

2. Material und Methodik:

2.1 Patientenproben

693 konsekutive Stuhlproben, die dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité, Campus Benjamin Franklin zum Nachweis von *C. difficile* Infektionen zugeführt wurden, wurden in der Zeit von März bis Mai 2003 auf das Vorkommen von *C. difficile* und *C. perfringens* sowie deren enteropathogenen Toxinen untersucht. Die Stuhlproben stammten aus sieben verschiedenen Berliner Krankenhäusern. Zum Nachweis der Clostridienspezies in der Stuhlprobe wurden Kulturen angelegt, zum Nachweis der entsprechenden enteropathogenen Toxine ELISAs durchgeführt. Zur Bestätigung von *C. perfringens* und dessen Enterotoxin wurde mittels PCR das Vorhandensein der Phospholipase C- und Enterotoxin A-Gene untersucht. Hierfür wurde einerseits DNA aus Reinkulturen von *C. perfringens*-positiven Stuhlproben und andererseits DNA direkt aus den *C. perfringens*-positiven Stuhlproben isoliert und verwendet. Es wurden ausschließlich Stuhlproben berücksichtigt, bei denen genügend Material für sämtliche Tests zur Verfügung stand und die bis zur Verarbeitung höchstens 24 Stunden bei +4°C gelagert worden waren. War mit einer Überschreitung dieser 24 Stunden zu rechnen, wurden die Stuhlproben bei –20°C eingefroren, unmittelbar vor der Testung aufgetaut und bei Raumtemperatur äquilibriert.

2.2 Patientendaten

Zusätzlich zur Untersuchung der Stuhlproben wurden Daten zu Alter, Geschlecht, Stuhlkonsistenz und Antibiotikatherapie erhoben. Die Daten konnten größtenteils den Anforderungsscheinen zum *C. difficile*-Nachweis entnommen werden. War dies nicht möglich, wurden die Daten durch Akteneinsicht ermittelt.

2.3 Geräte und Materialien

In sämtlichen Tests wurden verschiedene Pipetten und Spitzen der Marke Eppendorf® (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland) verwendet. Weitere Materialien sind direkt in der Beschreibung der jeweiligen Nachweismethode angegeben.

2.4 *Clostridium difficile*-Kultur

Für die für die Anzucht von *C. difficile* verwendeten Selektivnährböden wurden *Clostridium-difficile*-Agar-Basis (OXOID GmbH, Wesel, Deutschland, Art.-Nr. CM 601), *Clostridium-difficile*-Selektiv-Supplement (OXOID GmbH, Wesel, Deutschland, Art.-Nr. SR 96 bzw. alternativ Art.-Nr. SR 173) und 7 % defibriniertes Pferdeblut (OXOID GmbH, Wesel, Deutschland, Art.-Nr. FSR 1056) verwendet.

Die verwendeten Selektivnährböden setzten sich wie folgt zusammen:

<u><i>Clostridium-difficile</i>-Agar-Basis:</u>	g/l
Proteose-Pepton	40,0
Dinatriumhydrogenphosphat	5,0
Kaliumdihydrogenphosphat	1,0
Magnesiumsulfat	0,1
Natriumchlorid	2,0
Fructose	6,0
Agar	15,0

Der pH der *Clostridium-difficile*-Agar-Basis betrug pH 7,4 ± 0,2.

Clostridium-difficile-Selektiv-Supplement (500ml):

Art.-Nr. SR 96:

D-Cycloserin	125 mg
Dephoxitin	4 mg

Art.-Nr. SR 173:

Cysteinhydrochlorid	250 mg
Moxalactam	16 mg
Norfloxacin	6 mg

69 g *Clostridium-difficile*-Agar-Basis wurden in 930 ml Aqua dest. suspendiert und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Der Inhalt von zwei Röhrchen *Clostridium-difficile*-Selektiv-Supplement wurde anschließend aseptisch in je 2 ml sterilem Aqua dest. gelöst und der gelöste Inhalt der Röhrchen mit 7 % defibriniertes Pferdeblut (OXOID GmbH, Wesel, Deutschland, Art.-Nr. FSR 1056) aseptisch zu 930 ml steriler, abgekühlter (50°C) Nährboden-Basis gegeben. Nach Durchmischung wurden die Platten zügig unter sterilen Bedingungen in der Nährbodenzentrale des Institutes gegossen.

Für die kulturelle Anzucht wurden sämtliche Stuhlproben zunächst einer Alkoholschockbehandlung unterzogen. Dazu wurde eine gleiche Menge Stuhl und absoluter Alkohol in einem Spitzröhrchen vermischt und für 30 Minuten bei

Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden 100 µl auf *Clostridium-difficile*-Selektiv-Agar ausgespatelt und die Agarplatte für 48 Stunden anaerob bei 37°C bebrütet. Die Identifizierung von *C. difficile* erfolgte anhand der typischen Morphologie und des unverkennbaren Geruchs der *C. difficile* Kolonien.

2.5 *Clostridium perfringens*-Kultur

Für die für die Anzucht von *C. perfringens* verwendeten Columbia-Gentamicin-Agar-Nährböden wurden Columbia-Agar-Basis (OXOID GmbH, Wesel, Deutschland, Art.-Nr. CM 331), Campylobacter-Selektiv-Supplement (Skirrow) (OXOID GmbH, Wesel, Deutschland, Art.-Nr. SR 69) und 5% defibriniertes Schafblut (OXOID GmbH, Wesel, Deutschland, Art.-Nr. FSR 1055) verwendet.

Die Columbia-Agar-Basis setzte sich folgendermaßen zusammen:

	g/l
Spezialpepton	23,0
Stärke	1,0
Natriumchlorid	5,0
Agar	10,0

Der pH betrug $7,3 \pm 0,2$.

Die Zusammensetzung von 500 ml Campylobacter-Selektiv-Supplement (Skirrow) sah wie folgt aus:

Vancomycin	5 mg
Polymyxin B	120 IE
Trimethoprim	2,5 mg

Des Weiteren wurde für die Herstellung der Agarplatten Vitamin K Lösung benötigt. Hierzu wurden 10 g Vitamin K (Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland, Art.-Nr. V-3501) in 1 l vergällten Alkohol (10 mg/ml Konzentration) gelöst.

Das in den Nährböden verwendete Gentamicin wurde aus 2 ml Gentamicin 80 durch Verdünnung mit 8 ml Aqua dest. hergestellt und zu 1 ml in Eppendorf-Röhrchen abgefüllt und eingefroren.

Für die Herstellung der Columbia-Gentamicin-Agar-Platten wurden 39 g Columbia-Agar-Basis in 950 ml Aqua dest. suspendiert und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert.

Nach Abkühlung im Wasserbad auf 50 °C wurden 1 ml Vitamin K, 5% defibriniertes Schafblut und 1ml Gentamicin in der obenstehenden Verdünnung zugesetzt. Dann wurde vorsichtig gemischt und die Platten unter sterilen Bedingungen gegossen.

Zur kulturellen Anzucht wurden nach Alkoholschockbehandlung 100 µl einer jeden Stuhlsuspension auf Columbia-Gentamicin-Agar ausgespatelt, für 48 Stunden anaerob bei 37°C bebrütet und schließlich visuell ausgewertet. Beim Auswerten wurde insbesondere auf die für *C. perfringens* charakteristischen Doppelhämolysen auf Blutagar geachtet. Von *C. perfringens*-positiven Kulturen wurde jeweils eine Einzelkolonie mit einer Glasspitze entnommen und für eine Subkultur auf zwei neuen Columbia-Gentamicin-Agarplatten fraktioniert ausgestrichen und für 48 Stunden anaerob bei 37°C bebrütet.

Von den subkultivierten Reinkulturen wurden als Bestätigungstest zunächst Gram-Färbungen durchgeführt. Dafür wurde aus dem Randbereich einer *C. perfringens* Kolonie mit einer sterilen Glasspitze eine etwa stecknadelkopfgroße Menge Material entnommen und mit einem Tropfen physiologischer NaCl-Lösung auf einem Objektträger verrührt. Nach Lufttrocknung wurde das Präparat hitzefixiert. Die Gram-Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

- Färbung mit Victoriablaulösung für zwei Minuten
- Spülen mit Leitungswasser
- Färbung mit Lugol'scher Lösung für zwei Minuten
- Spülen mit Leitungswasser
- Entfärben mit Chinin-Alkohollösung für 15-30 Sekunden
- Spülen mit Leitungswasser
- Gegenfärbung mit Safranin für eine Minute
- Spülen mit Leitungswasser

Anschließend wurden die Präparate vorsichtig mit Papier getrocknet und mit dem 100er Ölimmersionsobjektiv unter dem Mikroskop (1000x Vergrößerung) beurteilt.

Als weiterer Bestätigungstest wurde eine Eigelbagar-Platte mit einer *C. perfringens* Kolonie beimpft und für 48 Stunden bei 37°C anaerob bebrütet. Zur Herstellung des Eigelbagar wurden folgende Bestandteile unter Erhitzen gelöst und für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert:

Proteose-Pepton	40,0 g
Glukose	2,0 g
Natriumchlorid	2,0 g
Mg(SO ₄)-7H ₂ O	0,1 g
Na ₂ HPO ₄	5,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
Agar	15,0 g
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

Der pH nach Abkühlung betrug 7,6.

Das Alpha-Toxin von *C. perfringens* ist eine Lecithinase (Phospholipase C), die Lecithin in Phosphorylcholin und Diglycerid aufspaltet. Die Lecithinasewirkung ist auf dem Eidotternährboden an der Bildung eines Präzipitats um die Kolonie herum zu erkennen.

Sämtliche verbliebenen Kolonien der *C. perfringens* Subkultur wurden mit einem Tupfer entnommen und in das CRYOBANK[®] Stammhaltungssystem für Mikroorganismen (MAST DIAGNOSTICA Laboratoriums – Präparate GmbH, Reinfeld, Deutschland) durch Einrühren in das enthaltene Spezialmedium überführt. Die sterilen Kryoröhrchen enthalten 25 chemisch behandelte Kügelchen in einem hypertonischen Spezialmedium, an deren Oberfläche sich die Mikroorganismen binden. Die Kryoröhrchen wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei –20°C gelagert.

2.6 *Clostridium difficile*-Toxinnachweis

Zum Nachweis des Enterotoxin A und des Zytotoxin B direkt in der Stuhlprobe wurde der Enzymimmunoassay *C. difficile* TOX A/B-II-TEST[®] (MICROTEST GmbH, Mainz, Deutschland) verwendet und gemäß der Herstellerangaben durchgeführt. Zu den mitgelieferten Reagenzien im Testkit gehörten:

- 12 Mikrotiter-Plattenstreifen:

beschichtet mit affinitätschromatographisch aufgereinigten polyklonalen Antikörpern (Ziege) gegen Toxin A und B, 12 x 8 Vertiefungen, - teilbar bis zur Einzelkavität –

- 1 Fläschchen mit 25 ml Verdünnungspuffer:
gepufferte Proteinlösung – als Negativ-Kontrolle einsetzbar
- 1 Fläschchen mit 7 ml Konjugat:
monoklonaler Antikörper (Maus) gegen Toxin A und polyklonaler Antikörper (Ziege) gegen Toxin B; in gepufferter Proteinlösung, Meerrettich-Peroxidase markiert
- 1 Fläschchen mit 3,5 ml Positiv-Kontrolle:
inaktiviertes Toxin in einer gepufferten Proteinlösung
- 1 Fläschchen mit 50 ml Waschpuffer-Konzentrat (20x):
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, Detergenz
- 1 Fläschchen mit 14 ml Substrat:
enthält Tetramethylbenzidin (TMB) und Peroxid
- 1 Fläschchen mit 7 ml Stopp-Reagenz:
enthält 0,6 N Schwefelsäure
- 1 Halterahmen
- 1 wiederverschließbarer Plastikbeutel
- 2 Klebefolien
- 100 Einwegpipetten:
graduiert bei 50 µl, 100 µl, 200 µl und 300 µl
- 50 Holzstäbchen

Vor Testbeginn wurden zunächst sämtliche Reagenzien sowie die Stuhlproben auf Raumtemperatur gebracht und der Waschpuffer durch Verdünnung des Waschpuffer-Konzentrats (50 ml) mit 950 ml Aqua dest. hergestellt.

Die Stuhlproben wurden auf dem Vortex-Schüttler gut gemischt, mit Hilfe eines Holzstäbchens eine etwa erbsengroße Menge Stuhl (ca. 3 mm Durchmesser) entnommen und in vorbereitete mit 200 µl gebrauchsfertigem Verdünnungspuffer gefüllte Spitzröhrchen überführt und suspendiert. Bei flüssigem Stuhl wurden mit der Einmalpipette etwa 50 µl Stuhl entnommen und mit dem Verdünnungspuffer vermischt. Die suspendierten Proben wurden direkt vor der Testdurchführung sorgfältig für 10 Sekunden auf dem Vortex-Schüttler gemischt.

Für die erste Inkubation wurde eine ausreichende Zahl an Kavitäten in den Halterahmen eingesteckt und jeweils ein Tropfen Konjugat (50 µl) vorgelegt. Bei jeder Testdurchführung wurde eine Negativ-Kontrolle (1x Verdünnungspuffer) und eine Positiv-Kontrolle mitgeführt. Ein Tropfen der Negativ-Kontrolle (50 µl), der Positiv-

Kontrolle (50 µl) oder zwei Tropfen der verdünnten Stuhlprobe (100 µl) wurden in die dafür vorgesehene Vertiefung gegeben. Dann wurden die Kavitäten mit der zugeschnittenen Klebefolie abgedeckt und bei 37°C für 50 Minuten inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Kavitäten ausgeleert und anschließend mit einer Spritzflasche der gebrauchsfertige Waschpuffer auf den Boden der Kavitäten gespritzt. Danach wurden die Kavitäten erneut geleert und auf einem saugfähigen Flies ausgeschlagen. Der Waschschrift wurde viermal wiederholt, wobei nach jedem Waschschrift ein neues trockenes Flies benutzt wurde. Nach dem Waschen wurde darauf geachtet, dass die Kavitäten vollständig frei von Waschpuffer waren.

Für den zweiten Inkubationsschritt wurden zwei Tropfen des Substrats (100 µl) in die Kavitäten gegeben, sorgfältig durch leichtes Klopfen an den Halterahmen vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von einem Tropfen Stopp-Reagenz (50 µl) und erneute sorgfältige Durchmischung. Die Auswertung erfolgte zwei Minuten später visuell auf einem weißen Untergrund.

2.7 *Clostridium perfringens*-Toxinnachweis

Zum Nachweis des CPE in der Stuhlprobe wurde der RIDASCREEN® *Clostridium perfringens* Enterotoxin Enzymimmunoassay® (R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Der Test wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Jede Packung enthielt folgende mitgelieferte Reagenzien:

- 12 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen (teilbar) im Halterahmen;
beschichtet mit polyklonalen Antikörpern gegen CPE;
in verschließbarem Alu-Beutel
- 1 Fläschchen RIDASCREEN® Toxin-Puffer (100 ml);
gepufferte Proteinlösung zur Probenverdünnung;
gebrauchsfertig
- 1 Fläschchen Waschpuffer (100 ml, 10fach konzentriert)
pH 7,2; enthält 0,1% Thiomersal
- 1 Fläschchen Positiv-Kontrolle (1,8 ml)
inaktiviertes CPE;
gebrauchsfertig
- 1 Fläschchen Enzym-Konjugat (10 ml);
Peroxidase-markierter monoklonaler Antikörper (Maus) gegen CPE,
in gepufferter Proteinlösung;

Gebrauchsfertig, rot gefärbt

- 1 Fläschchen Substrat/Chromogen (10 ml);

Peroxid/TMB;

Gebrauchsfertig

- 1 Fläschchen Stopp-Reagenz (6 ml);

1 N Schwefelsäure

Vor Testbeginn wurden sämtliche Reagenzien und Stuhlproben auf Raumtemperatur gebracht und gut gemischt. Daraufhin wurde der Waschpuffer hergestellt, indem das Waschpufferkonzentrat (100 ml) mit 900 ml destilliertem Wasser vermischt wurde. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle wurden zuvor durch Erwärmen im Wasserbad bei 37°C gelöst. Der fertige Waschpuffer war bei einer Lagerung von 2 – 8°C vier Wochen lang haltbar und wurde in dieser Zeit, längstens jedoch bis zum Verbrauch eines Testkits, verwendet.

Von den entsprechenden Proben wurde jeweils ein etwa erbsengroßes Stück Stuhl mit Hilfe eines Tupfers entnommen und in vorbereitete mit 1000 µl gebrauchsfertigem Toxin-Puffer gefüllte Spitzröhrchen gegeben. Im Tupfer aufgesaugte Flüssigkeit wurde an der Wand des Spitzröhrchens mehrmals ausgedrückt. Bei flüssigen Stühlen wurden ca. 0,1 ml Stuhl mit einer Einmalpipette entnommen und durch Auf- und Abpipettieren mit dem Toxin-Puffer im Spitzröhrchen vermischt. Anschließend wurden noch einmal sämtliche Proben auf einem Vortex-Schüttler gemischt. Für die erste Inkubation wurden 100 µl der Positiv-Kontrolle, des Toxin-Puffers als Negativ-Kontrolle oder des Überstandes der Stuhlsuspensionen mit einer Eppendorfpipette in die Vertiefungen gegeben. Anschließend wurden zwei Tropfen (100 µl) des Enzym-Konjugats zugegeben und nach Durchmischung durch leichtes Klopfen an den Halterahmen für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Kavitäten geleert und die Platte anschließend auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Danach wurde fünfmal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Nach jedem Waschgang wurde die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Für die zweite Inkubation wurden zwei Tropfen (100 µl) Substrat/Chromogen in sämtliche Vertiefungen getropft und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde durch Zugabe von einem Tropfen Stopp-Reagenz (50 µl) in sämtliche Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Extinktion bei 450 nm mit einer

Referenzwellenlänge von 620 nm in einem ELISA-Reader (Tecan Spectra, Tecan Deutschland GmbH, Craisheim, Deutschland) gemessen. Der Abgleich des Nullwertes wurde vorher gegen Raumluft, also ohne Mikrotiterplatte, durchgeführt.

2.8 *Clostridium perfringens* Phospholipase C- und Enterotoxin A-Gennachweis

2.8.1 DNA-Extraktion aus *Clostridium perfringens* Reinkulturen

Für die PCR wurden aus den, in den Röhrcchen des CRYOBANK Stammhaltungssystem für Mikroorganismen bei -20°C aufbewahrten Kolonien der Kultur-positiven Proben frische Kulturen auf Columbia-Gentamicin-Agar angelegt. Hierzu wurde nach Auftauen der Probe je ein Kügelchen aus dem Kryoröhrcchen entnommen und auf einer Columbia-Gentamicin-Agar-Platte ausgerollt. Danach wurde nach Entfernen des Kügelchens fraktioniert ausgestrichen und für 48 Stunden anaerob bei 37°C bebrütet.

Für die DNA-Extraktion wurde zunächst Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) hergestellt. Dafür wurden eine 10 mM Tris-Lösung und eine 1 mM EDTA Lösung benötigt. Die 10 mM Tris-Lösung wurde durch Verdünnung von 1 ml einer 1 M gebrauchsfertigen Tris-Lösung mit 99 ml Aqua dest. hergestellt. Für die 1 mM EDTA Lösung wurden 37,22 mg EDTA unter Wärmezufuhr mit einem Rührstab in 100 ml Aqua dest. gelöst. Mit Hilfe eines pH-Meter wurde der pH durch Zugabe von NaCl auf pH 8,0 eingestellt.

Von der Columbia-Gentamicin-Agar-Platte wurde eine etwa hirsekorngroße Menge (ca. 1 mm Durchmesser) *C. perfringens* Kolonien entnommen und mit 100 μl TE-Puffer vermischt. Das Gemisch wurde anschließend fünf Minuten bei 95°C im Thermoblock (GEN-PROBE, DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland) gekocht und danach bei 11000 Umdrehungen pro Minute (U/Min.) für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. 50 μl des Überstandes wurden dann in 0,5 ml Eppendorf-Röhrcchen überführt und das so erhaltene DNA-Extrakt bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

2.8.2 DNA-Extraktion aus Stuhlproben

Für die DNA-Extraktion aus Stuhlproben wurden ausschließlich Proben verwendet, welche in der vorhergehenden PCR aus den Reinkulturen Träger des Enterotoxin A-Gens waren. Für die Extraktion wurde das QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit 50 (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet und gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Im Testkit waren folgende Substanzen enthalten:

- 50 QIAamp[®] Säulen
- 200 Sammelröhrchen (2 ml)
- 50 InhibitEx[®] Tabletten
- 140 ml Puffer ASL
- 33 ml Puffer AL
- 19 ml Puffer AW1 (Konzentrat)
- 13 ml Puffer AW2 (Konzentrat)
- 12 ml Puffer AE
- 1,4 ml Proteinase K

Vor Testbeginn wurden Puffer AW1 und Puffer AW2 wie folgt mit Ethanol verdünnt:

AW1 Konzentrat = 19 ml + Ethanol = 25 ml

AW2 Konzentrat = 13 ml + Ethanol = 30 ml

Anschließend wurde jeweils ein erbsengroßes Stück Stuhl der Probe entnommen und in 1400 µl Puffer ASL im Eppendorf-Röhrchen aufgenommen. Bei flüssigem Stuhl wurde eine entsprechende Menge mit einer Einmalpipette entnommen. Die Suspension wurde nun für eine Minute oder bis zur vollständigen Lösung des Stuhls auf dem Vortex-Schüttler gemischt und anschließend für fünf Minuten bei 95°C im Thermoblock gekocht. Danach wurde erneut für 15 Sekunden auf dem Vortex-Schüttler gemischt und dann eine Minute bei 13200 U/Min. zentrifugiert (Centrifuge 5415, Eppendorf AG, Hamburg; Deutschland). 1200 µl des Überstandes wurden dann in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und das „Pellet“ verworfen. Danach wurde eine Tablette InhibitEX[®] zu jeder Probe hinzugefügt und sofort eine Minute oder bis zur vollständigen Auflösung der Tablette auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Nach einer Minute Inkubationszeit, in der möglicherweise im Stuhl enthaltene DNA-schädigende oder PCR-hemmende Substanzen an die InhibitEx[®] Matrix binden konnten, wurden die Proben bei 13200 U/Min. für drei Minuten zentrifugiert. Der komplette Überstand wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Eppendorf Röhrchen überführt, das „Pellet“ verworfen

und die Proben erneut bei 13200 U/Min. für drei Minuten zentrifugiert. 200 µl des Überstandes wurden anschließend zu 200 µl Puffer AL und 15 µl Proteinase K in ein neues Eppendorf-Röhrchen gegeben und für 15 Sekunden auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Danach wurde für 10 Minuten im Wasserbad (transsonic 460/H, Elma Trenew Electronic GmbH, Pforzheim, Deutschland) bei 70°C inkubiert. Um Tropfen vom Rand der Gefäße zu entfernen, wurden diese nach der Inkubationszeit kurz herunterzentrifugiert. Danach wurden 200 µl 96%iger Ethanol zugegeben, das Gemisch für 15 Sekunden auf dem Vortex-Schüttler gemischt und kurz herunterzentrifugiert. Die Suspension wurde anschließend mit einer Eppendorf-Pipette entnommen und auf eine QIAamp® Säule gegeben, ohne deren Rand zu benetzen. Die Säulen wurden im Testkit, bereits auf ein 2 ml Sammelröhrchen gesteckt, geliefert. Die Säule wurde anschließend bei 13200 U/Min. für eine Minute zentrifugiert und danach dem Sammelröhrchen entnommen. Die Säule wurde auf ein neues Sammelröhrchen gesteckt und das alte, mit dem Zentrifugat, verworfen. 500 µl Puffer AW1 wurden auf die Säule gegeben, ohne deren Rand zu benetzen, und wieder bei 13200 U/Min. für eine Minute zentrifugiert. Mit der Säule wurde wie nach der vorangegangenen Zentrifugation verfahren und anschließend 500 µl Puffer AW zugegeben. Dann wurde bei 13200 U/Min. für drei Minuten zentrifugiert und die Säule anschließend in ein Eppendorf-Röhrchen gesteckt. Das Sammelröhrchen mit dem Zentrifugat wurde verworfen. Nach der einminütigen Zentrifugation bei 13200 U/Min. wurde die Säule auf ein neues Eppendorf-Röhrchen gesteckt und das Zentrifugat abermals verworfen. Nun wurden 200 µl Puffer AE hinzugefügt und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für eine Minute bei 13200 U/Min. zentrifugiert. Zum Schluss wurde die Säule verworfen und das Zentrifugat bildete das gewonnene DNA-Extrakt, welches bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt wurde.

2.8.3 PCR zum Nachweis von *Clostridium perfringens* Phospholipase C und Enterotoxin A

Pro Testdurchlauf wurden maximal 44 Proben untersucht und mindestens eine Negativ- und Positiv-Kontrolle mitgeführt. Als Negativ-Kontrolle wurde destilliertes Wasser verwendet. Vor Testbeginn wurden die zu untersuchenden DNA-Extrakte auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurde der „Mastermix“ für alle Proben in einem Eppendorf-Röhrchen hergestellt.

Dazu wurde folgendes „Mastermix“-Protokoll zugrunde gelegt und mit der Zahl der zu untersuchenden Proben multipliziert:

	[μ l]
dH ₂ O	= 18,60
PCR-Puffer	= 2,50
MgCl ₂ [50mM]	= 1,25
dNTPs [10mM]	= 0,50
Primer PL3	= 0,50
Primer PL7	= 0,50
Primer P145	= 0,50
Primer P146	= 0,50
Taq-Polymerase	= 0,15
	25,00

Die Primer, die in der PCR verwendet wurden, hatten folgende Sequenzen:

Primer	Sequenz (5'-3')	Position
PL3	AAG TTA CCT TTG CTG CAT AAT CCC ^a	1676-1699 ^b
PL7	ATA GAT ACT CCA TAT CAT CCT GCT	1418-1440 ^b
P145	GAA AGA TCT GTA TCT ACA ACT GCT GGT CC	472-500 ^c
P146	GCT GGC TAA GAT TCT ATA TTT TTG TCC AGT ^a	868-897 ^c

^a komplementärer DNA-Strang

^b Position im *C. perfringens* Phospholipase C Gen

^c Position in der CPE-Gen Sequenz

Je 25 μ l des „Mastermixes“ wurden in neue Eppendorf-Röhrchen überführt und je 5 μ l des aufgetauten DNA-Extraktes, der Positiv-Kontrolle oder der Negativ-Kontrolle hinzugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Bei der PCR aus DNA-Extrakten direkt aus den Stuhlproben wurden je Probe 5, 10, 15 und 20 μ l des DNA-Extraktes verwendet und beim „Mastermix“ die entsprechende Menge dH₂O weniger zugefügt. Anschließend wurden die Proben auf dem Vortexmixer vermischt und danach kurz zentrifugiert, um Tropfen vom Rand der Reaktionsgefäße zu entfernen. Es

folgte die Zugabe von je einem Tropfen Öl auf jedes Gemisch. Die PCR wurde in einem PCR-Cycler (DNA Thermal Cycler, PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Juegesheim, Deutschland bzw. Abbott LCX Probe System Thermal Cycler, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) mit folgendem Programm durchgeführt:

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	5'	1
94°C	30''	
55°C	30''	30
72°C	30''	
72°C	10'	1
4°C	>1'	1

Nach Durchlauf des PCR-Programms wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung des verwendeten 1,5%igen Agarosegels wurden 1,5 g Agarose (UltraPure[®] Agarose, Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland) abgewogen, in 50 ml 0,5fach TBE gelöst und anschließend auf einem Magnetrührer aufgeköcht. Der Agarose wurde nach Abkühlen bis auf 50°C 50 ml 0,5fach TBE mit Ethidiumbromid (50 µl/500 ml) zugegeben, kurz vermengt und dann zügig in den vorbereiteten Gelträger gegossen. In den Gelträger wurde, zur Herstellung von Vertiefungen im Gel, ein Kamm eingefügt. Das Gel wurde mindestens 15 Minuten bis zum Erstarren bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das fertige Agarosegel wurde in einer feuchten Kammer mit 0,5fach TBE aufbewahrt.

Die Gelelektrophorese wurde in einer mit 0,5fach TBE gefüllten Elektrophoresekammer (DNA Sub Cell[®], Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Das PCR-Produkt je einer Probe wurde mit einer Eppendorf-Pipette den Reaktionsgefäßen entnommen, das an der Spitze haftende Öl mit einem saugfähigen Tuch entfernt und mit je 5 µl eines Ladepuffer in den Vertiefungen einer Nunc-Mikrotiterplatte durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Zur Herstellung des Ladepuffer wurden vorher 250 mg 0,25%iges Bromphenolblau und 250 mg 0,25%iges Xylene Cyanole FF in 70 ml 0,5-fach TBE gelöst, 30 ml 30%igen Glycerin zugegeben und schließlich gemischt. Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden

die Vertiefungen des 1,5%igen Agarosegels mit den entstandenen Gemischen aus Amplifikat und Ladepuffer befüllt. Als Eichung wurde zusätzlich mindestens eine Vertiefung mit einem Molekulargewichtsmarker bestückt, der zuvor wie folgt hergestellt worden war:

DNA-„Ladder“ 100bp (1 µg/µl)	20 µl
Blauer Farbstoff	100 µl
Puffer (0,5 TBE)	80 µl
<hr/>	
	200 µl

Die Elektrophorese wurde für 30 bis 40 Minuten bei 120V durchgeführt. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel entnommen und die Banden, die nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten DNA-Fragmente, unter UV-Licht beurteilt. Da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert, können die Nukleinsäurefragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Das Ergebnis wurde mit einer Polaroid-Sofortbildkamera mit der Blende 1 und einer Brennweite von 5,6 fotografiert.

2.9 Statistik

Die Korrelation der Patientendaten mit den mikrobiologischen Ergebnissen wurde anhand des Chi²-Vierfeldertests berechnet. p-Werte von <0,05 wurden als signifikant gewertet.