterteilung der positiven Ergebnisse vorgenommen. Die Unterteilung erfolgte in die Grade stark positiv (Ct-Wert < 30), mäßig positiv (Ct-Wert 30 bis 36) und schwach positiv (Ct-Wert > 36). Alle Proben, die keine Ct-Werte erzeugten (RFU unter dem Cut-Off Wert) wurden negativ bewertet.

Nach der Anreicherungsphase wurden alle 26 beprobten Betriebe mittels qPCR positiv auf *Clostridium* spp. getestet. Außerdem wurden 23 (88,5 %) Betriebe auf *C. estertheticum*, zehn (38,5 %) Betriebe auf *C. frigoriphilum*, 17 (65,4 %) Betriebe auf *C. bowmanii* und 21 (80,8 %) Betriebe auf *C. tagluense*-like, positiv getestet. Die Ergebnisse der Betriebe sind in Tabelle 7 ersichtlich.

Betrachtet man die einzelnen Proben waren bei den 260 untersuchten Kotproben 73,5 % (n = 191) stark positiv, 24,6 % (n = 64) mäßig positiv und 1,2 % (n = 3) schwach positiv für *Clostridium* spp. (Sonde Cl555). *C. estertheticum* (Sonde Cest) schlug bei 5,8 % (n = 15) der Kotproben stark positiv, bei 10,8 % (n = 28) mäßig positiv und bei 5,8 % (n = 15) schwach positiv aus. Für *C. frigoriphilum* (Sonde Cfgrpl) ergaben sich folgende Ergebnisse: 5,4 % (n = 14) stark positiv, 3,5 % (n = 9) mäßig positiv und 1,9 % (n = 5) schwach positiv. *C. bowmanii* (Sonde Cbow) lieferte 10 % (n = 26) stark positive, 17,7 % (n = 46) mäßig positive und 5 % (n = 13) schwach positive Ergebnisse. Weiters zeigte die Untersuchung auf *C. tagluense*-like (Sonde Ctag) 7,3 % (n = 19) stark positive, 20 % (n = 52) mäßig positive und 6,5 % (n = 17) schwach positive Ergebnisse. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 nochmals verdeutlicht.

Die 260 untersuchten Fellwischproben lieferten 1,2 % (n = 3) stark positive, 13,8 % (n = 36) mäßig positive und 71,9 % (n = 187) schwach positive Ergebnisse für *Clostridium* spp. Für *C. estertheticum* ergaben sich 0,4 % (n = 1) mäßig positive und 0,4 % (n = 1) schwach positive Proben. *C. frigoriphilum* lieferte 1,2 % (n = 3) mäßig positive und 1,2 % (n = 3) schwach positive Ergebnisse. Die Untersuchung auf *C. bowmanii* ergab 1,2 % (n = 3) schwach positive Ergebnisse, für *C. tagluense*-like fiel die Untersuchung gänzlich negativ aus. Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse.

Da die DNA-Extrakte von Fellwischproben sehr niedrige Ct-Werte für *Clostridium* spp. aufwiesen, wurden sie mit einer qPCR für universale Bakterien getestet, um zu prüfen, ob die DNA-Extraktion erfolgreich durchgeführt wurde. Insgesamt 97,0 % (n = 252) der

Fellwischproben zeigen Ct-Werte unter 30 PCR-Zyklen und 3,0 % (n = 7) hatten Ct-Werte zwischen 30 und 36 PCR-Zyklen. Somit ist bestätigt, dass die DNA-Extraktion der Fellwischproben gut funktioniert hat, da die DNA universaler Bakterien in einer hohen Menge (Ct-Wert < 30 PCR-Zyklen) nachgewiesen wurde, jedoch war nur wenig oder keine DNA von Clostridien enthalten.

Tab. 7: Ergebnisse der Clostridien-qPCR (qPCR1), ausgewertet nach Betrieben (n = 26)

	positiv	
	(n)	%
<i>Clostridium</i> spp.	26	100
<i>C. estertheticum</i>	23	88,5
<i>C. frigoriphilum</i>	10	38,5
<i>C. bowmanii</i>	17	65,4
<i>C. tagluense-like</i>	21	80,8

Tab. 8: Positive Ergebnisse der Clostridien-qPCR (qPCR 1) für Kotproben (n = 260)

Spezies	Stark		Mäßig		Schwach		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Clostridium</i> spp.	191	73,5	64	24,6	3	1,2	258	99,2
<i>C. estertheticum</i>	15	5,8	28	10,8	15	5,8	58	22,3
<i>C. frigoriphilum</i>	14	5,4	9	3,5	5	1,9	29	11,2
<i>C. bowmanii</i>	26	10,0	46	17,7	13	5,0	85	32,7
<i>C. tagluense-like</i>	19	7,3	52	20,0	17	6,5	88	33,8

Tab. 9: Positive Ergebnisse der Clostridien-qPCR (qPCR 1) für Fellwischproben (n = 260)

Spezies	Stark		Mäßig		Schwach		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Clostridium</i> spp.	3	1,2	36	13,8	187	71,9	226	86,9
<i>C. estertheticum</i>	0	0	1	0,4	1	0,4	2	0,8
<i>C. frigoriphilum</i>	0	0	3	1,2	3	1,2	6	2,3
<i>C. bowmanii</i>	0	0	0	0	3	1,2	3	1,2
<i>C. tagluense-like</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

4.2. Mikrobiologische Untersuchung und Spezies Identifizierung

PYGS-Anreicherungen von Kot- und Fellwischproben, die positive qPCR-Ergebnisse für *C. estertheticum* und *C. frigoriphilum* erzeugt hatten, wurden ausgewählt und kulturell untersucht, um die einzelnen Isolate für weitere Zwecke zu gewinnen. Insgesamt waren 90 der ursprünglich 520 PYGS-Anreicherungen positiv für mindestens einer der beiden Spezies. 84 PYGS-Anreicherungsproben wurden für die kulturelle Untersuchung weitergeführt. Hierbei handelte es sich bei 79 Proben um Kotproben und bei fünf Proben um Fellwischproben. Sechs der positiven PYGS-Anreicherungen wurden aufgrund zu schwach positiver qPCR-Signale keiner kulturellen Untersuchung unterzogen. Proben, die nur für *Clostridium* spp. oder für *C. bowmanii* und *C. tagluense*-like positiv waren, wurden ebenfalls nicht gezielt kulturell untersucht.

Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der kulturellen Untersuchung aller 84 PCR-positiven PYGS-Anreicherungen. Die positiven PYGS-Anreicherungen wurden wie in Tabelle 8 und Tabelle 9 in die Kategorien stark, mäßig und schwach positiv eingeteilt. Die übrigen Spalten zeigen die Anzahl der kultivierbaren PYGS-Anreicherungen und den prozentualen Anteil des entsprechenden positiven Grades.

Bei den unbehandelten PYGS-Anreicherungen wuchsen die Begleitmikrobiota ungehemmt, wodurch die einzelnen Kolonien mit Hämolyse-Aktivität nicht oder uneindeutig identifiziert werden konnten. Eine pooled Probe aus verschiedenen Kolonien zeigte, dass zwei Proben schwach positiv und eine Probe stark positiv für *C. estertheticum* waren. Diese drei Proben wurden auf drei Blutagarplatten subkultiviert und anaerob bei 10 °C für 10–14 Tage bebrütet. Nach der Inkubation wurden von jeder Blutplatte sechs verschiedene Kolonien entnommen und auf Blutagar subkultiviert, um Einzelkolonien von *C. estertheticum* zu gewinnen. Nach einer Bebrütung bei 10 °C für 10–14 Tage wurde DNA der Subkulturen mittels Koch-Methode extrahiert. Laut der qPCR befand sich in einer der drei Proben *Clostridium* spp., jedoch war es nicht möglich aus den Proben *C. estertheticum* zu isolieren. Die Begleitmikrobiota wuchsen im Vergleich zu *C. estertheticum* sehr schnell, weshalb die Blutplatten bereits von Kolonien der Begleitmikrobiota bedeckt waren, bevor Kolonien von *C. estertheticum* in Erscheinung treten konnten. Es wurde dennoch angenommen, dass aus drei von 84 Proben aus unbehandelter

PYGS-Anreicherung mit der kulturellen Methode die Spezies *C. estertheticum* isoliert werden konnte (siehe Tabelle 10).

Bei den erhitzten PYGS-Anreicherungen wurden durch die Erhitzung auf 80 °C die Begleitmikrobiota überwiegend abgetötet. Da Sporen von Clostridien eine Hitzebehandlung überleben und ihre Kolonien Hämolyse-Aktivität zeigen, war eine Identifizierung und Entnahme der Einzelkolonien vereinfacht. Die positiven pooled Kolonienproben wurden auf Blutagarplatten subkultiviert, um Einzelkolonien zu gewinnen. Es wurden von jeder Platte bis zu sechs Einzelkolonien entnommen und bei 10 °C für ca. 14 Tage bebrütet und anschließend eine DNA-Extraktion und qPCR durchgeführt. Aus den stark positiven PYGS-Anreicherungen konnten 93,3 % bzw. 21,4 % Einzelkolonien von *C. estertheticum* bzw. *C. frigoriphilum* gewonnen werden. Bei den mäßig und schwach positiven Proben war eine Isolierung beider Spezies nur bei wenigen Proben möglich. Folglich konnten *C. estertheticum* und *C. frigoriphilum* in 29,8 % (n = 25/84) der kulturell untersuchten Proben aus erhitzter PYGS-Anreicherung isoliert werden (siehe Tabelle 10).

Tab. 10: Anzahl und Prozent der qPCR positiven PYGS-Anreicherungsproben und der kultivierbaren Proben

	n qPCR	n kultivierbare PYGS			
	positive -	PYGS (unbehandelt)		PYGS (80 °C, 5 min)	
	PYGS	Pooled	Einzel	Pooled	Einzel
Stark positiv					
<i>C. estertheticum</i>	15	1 (6,7 %)	-	15 (100 %)	14 (93,3 %)
<i>C. frigoriphilum</i>	14	-	-	4 (28,6 %)	3 (21,4 %)
Mäßig positiv					
<i>C. estertheticum</i>	29	2 (6,9 %)	-	5 (17,2 %)	3 (10,3 %)
<i>C. frigoriphilum</i>	12	-	-	2 (16,7 %)	3 (25,0 %)
Schwach positiv					
<i>C. estertheticum</i>	15	-	-	4 (26,7 %)	4 (26,7 %)
<i>C. frigoriphilum</i>	5	-	-	1 (20,0 %)	-
Gesamt					
<i>C. estertheticum</i>	59	3 (5,1 %)		24 (40,7 %)	21 (35,6 %)
<i>C. frigoriphilum</i>	31			7 (22,6 %)	6 (19,4 %)
Beide Spezies	84 *	3 (3,6 %)	-	31 (36,9 %)	25 (29,8 %)**

* Anzahl n = 84, da n = 6 Proben sowohl für *C. estertheticum* als auch *C. frigoriphilum* positiv sind; ** Anzahl n = 25, da n = 2 für beide Spezies positiv sind

5. DISKUSSION

Als Grundlage dieser Studie diente die Annahme, dass Kot und verschmutzte Rinderhäute eine der Hauptkontaminationsquellen für Fleisch mit *C. estertheticum* und der verwandten Spezies *C. frigoriphilum* darstellen. Die beiden Arten verursachen den Verderb von vakuumverpacktem Rindfleisch, der sich durch eine hohe Gasproduktion (H_2 und CO_2) und damit einhergehenden aufgeblähten Verpackungen, Buttersäurebildung und einen käsigen Geruch auszeichnet (4, 27). Da es bisher zur Thematik „Kontaminationsquellen von *C. estertheticum*“ wenig Studien gibt, bzw. diese meist das Fleisch untersuchten und nicht die möglichen Quellen wie Kot oder Haut der Tiere, wurde für diese Arbeit der Fokus auf diese Probenarten verlagert.

Die Anzucht kältetoleranter Clostridien gestaltet sich aufgrund ihres langsamen Wachstums bei niedrigen Temperaturen und fehlenden selektiven Nährmedien schwierig und ist oftmals nicht erfolgreich (37). Daher wird in vielen Studien auf einen molekularbiologischen Nachweis mittels PCR zurückgegriffen. Diese Studie stützt sich ebenfalls auf die vorherige Untersuchung mit qPCR und anschließender Kultivierung positiver Proben. Die erste PCR, um *C. estertheticum* zu detektieren, wurde von Helps et al. (1999) entwickelt (38). Broda et al. (2003) entwickelten eine PCR-Methode, um *C. estertheticum* und *C. gasigenes* zu identifizieren (39). Brightwell und Clemens (2012) etablierten eine PCR für *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like, wie *C. bowmanii* und *C. lacyfryxellense* aus verschiedenen Probenarten, wie z.B. Fleisch, Tierhaut, Umwelttupfer und Kot (34). In dieser Studie wurde eine PCR-Methode verwendet, die von Dorn-In et al. (2018) entwickelt wurde (29).

Um den Erfolg der PCR sicherzustellen, wurden in dieser Studie vorab verschiedene Methoden der DNA-Extraktion getestet. Hierfür wurden Reinkulturen von *C. estertheticum*, *C. gasigenes* und *C. algidicarnis* mit kommerziellen Extraktionskits der Hersteller Roche und Qiagen untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Für die Reinkulturen lieferten beide Extraktionskits gute Ergebnisse, jedoch zeigte das High Pure Template Preparation Kit von Roche bei allen Reinkulturen niedrigere Ct-Werte und wurde damit als effektiver eingestuft. Im nächsten Schritt wurden Kotproben nativ und mit Bakterien versetzt getestet. Hierbei kam es allerdings zu keiner Amplifikation bei dem Kit der Firma Roche. Das QiAmp Fast DNA Stool Mini Kit von Qiagen lieferte auch bei den kontaminierten Kotproben Ergebnisse. Der Erfolg des Kits von Qiagen ist laut dem Hersteller auf den verwendeten InhibitEx Buffer

zurückzuführen. Dieser wird verwendet um im Kot enthaltene PCR-Inhibitoren, wie komplexe Polysaccharide, Gallensalze, Lipide und Urate, die die DNA-Extraktion stören können, zu reduzieren (40). Um die hohen Kosten bei Verwendung des Kits von Qiagen zu senken, wurde der verwendete InhibitEx Buffer im nächsten Schritt mit dem Kit von Roche kombiniert und die Kotproben erneut getestet. Hierbei kam es bei nativen und kontaminierten Kotproben zu niedrigeren Ct-Werten und somit zu einer effektiveren DNA-Extraktion. Somit wurde das High Pure Template Preparation Kit in Kombination mit dem InhibitEx Buffer als geeignetste DNA-Extraktionsmethode für Kot- und Fellwischproben für diese Studie ausgewählt.

Zur Vermehrung oder Kultivierung der kältetoleranten Clostridien wurde zuerst eine Anreicherung der Proben durchgeführt, um die Anzahl der Sporen und damit auch die Chance auf erfolgreiche Nachweise und Isolationen zu erhöhen. Als Anreicherungsmedium wurde PYGS-Bouillon ausgewählt, da sie bereits in zahlreichen anderen Studien durch z.B. Brightwell und Clemens (2012), Broda et al. (1998) und Lund et al. (1990) erfolgreich verwendet wurde (34, 41, 32). Weiters ist eine reine Bakterienkultur essenziell für die Untersuchung von Virulenz, von Antibiotikaresistenzen und auch für die Genomsequenzierung (42). Feste Nährmedien haben meist einen Agargehalt von 1,5–2,0 %. Um ein ideales Wachstum der Zielmikroorganismen zu gewährleisten und zugleich das Wachstum der Begleitmikrobiota zu inhibieren, müssen Nährmedien an die Bedürfnisse der Mikroorganismen angepasst werden, z.B. durch den Einsatz von Antibiotika, Einstellen des pH-Werts oder Zusatz von bestimmten Komponenten oder Indikatoren, damit die Kolonien der Zielmikroorganismen einfacher zu identifizieren sind. Für sulfitreduzierende Clostridien wie *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. sporogenes*, *C. difficile* und *C. tetani* werden verschiedene Medien eingesetzt, wie z.B. Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC), Tryptose Sulphite Neomycin (TSN), Iron Sulphite (IS), Differential Clostridial Agar (DCA) und Sulfite Cycloserine Azide (SCA) Agar verwendet (43, 44, 45, 46). Viele andere Clostridien, inklusiv kältetolerante Clostridien, sind allerdings nicht in der Lage Sulfid zu reduzieren.

Daher gibt es für kältetolerante Clostridien noch kein selektives Nährmedium, was eine Anzucht erschwert. In dieser Studie wurde Columbia Blood Agar mit 5 % Schafblut zur Anzucht verwendet. CBA wurde bereits in vielen Studien zur Kultivierung kältetoleranter Clostridien verwendet (18, 34, 10), da er reich an Nährstoffen ist und sich prinzipiell als

Nährboden für schwer kultivierbare Bakterien eignet. Außerdem produzieren viele Stämme von *C. estertheticum* und *C. frigoriphilum* das Enzym Hämolyisin und bilden Hämolyse auf CBA. Dadurch sind entsprechende Kolonien auf Blutagar relativ leicht zu erkennen. Die auf CBA verdächtig erscheinenden Kolonien müssen mittels qPCR untersucht werden, um zu bestätigen, dass es sich um kältetolerante Clostridien bzw. *C. estertheticum* oder *C. frigoriphilum* handelt. Um kältetolerante Clostridien zu isolieren, benötigt man mindestens acht Wochen bzw. länger, falls der erste Kultivierungsversuch nicht erfolgreich war. Da CBA ein nicht-selektives Medium ist, überwuchern die begleitenden Mikrobiota oft die kältetoleranten Clostridien, was die Ergebnisse der unbehandelten PYGS-Anreicherungen in dieser Studie gezeigt haben. Um die Zahl der nicht sporenbildenden begleitenden Mikrobiota zu reduzieren oder sie abzutöten, wurde die Anreicherungsprobe mit Hitze (80 °C für 5 min) behandelt, bevor sie auf CBA übertragen wurden (47, 33, 44, 10).

Es wurden 90 von 520 PYGS-Anreicherungen von Kot und Fellwischproben PCR positiv auf *C. estertheticum* und/oder *C. frigoriphilum* getestet. Die Proben wurden aufgrund der in der PCR erzielten Ct-Werte in die Kategorien „stark positiv“, „mäßig positiv“ und „schwach positiv“ unterteilt. Da sechs dieser Proben nach vier Wochen Anreicherung noch sehr hohe Ct-Werte lieferten, wurde davon ausgegangen, dass sich in diesen Proben keine vermehrungsfähigen Clostridien befinden und die Kultur keine positiven Ergebnisse liefern würde. Um Zeit einzusparen, wurde eine Reduktion des Probenumfangs um diese sechs Proben durchgeführt. Folglich wurden 84 Proben der weiteren Kultivierung zugeführt. Gesamt konnten bei 29,8 % der kultivierten Proben *C. estertheticum*/*C. frigoriphilum* isoliert werden. Dabei unterschieden sich die Ergebnisse der festgelegten Kategorien erheblich. Bei 58,6 % der stark positiven Proben konnte auch eine Reinkultur erzielt werden. Bei den mäßig und schwach positiven Proben gelang dies nur bei 14,6 % bzw. 20,0 % der kultivierten Proben. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf die Vermehrungsfähigkeit und die Anzahl an Clostridiensporen in den Proben zurückzuführen. Niedrige Ct-Werte, die von den stark positiven Proben erzielt wurden, lassen auf eine höhere Anzahl an vegetativen Zellen und Sporen von Clostridien schließen und machen damit eine erfolgreiche Kultivierung wahrscheinlicher. Dennoch war die Isolierungsrate der Reinkultur niedrig. Das liegt möglicherweise daran, dass *C. estertheticum*/*C. frigoriphilum* in der Anreicherung zwar gut wachsen und vegetative Zellen gebildet werden, aber nur wenige Sporen vorhanden sind. Ohne

Sporenbildung ist es den Clostridien nicht möglich die Hitzebehandlung bei 80 °C für 5 min zu überleben. Die mäßig bzw. schwach positiven PCR-Ergebnisse wurden wahrscheinlich durch die enthaltene DNA toter bzw. vermehrungsunfähiger Clostridien hervorgerufen und folglich war ein Wachstum in der Anreicherung nicht möglich.

Zur Prävalenz von *C. estertheticum* und *C. frigoriphilum* in Kot- und Hautproben von Rindern, die mittels qPCR-Methode bestimmt wurden, gibt es, wie oben erwähnt, nur wenige Studien. Eine relevante Studie ist von Moschonas et al. (2009) in Irland verfasst worden. Die verfassenden Personen beschäftigen sich mit Tierhäuten und Kot als Quelle für *C. estertheticum*. In der Studie wurden außerdem Umweltfaktoren wie Transport und Boden als weitere Kontaminationsmöglichkeiten und die Enthäutung als der heikelste Schritt der Schlachtung identifiziert (10). Die Ergebnisse der Studie von Moschonas et al. (2009) mit 17,9 % positiven Kotproben (10) deckt sich in etwa mit den Ergebnissen dieser Studie, wo 22,3 % und 11,2 % der untersuchten Proben PCR positive Ergebnisse für *C. estertheticum* und *C. frigoriphilum* lieferten. Die Ergebnisse in Bezug auf die untersuchten Tierhäute unterscheiden sich jedoch erheblich. Bei Moschonas et al. (2009) lieferten 13,3 % der Tierhäute positive Ergebnisse (10). Wohingegen in dieser Studie nur 3,2 % der untersuchten Fellwischproben zu positiven Ergebnissen für die beiden Spezies führten. Dieser deutliche Unterschied könnte einerseits auf die Unterschiede in der Art der Probennahme zurückzuführen sein. Da die Studie von Moschonas et al. (2009) an Schlachtkörpern von Rindern durchgeführt wurde, konnten Hautstücke der Tiere entfernt und für die Untersuchung verwendet werden (10). Im Gegensatz dazu wurde diese Studie nicht-invasiv an lebenden Tieren durchgeführt und die Proben nur durch Abwischen des Fells gewonnen. Außerdem könnte auch der Verschmutzungsgrad der Tiere eine Rolle beim Zustandekommen der Ergebnisse spielen. Die Sauberkeit bzw. der Grad an Verschmutzung der Tiere wurde in dieser Studie nicht explizit untersucht, jedoch zeigen andere Studien, z.B. Serraino et al. (2012) und Blagojevic et al. (2012) einen deutlichen Zusammenhang zwischen visuellen Verschmutzungen der Tiere und Keimbelastung der Tierhäute für andere Keime, z.B. *Enterobacteriaceae* (48, 49). Es ist daher nicht auszuschließen, dass der Verschmutzungsgrad der Haut der untersuchten Tiere gering war, so dass nur wenige Hautproben positive Ergebnisse für *C. estertheticum* erzeugten.

Insgesamt wurden 88,5 % (n = 23/26) der Rinderbetriebe positiv auf *C. estertheticum* und *C. frigoriphilum* getestet, wobei 22,3 % (n = 58/260) und 11,2 % (n = 29/260) der Kotproben positiv auf die jeweiligen Arten getestet wurden. Nur wenige Proben der Häute waren positiv. Die Prävalenz von *C. estertheticum* in den Kotproben dieser Studie wird als mäßig eingestuft. Dennoch bestätigt die Studie, dass Fäkalien und Häute, wenn sie mit Kot verschmiert sind, eine Kontaminationsquelle für *C. estertheticum* und andere kältetolerante Clostridien für Fleisch von geschlachteten Rindern darstellen. Einerseits kann davon ausgegangen werden, dass das Enthäuten und Ausweiden der Tiere besonders kritische Schritte des Schlachtprozesses sind. Andererseits könnten weitere Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen dem Verschmutzungsgrad der Tiere und dem Auftreten von Fleischkontaminationen mit kältetoleranten Clostridien Aufschluss über die Bedeutung der Reinigung der Tiere vor der Schlachtung geben.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Statistik Austria. Pro-Kopf-Verbrauch von Fleisch 2023 weiter rückläufig. In: Pressemitteilung 13 411-177/24, 2024.
- (2) Statista GmbH. Selbstversorgungsgrad bei Rind- und Kalbfleisch in Österreich in den Jahren 2007 bis 2023. 2024.
<https://de.statista.com/statistik/daten/studie/287325/umfrage/selbstversorgungsgrad-bei-rindfleisch-in-oesterreich/> (Zugriff 20.11.2024)
- (3) WWF Österreich. Fleischkonsum - Unser großer Hunger. 2024.
<https://www.wwf.at/nachhaltig-leben/fleisch/> (Zugriff 06.09.2024)
- (4) Dainty R H, Edwards R A, Hibbard C M. Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1989, 49(4), 473–486. doi:10.1002/jsfa.2740490410
- (5) BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). *Clostridium estertheticum* in vakuumverpacktem Rindfleisch: Ein gesundheitliches Risiko durch den Verzehr ist unwahrscheinlich. In: Stellungnahme Nr. 030/2010, 2010, S. 1-5
- (6) Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde der Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit, Fassung vom 01.07.2024.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX%3A32002R0178&qid=1732106281790>
- (7) Bundesgesetz über Sicherheitsanforderungen und weitere Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchsgegenstände und kosmetische Mittel zum Schutz der Verbraucherinnen und Verbraucher (Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz – LMSVG): BGBl. I Nr. 13/2006, Fassung vom 30.10.2024, verfügbar unter:
<https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=20004546>
- (8) Broda D M, Boerema J A, Brightwell G. Sources of psychrophilic and psychrotolerant clostridia causing spoilage of vacuum-packed chilled meats, as determined by PCR amplification procedure. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(1), 178–186. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04193.x
- (9) Adam K H, Flint S H, Brightwell G. Psychrophilic and psychrotrophic clostridia: sporulation and germination processes and their role in the spoilage of chilled, vacuum-packaged beef, lamb and venison. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 45(8), 1539–1544. doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02320.x

- (10) Moschonas G, Bolton D J, Sheridan J J, McDowell D A. Isolation and sources of “blown pack” spoilage clostridia in beef abattoirs. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(2), 616–624. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04229.x
- (11) Brasca M, Morandi S, Silveti T. *Clostridium* spp. Reference Module in Food Science. Elsevier, 2020. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.22989-2
- (12) Neumeister B, Geiss H K, Braun R W, Kimmig P, et al. Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie – Mykologie – Virologie – Parasitologie. 2., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2009
- (13) Blaschek H P. *Clostridium* / Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 1. Elsevier, 2014, 444-448. doi: 10.1016/b978-0-12-384730-0.00067-7
- (14) Mehdizadeh Gohari I, Navarro M A, Li J, Shrestha A, Uzal F, McClane B A. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence*, 2021 12(1), 723–753. doi:10.1080/21505594.2021.1886777
- (15) Lonati D, Schicchi A, Crevani M, Buscaglia E, Scaravaggi G, Maida F, Cirronis M, Petrolini V M, Locatelli C A. Foodborne Botulism: Clinical Diagnosis and Medical Treatment. *Toxins*, 2020, 12(8), 509. doi:10.3390/toxins12080509
- (16) Robert Koch Institut. RKI-Ratgeber: Botulismus. 2022.
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Botulismus.html
(Zugriff 15.09.2024).
- (17) Anniballi F, Auricchio B, Fiore A, Lonati D, Locatelli C A, Lista F, Fillo F, Mandarino G, De Medici D. Botulism in Italy, 1986 to 2015. *Eurosurveillance*, 2017, 22(24). doi:10.2807/1560-7917.es.2017.22.24.30550
- (18) Broda D M, De Lacy K M, Cook R L, Bell R G. Prevalence of cold-tolerant clostridia associated with vacuum-packed beef and lamb stored at abusive and chill temperatures. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1997, 40(1), 93-98. doi:10.1080/00288233.1997.9513236
- (19) Wambui J, Stephan R. Relevant aspects of *Clostridium estertheticum* as a specific spoilage organism of vacuum-packed meat. *Microorganisms*, 2019, 7(5), 142. doi: 10.3390/microorganisms7050142
- (20) Dorn-In S, Mang S, Schwaiger K. Unknown cold-tolerant *Clostridium* spp.: Characteristics and potential to cause meat spoilage. *Food Microbiology*, 2022, 102:103916. doi: 10.1016/j.fm.2021.103916

- (21) Spring S, Merkhoffer B, Weiss N, Kroppenstedt R M, Hippe H, Stackebrandt E. Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *Clostridium lacusfryxellense* sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov. and *Clostridium psychrophilum* sp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. laramiense subsp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2003, 53(4), 1019–1029. doi:10.1099/ijs.0.02554-0
- (22) Suetin S V, Shcherbakova V A, Chuvilskaya N A, Rivkina E M, Suzina N E, Lysenko A M, Gilichinsky D A. *Clostridium tagluense* sp. nov., a psychrotolerant, anaerobic, spore-forming bacterium from permafrost. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2009, 59(6), 1421–1426. doi:10.1099/ijs.0.002295-0
- (23) Lawson P, Dainty R H, Kristiansen N, Berg J, Collins M D. Characterization of a psychrotrophic *Clostridium* causing spoilage in vacuum-packed cooked pork: description of *Clostridium algidicarnis* sp. nov. Letters in Applied Microbiology, 1994, 19(3), 153–157. doi:10.1111/j.1472-765x.1994.tb00930.x
- (24) Broda D M, Saul D J, Lawson P A, Bell R G, Musgrave D R. *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meat. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50, 107–118.
- (25) Mang S, Schwaiger K, Lindner R, Gareis M, Dorn-In S. High incidence of cold-tolerant *Clostridium frigoriphilum* and *C. algidicarnis* in vacuum-packed beef on retail sale in Germany. International Journal of Food Microbiology. 2021. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109053
- (26) Collins M, Rodrigues U M, Dainty R H, Edwards R A, Roberts T A. Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: Description of *Clostridium estertheticum* sp. nov. FEMS Microbiology Letters, 1992, 96(2-3), 235–239. doi:10.1016/0378-1097(92)90410-p
- (27) Samelis J. Managing microbial spoilage in the meat industry. Food Spoilage Microorganisms, 2006, 213–286. doi:10.1533/9781845691417.2.213
- (28) Pecheritsyna S, Shcherbakova V, Rivkina E. *Clostridium frigoriphilum* sp. nov., a strictly psychrophilic bacterium from cryopegs of Kolyma Lowland (East Siberia, Russia). 2007. Verfügbar unter: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-17811>
- (29) Dorn-In S, Schwaiger K, Springer C, Barta L, Ulrich S, Gareis M. Development of a multiplex qPCR for the species identification of *Clostridium estertheticum*, *C. frigoriphilum*, *C. bowmanii* and *C. tagluense*-like from blown pack spoilage (BPS) meats and from wild boars. International Journal of Food Microbiology, 2018, 286, 162–169. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.020

- (30) Wambui J, Cernela N, Stevens M J A, Stephan R. Whole Genome Sequence-Based Identification of *Clostridium estertheticum* Complex Strains Supports the Need for Taxonomic Reclassification Within the Species *Clostridium estertheticum*. *Frontiers in Microbiology* Vol. 12, 2021, S. 1-12. doi: 10.3389/fmicb.2021.727022
- (31) Doulgeraki A I, Ercolini D, Villani F, Nychas G-J E. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 157(2), 130–141. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020
- (32) Lund B M, Graham A F, George S M, Brown D. The combined effect of incubation temperature, pH and sorbic acid on the probability of growth of non-proteolytic, type B *Clostridium botulinum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 1990, 69(4), 481–492. doi:10.1111/j.1365-2672.1990.tb01539.x
- (33) Dorn-In S, Mang S, Schwaiger K. A simple method for the isolation of cold-tolerant *Clostridium* spp. from meat samples. *International Journal Food Microbiology*. 2022, 378:109836. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109836.
- (34) Brightwell G, Clemens R. Development and validation of a real-time PCR assay specific for *Clostridium estertheticum* and *C. estertheticum*-like psychrotolerant bacteria. *Meat Science*, 2012, 92(4), 697–703. doi:10.1016/j.meatsci.2012.06.025
- (35) Dorn-In S, Bassitta R, Schwaiger K, Bauer J, Hölzel C S. Specific amplification of bacterial DNA by optimized so-called universal bacterial primers in samples rich of plant DNA. *Journal of Microbiological Methods*. 2015, 113, 50-56. doi: 10.1016/j.mimet.2015.04.001
- (36) Dorn-In S, Führer L, Gareis M, Schwaiger K. Cold-tolerant microorganisms causing spoilage of vacuum-packed beef under time-temperature abuse determined by culture and qPCR. *Food Microbiol*. 2023,109:104147. doi: 10.1016/j.fm.2022.104147.
- (37) Mang S I. Incidence and Differentiation of Cold-tolerant *Clostridium* Species in Vacuum-Packed Beef Produced and Retailed in Germany. [Dissertation] München: Ludwig-Maximilians-Universität München, 2021
- (38) Helps C R, Harbour D A, Corry J E. PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estertheticum* causing spoilage in vacuum-packed chill-stored beef. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 52(1-2), 57–65. doi:10.1016/s0168-1605(99)00116-6
- (39) Broda D M, Boerema J A, Bell R G. PCR detection of psychrophilic *Clostridium* spp. causing “blown pack” spoilage of vacuum-packed chilled meats. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 94(3), 515–522. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01859.x
- (40) Qiagen. QiAmp Fast DNA Stool Mini Kit.

<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-fast-dna-stool-mini-kit> (Zugriff 24.10.2024)

- (41) Broda D M, De Lacy K M, Bell R G. Influence of culture media on the recovery of psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with the spoilage of vacuum-packed chilled meats. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 39(1-2), 69–78. doi:10.1016/s0168-1605(97)00120-7
- (42) Lagier J-C, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(1), 208–236. doi:10.1128/cmr.00110-14
- (43) Eisgruber H, Reuter G. A selective medium for the detection and enumeration of mesophilic sulfite-reducing clostridia in food monitoring programs. *Food Research International*, 1995, 28(3), 219–226.
- (44) ISO 15213-1:2023. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Clostridium* spp. — Part 1: Enumeration of sulfite-reducing *Clostridium* spp. by colony-count technique. 2023
<https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:15213:-1:ed-1:v1:en> (Zugriff: 22.11.2024)
- (45) de Jong A E I. *Clostridium perfringens*: spores & cells, media & modeling. [internal PhD, WU, Wageningen University]. 2003 <https://edepot.wur.nl/121470>
- (46) Mlejnková V, Fröhdeová M, Kalhotka L, Doležal P. Microbiological quality of experimental silages in combination with the addition of topsoil soil layer and ensiling additives. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2014, 62, 1041-1048.
- (47) Broda D M, De Lacy K M, Bell R G. Efficacy of heat and ethanol spore treatments for the isolation of psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with the spoilage of chilled vacuum-packed meats. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, 39, 61–66.
- (48) Serraino A, Bardasi L, Riu R, Pizzamiglio V, Liuzzo G, Galletti G, Giacometti F, Merialdi G. Visual evaluation of cattle cleanliness and correlation to carcass microbial contamination during slaughtering. *Meat Science*, 2012, 90(2), 502–506. doi:10.1016/j.meatsci.2011.08.001
- (49) Blagojevic B, Antic D, Ducic M, Buncic S. Visual cleanliness scores of cattle at slaughter and microbial loads on the hides and the carcasses. *Veterinary Record*, 2012, 170(22), 563–563. doi:10.1136/vr.100477

7. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildungen:

- Abb. 1: Standorte der Betriebe nach Bezirken geteilt
- Abb. 2: Schema des Studienaufbaus
- Abb. 3: Beispiel-Ergebnis der qPCR von 40 Fellwischproben mit der Sonde C1555 für *Clostridium* spp.
- Abb. 4: Beispiel-Ergebnis der qPCR von 40 Fellwischproben mit der Sonde für *C. estertheticum*, *C. frigorophilum*, *C. bowmanii* und *C. tagluense*-like

Tabellen:

- Tab. 1: Komponenten PYGS-Bouillon
- Tab. 2: Komponenten Salzlösung A
- Tab. 3: Komponenten Salzlösung B
- Tab. 4: qPCR-Verfahren für Clostridien und universale Bakterien und Sequenzen der Primer und Sonden
- Tab. 5: Relative Fluorescence Unit (RFU)-Cut-Off der jeweiligen Sonden
- Tab. 6: Vergleich der Effizienz der DNA-Extraktionsmethoden
- Tab. 7: Ergebnisse der Clostridien-qPCR (qPCR1), ausgewertet nach Betrieben (n = 26)
- Tab. 8: Positive Ergebnisse der Clostridien-qPCR (qPCR1) für Kotproben (n = 260)
- Tab. 9: Positive Ergebnisse der Clostridien-qPCR (qPCR1) für Fellwischproben (n = 260)
- Tab. 10: Anzahl und Prozent der qPCR positiven PYGS-Anreicherungsproben und der kultivierbaren Proben

8. ANHANG

Informationsblatt und Einwilligung Tierbesitzerinnen und Tierbesitzer:

INFORMATION UND EINWILLIGUNG DER TIERHALTERIN / DES TIERHALTERS WISSENSCHAFTLICHE STUDIE

Sie werden eingeladen, mit Ihrem Tier an einer wissenschaftlichen Studie teilzunehmen, die an der Veterinärmedizinischen Universität Wien (Vetmeduni) durchgeführt wird. Dabei sollen die unter Punkt 4 angeführten Maßnahmen vorgenommen werden. Sie werden ausdrücklich darauf hingewiesen, dass diese Maßnahmen aus veterinärmedizinischer Sicht nicht erforderlich sind, sondern der Verbesserung der medizinischen Behandlungsmöglichkeiten und der Erweiterung der wissenschaftlichen Erkenntnisse dienen. Die Durchführung der Studie wurde von der Ethik- und Tierschutzkommission der Vetmeduni positiv beurteilt.

Die Teilnahme an der Studie erfolgt freiwillig und unentgeltlich. Sie kann jederzeit beendet werden.

1. Titel der Studie

Kältetolerante Clostridien in Tierbeständen: Prävalenz, Pathogenität und Rolle als Verderbserreger

2. Fragestellung(en) und Zielsetzung(en) der Studie

Kältetolerante Clostridien sind als Verderbserreger von vakuumverpacktem Rindfleisch bekannt und verursachen die sogenannte „Blown Pack Spoilage“. Die Herstellung von Fleisch verbraucht enorme Ressourcen. Daher bedeutet jeder Fleischverlust einen hohen wirtschaftlichen Verlust mit negativen Auswirkungen auf die Umwelt. Als Kontaminationsquellen für Clostridien gelten Kot und Felle von geschlachteten Tieren. In

Österreich gibt es bisher keine Daten zum Vorkommen von kältetoleranten Clostridien in Tierbeständen. Um die Prävalenz dieser Bakterien festzustellen, werden Kot- und Fellproben (Schwammproben) von Rindern verschiedener Rinderbeständen in Österreich beprobt. Die Proben werden anschließend kulturell auf das Vorkommen kältetoleranter Clostridien untersucht.

3. Erwarteter Nutzen der Studie

Im Fall des Nachweises einer hohen Prävalenz kältetoleranter Clostridien in österreichischen Tierbeständen müssen wissenschaftsbasierte wirksame Strategien und Maßnahmen eingeleitet werden, um die Verbreitung der hochresistenten und damit schwer zu eliminierenden Keime in den Schlachthof zu vermeiden.

4. Beschreibung der geplanten Maßnahmen

Kotproben ($n = 10$) werden direkt vom Tier (per Rektum) oder vom Boden (frisch) entnommen. Für die Schwammproben ($n = 10$) wird der Bereich Hüfte/Hintern des Tieres (ca. 1 m^2) mit einem Schwammtuch abgewischt.

5. Mögliche Nebenwirkungen und Risiken

Im Zusammenhang mit den unter Punkt 4. angeführten Maßnahmen werden selten Nebenwirkungen oder Komplikationen auftreten. Möglicherweise wird das Tier während der Beprobung leicht aufgeregt. Wenn die Beprobung vorbei ist, kommt das Tier zu normalem Verhalten zurück.

6. Verwertung von Daten

Daten und Proben des Patienten, die im Rahmen der Studie gewonnen werden, dürfen in anonymisierter Form in der Lehre und Forschung der Vetmeduni verwendet und insbesondere auch publiziert werden.

Erklärung der Einwilligung

Ich bestätige hiermit, dass mir der Aufbau der Studie erklärt wurde und dass ich Gelegenheit hatte, Fragen zur Durchführung der Studie zu stellen. Ich habe die obenstehenden Informationen zur Kenntnis genommen und stimme der Vornahme der unter Punkt 4. angeführten Maßnahmen sowie der Verwendung der daraus resultierenden Daten zu:

Tier (Name, Art, TierNr. lt. TIS, Chip-Nr., falls vorhanden):

.....

TierhalterIn (Vor- und Zuname, Adresse, Tel.Nr.):

.....

Ort und Datum:

Unterschrift der Tierhalterin / des Tierhalters:

.....

Studienverantwortliche/r:

Fragen / Kontakt: @vetmeduni.ac.at

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gebührt Dr. med. vet. Cassandra Eibl, Dipl.ECBHM und Univ.-Prof. Dr. med. vet. Johannes Kohl, Dipl.ECBHM für die durchgeführten Probennahmen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Andrea Pauker, Dr. Dmitri Sofka und Joachim Angerer, MSc. für die Unterstützung bei den Laborarbeiten, sowie die Herstellung der benötigten Materialien herzlichst bedanken.

Weiters bedanke ich mich bei Dr. med. vet. Samart Dorn-In, der diese Arbeit mit großem Engagement und konstruktiver Kritik betreut hat.

Auch bedanke ich mich bei Univ.-Prof. Dr. med. vet. Karin Schwaiger, die das Verfassen dieser Arbeit in der Abteilung für Hygiene und Technologie von Lebensmitteln ermöglicht hat.