

5. Diskussion

5.1. Vergleich von Schnelltest, Histologie und Anzucht

Vor der Bewertung der hier gefundenen Ergebnisse muß erst einmal definiert werden, welcher Patient vom Arzt als H.-pylori-positiv, also infiziert, betrachtet wird. Die drei wichtigsten Diagnosekriterien in der Klinik sind der Schnelltest, die Histologie und die Anzucht.

Furuta definierte „H.-pylori-positiv“ als „Histologie-positiv“ und/oder „Kultur-positiv“ und/oder „Schnelltest-positiv“. Damit war das positive Ergebnis nur eines dieser drei Tests ausreichend. „H.-pylori-negativ“ war derjenige mit negativem Ergebnis in jedem der drei Tests und zusätzlich negativen Resultaten in Serologie und ¹³C-Atemtest (35).

Andersen dagegen verlangte für den Status „H.-pylori-positiv“ positive Resultate von zwei Tests aus den fünf Kategorien Kultur, Histologie, Schnelltest (Atemtest oder Schnelltest auf Biopsiebasis), IgG-Antwort (als Westernblot) und PCR-Technik (2). Er fand mit dieser Definition unter den „H.-pylori-positiven“ 16 %, die in Kultur und Histologie negativ blieben und empfahl daher die Verwendung mindestens eines weiteren Tests (Atemtest, Serologie oder CLO-Test[®]). Serologie, PCR und Atemtest fanden in unserer Arbeit aus Kosten- und Verfügbarkeitsgründen keine Verwendung.

Ganz im Gegensatz dazu vertrat Chodos die leider nicht näher begründete Meinung, bei negativer Histologie und negativer Anzucht seien die positiven Ureaseschnelltests als falsch positiv anzuerkennen (15). Andersens Bedenken hinsichtlich eines falsch positiven H.-pylori-Status (21), wenn man nur *einen* positiven Test als ausreichend anerkennt, bezogen sich hingegen nur auf die Serologie (mögliche spontane Eradikation bei noch monatelang positiver Serologie) und die PCR (Kontamination mit H.-pylori-Genprodukten im Rahmen der Endoskopie oder im Labor). Seine Studie machte deutlich, daß der am häufigsten angewendete „Goldstandard“, der nur auf Kultur und Histologie beruht (24, 54, 83, 107), nur etwa 85 % der Infizierten erfaßt. Forbes definierte „H.-pylori-negativ“ schlicht als negatives Resultat der Histologie (32).

Die Ergebnisauswertung der vorliegenden Arbeit basiert auf *der* Definition des H.-pylori-positiven Status, nach der ein positives Ergebnis in Schnelltest oder Histologie oder Anzucht notwendig und ausreichend ist, weil erstens dadurch der von Andersen aufgedeckte Anteil falsch negativer Resultate, der bei alleiniger Untersuchung mit Histologie und Anzucht entsteht, reduziert wird. Zweitens war die Gefahr falsch positiver Resultate bei negativer An-

zucht und Histologie minimal, weil weder die PCR noch die Serologie, sondern der Schnelltest genutzt wurde. Der strikteren Definition von Furuta, der für den H.-pylori-negativen Status noch zusätzlich einen negativen Atemtest und eine negative Serologie verlangte (35), schlossen wir uns im Falle des Atemtests aus Kostengründen nicht an. Eine positive Serologie bei negativen Histologie-, Kultur-, Schnell- und Atemtestergebnissen würde außerdem wegen der oft lange nach Eradikation noch bestehenden Serokonversion eher einen falsch positiven Status bedeuten.

Der festgestellte Anteil von etwa 50 % Infizierten an der Gesamtmenge derer, die sich einer Endoskopie mit Probenentnahme unterzogen, entspricht den Angaben der Literatur (128). Auch die Sensitivitäten der einzelnen Tests entsprechen den Ergebnissen gleichartiger Untersuchungen von Hazell (49), Deltenre (24) und Chodos (15).

Allerdings sind exakte Vergleiche der vorliegenden Sensitivitäten mit denen anderer häufig durch variierende Versuchsbedingungen erschwert. So unterscheiden sich oft schon die Einschlusskriterien für die endoskopische Untersuchung: Während für uns das einzige Ausschlusskriterium eine bekannte HIV-Infektion war, schlossen wir jeden einwilligenden Patienten ohne Rücksicht auf die Indikation und die Vormedikation ein, der gastroskopiert werden sollte. Andere Autoren schlossen Patienten, die mit H₂-Blockern, Protonenpumpeninhibitoren, Antibiotika oder Wismut-Verbindungen vorbehandelt waren, entweder ganz aus oder ließen die Endoskopie erst zwei Wochen nach Absetzen dieser Medikamente durchführen (83, 129), weil beispielsweise die Behandlung mit Omeprazol eine starke Reduktion der Besiedlung mit H. pylori verursachen kann (73, 130). Unser Vorgehen wird daher einige Isolate weniger erbracht und das Erkennen einiger Infizierter verhindert haben.

Der auffällige Unterschied der Sensitivitäten der Histologie in Abhängigkeit von ihrem Ausführungsort hat ihre Gründe zum einen in den verwendeten Färbungen, die sich für die H.-pylori-Diagnostik unterschiedlich gut eignen. Das Virchow-Klinikum benutzte die Methylenblaufärbung, Prof. Buntrock die teurere, aber auch sensitivere Giemsa-Färbung. Zum anderen sind in der pathologischen Abteilung einer großen Klinik viele Untersucher mit unterschiedlicher Erfahrung in der Diagnostik tätig, während in einem etablierten niedergelassenen bioptischen Institut die Bewertungsqualität relativ stabil ist. Daß dies ins Gewicht fallen kann, bemerkte auch Deltenre, der in der Hälfte der Patienten, die Kultur-positiv, aber zuerst Histologie-negativ waren, beim zweiten Durchmustern der Schnitte den Erreger fand (24).

5.2. Welche Erregerkonzentration ist notwendig, um den Schnelltest nach einer Stunde positiv werden zu lassen?

Diese Frage wurde mit der Untersuchung von nur elf Isolaten angegangen, worin sich gleich zwei Kritikpunkte spiegeln: die Verwendung von Isolaten anstelle von Biopsien und die geringe Anzahl von Versuchen.

Die Erregerkonzentration, die für einen sichtbaren Farbumschlag nach einer Stunde nötig ist, lag bei unseren Versuchen zwischen 10^4 und 10^6 KBE/ml. Vergleichbare Angaben findet man bei Deltenre (24), Hartmann (47) sowie Mégraud (90).

Der Schwerpunkt wurde auf das Verhalten des Tests eine Stunde nach seinem Ansatz gelegt, weil nach dieser Zeit die Patienten oft noch vor Ort und für den Arzt erreichbar sind.

Im folgenden werden die Faktoren erörtert, die Einfluß auf die untersuchte Größe haben:

Insbesondere bei der Verwendung von Biopsien erkennt das Auge des Untersuchers mit zunehmender Übung den Farbumschlag in direkter Umgebung der Biopsie sehr viel früher als der Anfänger, und er lernt, eine Rotfärbung durch Blut von der beginnenden Pinkfärbung als Indikatorreaktion zu unterscheiden. Dadurch könnten mit zunehmender Erfahrung geringere Konzentrationen als ausreichend für den Test interpretiert werden. Diesen Einfluß umgingen wir mit der Untersuchung von Erregersuspensionen durch ein Photometer.

Eine andere Einflußgröße ist die Reaktionstemperatur. Das Temperaturoptimum der Urease liegt bei 45°C (96). Der Versuch fand bei Raumtemperatur, also bei etwa 18° bis 20°C statt. Wenn man die Testreagenz beispielsweise vorwärmte und den Testansatz warmhielte, könnten geringere Erregerkonzentrationen zum Infektionsnachweis ausreichen.

Eine andere denkbare Variable ist der pH-Wert des Tests. Das pH-Optimum der H.-pylori-Urease liegt bei 8,2 (104). Da aber der Indikator Phenolrot (Phenolsulfonphtalein) schon zwischen pH 6,5 und 8,0 seine Farbe wechselt, kann man den Test nicht auf dieses pH-Optimum einstellen. Der Einsatz von m-Cresolpurpur mit einem Umschlagbereich zwischen pH 7,4 und 9,0 wurde in diesem Zusammenhang von McNulty vorgeschlagen (96).

Nachdem mit dieser begrenzten Anzahl von Isolaten der fragliche Bereich der Erregerkonzentration eingegrenzt werden konnte, sollte vielleicht in einer zukünftigen Arbeit der Versuch mit einer größeren Anzahl von Biopsien wiederholt werden. Ein nicht zu vermeidender Nachteil bei der Verwendung von Biopsien wird allerdings immer die fehlende Nachprüfbarkeit der tatsächlichen Erregerkonzentration dieser Biopsie sein. Man könnte zwar eine zweite

Biopsie aus dem gleichen Areal entnehmen und diese für die Konzentrationsbestimmung verwenden oder eine entnommene Biopsie teilen, aber die ungleichmäßige Verteilung von *H. pylori* auf der Magenschleimhaut verbietet die Annahme, daß dann in der Schnelltestbiopsie die gleiche Konzentration vorliegt. Überdies ist eine Konzentrationsbestimmung aus derselben Biopsie *nach* deren Verwendung im Schnelltest wegen der im folgenden noch besprochenen bakteriziden Wirkung des pH-Anstiegs nicht aussichtsreich. Eine mögliche Lösung wäre das Zerkleinern, besser Homogenisieren der Biopsien. Dieses Homogenisat könnte geteilt und einmal dem Schnelltest sowie einmal der Konzentrationsbestimmung zugeführt werden.

Es ist denkbar, daß durch Homogenisieren auch die erforderliche Konzentration an Erregern sinkt, da diese hauptsächlich unter der Mukusschicht sitzen, möglicherweise also später mit der Testreagenz in Kontakt kommen als das in einer zerkleinerten Biopsie der Fall ist. Diese Frage interessiert auch im Zusammenhang mit der Anzucht von *H. pylori*. Viele Autoren zermörsern oder zerhacken die Biopsien nach dem Transport ins Labor, um sie dann zu inokulieren (41, 45, 107). Andere halten das weniger gleichmäßige Verstreichen der intakten Biopsie mit einem Drigalskispatel für ausreichend (129). Zwar ist das Zermörsern wegen der denkbaren erhöhten Freisetzung von *H. pylori* vielversprechend, gleichzeitig jedoch lautet ein Grundsatz der Behandlung von *H. pylori*, ihn so wenig wie möglich einer sauerstoffreichen oder trockenen Umgebung auszusetzen.

5.3. Ist die Anwendung der McFarland-Skala zur Herstellung von H.-pylori-Suspensionen mit gewünschter Erregerkonzentration statthaft?

Ziel dieses Unterversuches war es, bei Bestätigung der genannten Frage Suspensionen mit der im vorherigen Abschnitt besprochenen Erregerkonzentration herstellen zu können. Mit diesen sollten anschließend die im Zentrum der Arbeit stehenden Überlebensversuche durchgeführt werden.

Da es wie bei der Frage nach einer Erregerkonzentration wieder prinzipiell um die Beobachtung einer Tendenz ging, war der geringe Probenumfang mit nur elf Isolaten vertretbar. Der sich aus den gewonnenen Daten ergebende Korrelationskoeffizient $r = 0,49$ zeigt eindeutig, daß kein direkter Zusammenhang zwischen der Trübung der Suspension und ihrer *H. pylori*-Konzentration bestand.

Das ist um so erstaunlicher, als die Verwendung dieses Verfahrens in der H.-pylori-Literatur mitunter angegeben wird (3, 45). Es gibt aber keine Arbeit, in der seine Anwendbarkeit für H.-pylori-Suspensionen besprochen wird. Was sind die möglichen Ursachen für dieses überraschende Ergebnis?

Zur Herstellung unserer Suspensionen nutzten wir üppig mit H. pylori bewachsene Columbia-Kochblutagarplatten ohne sichtbare Kontamination von elf verschiedenen Laborstämmen. Vor der Bestimmung der Trübung anhand der McFarland-Skala wurden die Suspensionen auf einen Schüttler gestellt, um eine möglichst homogene Suspension zu beurteilen. Die Trübungsbestimmung mit dem bloßen Auge ist wegen ihrer Subjektivität natürlich ein Schwachpunkt dieser Methode. Trotzdem erklärt das noch nicht die beobachteten Divergenzen von zwei Zehnerpotenzen an koloniebildenden Einheiten für einen Trübungsgrad. Da die verwendete NaCl-Lösung klar ist und die Einsaat aus einer H.-pylori-Reinkultur stammt, erübrigt sich die Suche nach anderen trübenden Verbindungen. Vielleicht erfolgt durch den Schüttler eine zwar makroskopisch so empfundene Homogenisierung, nicht aber auf mikroskopischer Ebene. Da elf verschiedene Stämme verwendet wurden, ist ein unterschiedliches Verhalten zumindest denkbar. Ein Stamm könnte stärker zur Adhärenz neigen als ein anderer, so daß in der NaCl-Lösung mehr oder weniger große Klumpen von Bakterien entstünden, die makroskopisch als solche zwar nicht erkennbar wären, aber zu einer mehr oder weniger starken Trübung führen könnten.

Dies würde bedeuten, daß das Verfahren tatsächlich für H.-pylori-Suspensionen nicht anwendbar ist.

Andererseits können die Divergenzen zwischen Trübung und Erregerkonzentration auch ihre Ursache in der Methode der Konzentrationsbestimmung haben. Hierfür sei diese noch einmal kurz beschrieben: Nach der Herstellung der Erregersuspension in NaCl und der Trübungsbestimmung wurde mit derselben Suspension ein doppelter Ansatz einer Verdünnungsreihe beschickt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde ein festgesetztes Volumen auf Kochblutagar inokuliert, um nach drei- bis fünftägiger Inkubation die gewachsenen Kolonien auszuzählen und so auf die Konzentration in der unverdünnten Erregersuspension schließen zu können.

Wenn man sich die anspruchsvolle Natur des Erregers vor Augen hält, wird deutlich, daß diese zeitaufwendige Prozedur eventuell von einigen H. pylori nicht überlebt wurde. Obwohl alle Suspensionen im Wasserbad bei 20 - 25° C gehalten wurden, um die Umgebungstemperatur für die aus dem Brutschrank kommenden Kolonien nicht plötzlich zu stark zu senken,

war dies während der Verarbeitung natürlich nicht kontinuierlich möglich. Genauso veränderten sich mit der Entnahme aus dem Brutschrank schlagartig Luftfeuchtigkeit und atmosphärische Zusammensetzung. Es ist vorstellbar, daß die verschiedenen Stämme auf derartige Schwankungen der Umgebungsbedingungen unterschiedlich empfindlich reagieren.

Wenn die Erklärung der gewonnenen Ergebnisse in diesem Bereich zu finden sind, steht die McFarland-Methode für H.-pylori-Konzentrationsbestimmungen nicht zur Disposition.

5.4. Evaluation verschiedener Transportmedien für H. pylori

Da aufgrund oben besprochener Ergebnisse nicht bestätigt werden konnte, daß die Anwendung der McFarland-Skala zulässig ist, konnten keine H.-pylori-Suspensionen mit einer Erregerkonzentration zwischen 10^4 und 10^6 KBE/ml hergestellt werden. Daher konnte auch nicht geklärt werden, ob die Ergebnisse aus 4.2. (Erregerkonzentration) auf die zwei mit Harnstoff modifizierten Medien, die eine Variation des Ureaseschnelltests darstellen, übertragbar sein würden. Das bedeutete, daß bei der Untersuchung der verschiedenen Transportbedingungen die Einflußgröße „Erregerkonzentration“ keine kontrollierbare Größe sein konnte.

Den Einfluß von sechs verschiedenen Transportbedingungen auf die Überlebensdauer wurde anhand von 68 H.-pylori-Isolaten untersucht. Dabei stellte sich das kommerziell erhältliche Portagerm pylori[®] bei 4° C als das günstigste hinsichtlich des Überlebens von H. pylori heraus. In der Reihenfolge ihrer Aufzählung fiel die Qualität der restlichen Medien unter dem genannten Gesichtspunkt ab: Portagerm pylori[®] bei 18° C, Thioglykolatbouillon bei 18° C, Portagerm pylori[®] mit 0,5 ml aufgeschichtetem Christensen-Harnstoff bei 18° C, sterile, physiologische Kochsalzlösung bei 18° C, Thioglykolatbouillon mit Harnstoff versetzt bei 18° C. Im letztgenannten Medium lebte nach einem Tag kein Erreger mehr.

In der Fülle der Literatur zum Thema Transportmedien finden sich nur vereinzelt Autoren, die von der Benutzung eines solchen Mediums abraten. Parsonnet (107) empfahl zwar die Verwendung leerer, steriler Behälter für den Transport ins Labor, allerdings mit der Einschränkung, daß die Weiterverarbeitung innerhalb einer Stunde stattfinden soll, was praktisch kaum umsetzbar ist. McNulty verwendete in einer umfangreichen Studie zum Vergleich zweier Ureaseschnelltests ebenfalls kein Transportmedium. Immerhin setzte sie dem Behälter 100 µl NaCl zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit zu. Die Biopsien selbst wurden, ohne mit NaCl in

Kontakt zu kommen, an der Behälterwand klebend, innerhalb von zwei Stunden ins Labor transportiert. Hintergrund dieser ungewöhnlichen Art des Transports war die Annahme, daß durch den Kontakt mit NaCl die Qualität der Grampräparate leiden würde (86).

Eine ebenfalls eher selten propagierte Transportmethode ist die direkte Inokulation der Biopsien auf Kulturmedien noch im Endoskopieraum ohne zwischengeschaltetes Transportmedium. Savio beobachtete, daß *H. pylori* unter diesen Bedingungen bis zu sieben Tage überlebte, wenn die Platten bei 4° C aufbewahrt wurden, und mindestens eine Stunde nach Lagerung bei Raumtemperatur (116). Die interessante Variante mit Kühlung würde demnach eine Sammlung von Biopsien über einen ganzen Tag und den gemeinsamen Transport zur Weiterverarbeitung erlauben. Allerdings ist fraglich, wie weit die mikrobiologischen Fertigkeiten und die diesbezügliche Motivation beim Personal vorhanden sind. Einen interessanten Vorstoß in die gleiche Richtung unternahm Xia 1994. Er inokulierte allerdings keine Biopsien, sondern Isolate auf verschiedene Kulturmedien und verschickte sie ungekühlt in Spezialbeuteln (BBL Campy Pouches) mit der normalen Post von Dublin nach Galway (zwei bis vier Tage), nach Bordeaux (zwei Tage) und nach China (sechs Tage). 90 % der Isolate auf einem der Kulturmedien überlebten sechs Tage (141). Interessant wäre die Wiederholung des Versuches mit Biopsien.

Nur in wenigen Studien wurde der Gebrauch eines Transportmediums direkt mit dem Transport ohne Medium verglichen und die Verwendung daraufhin empfohlen (6).

Wegen des großen Variantenreichtums in Hinsicht auf die eingesetzten Medien, die Transportzeit und -temperatur sind die Studien selten direkt miteinander vergleichbar. Und da die Güte eines Transportmediums nur durch die Höhe der Anzuchttrate bestimmbar ist, nehmen auch die Anzuchtmethoden, die ebenfalls variantenreich eingesetzt werden, Einfluß auf die Beurteilung des Transportmediums. Dies schränkt die Vergleichbarkeit der Studien noch weiter ein.

Von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Transportmedien wurde in der Literatur am häufigsten die sterile, physiologische Kochsalzlösung besprochen (19, 23). Das hat wahrscheinlich in der einfachen und äußerst preiswerten Beschaffung seinen Grund. Daher erstaunt auch, daß die Nutzung von Thioglykolatbouillon, die jedes mikrobiologische Labor selbst preiswert herstellen kann, vergleichsweise selten untersucht wurde (85). Ebenfalls spärlich sind Berichte über die Güte des komplexen Transportmediums Portagerm pylori® (69). Die herstellende Firma bioMérieux (Nürtingen, Deutschland) empfiehlt es für Trans-

portzeiten bis zu 48 Stunden; der Transport könne bei Raumtemperatur durchgeführt werden (69). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widersprechen dieser Einschätzung. Andere komplexe Medien wurden häufiger eingesetzt, wie beispielsweise das Stuart Transport Medium (STM) oder Brain Heart Infusion (BHI) (96, 103). Selten waren lange auch die Versuche, die Ureasetestreakenz gleichzeitig als Transportmedium für Biopsien mit positivem Schnelltest zu nutzen. Erst in den letzten drei Jahren stieg die Zahl der Untersuchungen hierzu (57, 109, 139).

5.4.1. Kochsalzlösung als Transportmittel

Von den getesteten 68 Isolaten überlebten bei uns nur 19,1 % der Isolate einen Tag in NaCl, also einen Zeitraum, der für den Postweg mindestens veranschlagt werden muß. Die meisten der nachfolgend zitierten Autoren testeten NaCl nur für kurze Transporte bis zu etwa vier Stunden. Wir testeten dagegen das Überleben in NaCl erst nach 24 Stunden und später. Daher sind unsere Ergebnisse nicht direkt vergleichbar. Aber es besteht Übereinstimmung darin, daß die kritische Zeitgrenze für den Transport in NaCl weit unterhalb von 24 Stunden liegen muß. Chodos verwendete 1 ml NaCl für den Transport und erreichte in seiner 72 Patienten umfassenden Studie immerhin eine Anzuchttrate von 40,5 %. 59 % der Patienten waren in der Histologie positiv. Damit ist die Sensitivität seiner Anzucht nicht auffallend schlecht. Allerdings transportierte er die Biopsien sofort nach Entnahme ins Labor (15). Leider machte er keine explizite Angabe zur Temperatur während des Transports, was vermuten läßt, daß sie der Umgebungstemperatur entsprach.

Zu den Verfechtern von NaCl als Transportmittel für geringe Verzögerungen gehört auch Debonnie. Von 19 Patienten wurden die so transportierten Biopsien innerhalb von zwei Stunden weiterverarbeitet. Die Sensitivität der Anzucht aus antralen Biopsien lag über 80 % (23).

Das legt die Vermutung nahe, daß es für kurze Transportzeiten wichtiger ist, das Austrocknen zu vermeiden als eine aufwendige Kühlung in einem komplexen Transportmediums zu gewährleisten. Wenn NaCl als preiswertes Transportmittel suffizient und einsetzbar ist, dann jedoch ausschließlich für Biopsien, die in einem Krankenhaus mit mikrobiologischem Labor entnommen werden. Kein niedergelassener Gastroenterologe kann derart kurze Transportzeiten garantieren.

In diesem Sinne empfahl Mégraud für Transportzeiten bis zu vier Stunden NaCl und Kühlung bei 4° C und bei längeren Transporten die Verwendung ebenfalls gekühlter, komplexer Medien (90).

Die Beobachtung, daß sich die Kühlung während des Transports günstig auswirkt, machte auch Han, der NaCl mit drei glyzerolhaltige Medien (Milch, Brucellabouillon, Cystein-Albumin) mit dem häufig empfohlenen Stuart Transport Medium (STM) verglich. Er beobachtete einen geringeren Abfall der koloniebildenden Einheiten bei sinkender Transporttemperatur (Raumtemperatur, 4° C, -20° C, -70° C). Obwohl im Vergleich NaCl schlecht abschnitt, war *H. pylori* bei 4° C hieraus nach sechs Tagen noch anzuzüchten. Bei Raumtemperatur wuchs der Erreger noch nach einem Tag an, aber nach zwei Tagen konnten nicht mehr als 10 KBE/ml angezüchtet werden, was sich in den darauffolgenden Tagen nicht änderte. Weder aus den Abbildungen noch aus dem Text ist zu entnehmen, ab welchem Zeitpunkt kein lebender *H. pylori* im NaCl-Ansatz mehr zu finden war (45).

In der vorliegenden Untersuchung konnte nach spätestens fünf Tagen Konservierung von *H. pylori* in NaCl bei Raumtemperatur kein lebender Erreger mehr verzeichnet werden. Nach zwei Tagen waren noch knapp 9 % der 68 Isolate rekultivierbar.

Allerdings sind diese Ergebnisse mit denen von Han nicht direkt vergleichbar, weil er nicht die Anzahl überlebender Isolate dokumentierte, sondern anhand von nur zwei Isolaten das Verhalten der Erregerkonzentration in den einzelnen Medienansätzen bei unterschiedlichen Temperaturen beurteilte und damit nur einen sehr begrenzten Probenumfang untersuchte.

Morton verglich NaCl mit dem komplexen Brain Heart Infusion Medium (BHI) anhand der Biopsien von 72 Patienten (Infizierte *und* Nichtinfizierte). Bis zu einer Transportzeit von maximal drei Stunden unterschieden sich beide Medien nicht signifikant (56 % versus 50 %). Erst nach 24 Stunden bei Raumtemperatur zeigte BHI mit einer 38 %igen Anzuchtrate versus 28 % die besseren Ergebnisse. Er schlußfolgerte, daß bei kurzen Transporten die Wahl des Mediums unerheblich, bei zu erwartenden Verzögerungen aber ein komplexes Medium wie BHI vorzuziehen sei (96). Leider sagen diese Zahlen nichts darüber aus, welcher Anteil der *H.-pylori*-positiven Biopsien nach eintägigem Transport in NaCl durch die Anzucht entdeckt wird, weil er auch *H.-pylori*-negative Biopsien transportierte. Ein Schwachpunkt der Studie ist die Verwendung ausschließlich antraler Biopsien für die Weiterverarbeitung innerhalb von drei Stunden und von Korpusbiopsien für die verzögerte Verarbeitung. 1995 war schon bekannt, daß die Dichte der Besiedlung im Antrum in der Regel stärker als im Korpus ist,

wenn der Patient nicht mit Protonenpumpenblockern vorbehandelt war (73, 130). Bei Morton waren 78 % der Patienten mit diesen oder H₂-Blockern vorbehandelt.

Soltesz (122) überprüfte ähnlich wie die vorliegende Arbeit das Überleben von *H. pylori* in NaCl und STM mit und ohne Harnstoffzusatz, allerdings nur mit sieben Isolaten. Die Ansätze wurden bei 4° C, 10° C, 15° C, 20° C und 30° C aufbewahrt. Nach jeweils sechs, 24 bzw. 48 Stunden erfolgte der Reaktivierungsversuch. Dabei zeigte sich, daß das komplexe STM dem NaCl als Transportmedium überlegen war und daß der Zusatz von Harnstoff sich ungünstig auf das Überleben von *H. pylori* auswirkte. Da wir erst nach 24 Stunden begannen, das Überleben in den Ansätzen zu prüfen, interessieren die 24- und 48-Stunden-Ergebnisse seiner Studie. Nach 24 Stunden lebten im 20° C-Ansatz in NaCl, der also mit unserem Raumtemperatursatz vergleichbar ist, noch zwei der sieben Isolate (28 %), nach 48 Stunden noch ein Isolat (14 %). Bei uns überlebten den ersten Tag in vergleichbarem Ansatz 19 % und einen zweiten Tag 9 %. Die deutlich geringere Zahl der von Soltesz untersuchten Isolate erschwert den Vergleich. Die Methodik unterschied sich auch dahingehend, daß wir getränkte Watteträger zur Reaktivierung immer wieder entnahmen und zurücksteckten, er dagegen aus einer Transportmittel-Erreger-*Suspension* jeweils eine Testmenge entnahm. Dieses Verfahren ist fraglos weniger kontaminationsträchtig als unseres, obgleich die Entnahme, das Ausstreichen und das Zurückstecken mit steriler Pinzette erfolgte. Aber in keinem unserer 68 Isolate mußten wir eine Reaktivierung aus Kontaminationsgründen als negativ angeben. Außerdem ist unser Biopsiemodell in Form eines Watteträgers sicher realistischer als die gleichmäßige Verteilung der Erreger in einem Transportmedium. Trotzdem lassen Soltesz' Ergebnisse ähnlich unseren auch den Schluß zu, daß sich NaCl-Lösung bei Raumtemperatur für den Transport von *H. pylori* schon bei Verzögerungen von sechs Stunden nicht eignet. Sie stützen auch die These, daß eine Kühlung bei 4° C während des Transports das Überleben von *H. pylori* fördert.

Hartmann ließ Suspensionen von sechs Isolaten in NaCl-Lösung bei Raumtemperatur stehen und kontrollierte nach zwei, vier, acht und 24 Stunden die Erregerkonzentration. Bis zu acht Stunden waren lebende Erreger nachweisbar, wenn auch die Erregerkonzentration in dieser Zeit um durchschnittlich drei Zehnerpotenzen gesunken war. Nach 24 Stunden lebte keiner mehr (47). Das waren zwar nur wenige Isolate und das Ergebnis entspricht auch nicht unserer Feststellung von knapp 20 % noch lebender Stämme in NaCl-Lösung nach einem Tag, aber es untermauert unsere Empfehlung, NaCl-Lösung nicht für den Postversand einzusetzen. Auch

nach vier Stunden bei Raumtemperatur sank die Erregerkonzentration im Schnitt um eine Zehnerpotenz.

Abschließend kann man in bezug auf physiologische Kochsalzlösung als Transportmittel für *H. pylori* festhalten, daß es im Vergleich zu anderen Medien sehr preiswert und einfach zu handhaben ist, sich aber nur für den kurzdauernden Transport von zwei bis vier Stunden und damit nicht für den niedergelassenen Gastroenterologen eignet.

5.4.2. Thioglykolatbouillon als Transportmittel

Thioglykolatbouillon ohne Harnstoffzusatz war unter den sechs getesteten Transportmedien das drittbeste in Hinsicht auf das Überleben des Erregers. Allerdings überlebten darin nur knapp die Hälfte (48,5%) der 68 Stämme den ersten Tag.

Auch Thioglykolatbouillon ist im Vergleich zu den kommerziell erhältlichen Medien ein preiswertes und von jedem Mikrobiologielabor leicht bereitzustellendes Transportmedium. Das ist sein großer Vorteil. Wir verwendeten es mit und ohne Zusatz von Harnstoff bei jeweils 18° C. In der Literatur findet es seltener als NaCl-Lösung oder komplexe Medien Erwähnung. Ein Kilogramm kostet etwa 320 DM (Fa. Oxoid).

Martínez transportierte die Biopsien von immerhin 587 Patienten in Thioglykolatbouillon zur sofortigen Verarbeitung ins Labor. Im Zentrum seiner Studie stand die Frage nach dem besten Kulturmedium für die Primärkultur von *H. pylori*. Ein Vergleich mit anderen Transportmedien fand daher nicht statt. Er ging auch in der Diskussion nicht näher auf die Gründe seiner Wahl von Thioglykolatbouillon als Transportmittel ein. Die Anzucht war bei 63,7 %, die Histologie mit Giemsa dagegen nur bei 50,25 % der Patienten positiv (85). Da im allgemeinen die Histologie sensitiver ist als die Kultur, liegt hier eine hervorragende Ausbeute der Anzucht vor, die durch den Transport der Biopsien in Thioglykolatbouillon offenbar nicht beeinträchtigt wurde. Leider machte er keine Angaben zur Transportdauer und -temperatur.

Mirza untersuchte anhand der Biopsien von 42 Patienten neben verschiedenen Kulturmedien für die Primärkultur auch den Einfluß zweier verschiedener Transportmedien: Thioglykolatbouillon und einen halbfesten „motility agar“. Die Transportdauer lag zwischen zwei und vier Stunden. Manche der Biopsien, leider gab er nicht die genaue Anzahl an, erreichten das Labor an einem Feiertag. Diese wurden über Nacht bei 4° C gelagert. 43 % der Patienten hatten eine positive Kultur, wobei die Anzuchtserfolge für beide Transportmedien identisch waren (93).

Beide Studien - wie auch unsere Daten - lassen also wieder nur die Empfehlung für den Gebrauch in einem Krankenhaus mit Mikrobiologielabor zu.

Es finden sich in der Literatur leider keine Studien, die das Überleben in Thioglykolatbouillon über längere Zeit untersuchten. Wir stellten nach einem Tag in Thioglykolatbouillon bei 18° C nur noch 48 % lebende Stämme fest. Das ist für den Postversand eine zu geringe Ausbeute. In einer fortführenden Arbeit verspräche der Einsatz von gekühlter Thioglykolatbouillon (4° C) eine höhere Ausbeute. Eine weitere Steigerung wäre zu erwarten, wenn man die Rekultivierung aus einem Transportmedium-Erreger-Ansatz nur *einmal* durchführte, und nicht wie wir täglich. Das bedeutete natürlich einen ungleich umfangreicheren Probenansatz.

5.4.3. Portagerm pylori[®] als Transportmedium

Dieses kommerziell erhältliche Medium schnitt im Überlebensversuch am besten ab. Bei 4° C überlebten gut 2/3 der 68 Stämme 24 Stunden. Auch wenn in keinem anderen Medium mehr Stämme überlebten, ist diese Rate nicht gut genug. Etwa jeder dritte Patient müßte unter Umständen die Spiegelung mit Probenentnahme wiederholen, was nicht akzeptabel ist.

Eine der seltenen Erwähnungen dieses halbfesten Transportmediums findet sich 1995 bei Mégraud in einem den Stand der Diagnostik zusammenfassenden Bericht. Darin empfahl er für den Fall einer Transportdauer über vier Stunden den Gebrauch von Portagerm pylori[®], welches bis zu 24 Stunden bei 4° C gute Dienste leiste (90). Bedauerlicherweise machte er keine genaueren Angaben und gab auch keine Literaturhinweise zu dieser Empfehlung. Er bemerkte nur, daß es sich trotz dieser positiven Einschätzung ebensowenig wie NaCl-Lösung für die Versendung der Biopsien per Post eigne.

Die Ergebnisse von Heep sind vielversprechender als die der vorliegenden Arbeit. Er untersuchte das Überleben von *H. pylori* in Biopsien in gekühltem Portagerm pylori[®] nach einem, zwei und drei Tagen und stellte Überlebensraten von 94, 87 bzw. 77 % fest (50). Die initiale Temperatur betrug hierbei -25° C. Zu den Temperaturen während der verbleibenden Testzeit machte er leider keine Angaben. Sollten diese Resultate sich bestätigen lassen, käme das Medium tatsächlich für kurze Postwege in Betracht. Anders als wir verwendete er *Biopsien* von 307 Patienten mit positivem Ureasetest. Interessanterweise beobachtete er auch, daß die in einem Vorversuch mit Suspensionen erzielten Resultate in Portagerm pylori[®] schlechter aus-

fielen als die mit Biopsien. Seine Vermutung ist, daß hierbei vielleicht Mukosa und Mukus protektiv wirken.

Der Nachteil des Mediums sind die höheren Kosten mit 2,75 DM pro Transportbehälter im Vergleich zu NaCl oder Thioglykolatbouillon.

Aber man darf in diesem Zusammenhang auch die Kosten einer wiederholten Endoskopie nicht vergessen, die bei erfolgloser Anzucht zur Klärung von Resistenzen unumgänglich wird. Dieses Risiko ist im Vergleich der von uns eingesetzten Medien beim Portagerm pylori[®] zwar am geringsten, für sich gesehen aber zu hoch.

5.4.4. Harnstoffhaltige Transportmedien

Der Harnstoffzusatz verschlechterte bei Portagerm pylori[®], aber insbesondere bei Thioglykolatbouillon, die Überlebenschancen des Erregers erheblich. Im ersteren lebten nach einem Tag noch 57,4 % versus 66,2 % und im letzteren 0 % versus 48,5 %.

Hinter dem Zusatz von Harnstoff zum Transportmedium stand die Idee, Transport- und Nachweismedium zu vereinen und damit die Zahl der Biopsien zu senken. Wenn auch Clyne beobachtet hatte, daß *H. pylori* außerhalb des Magens in Gegenwart von Harnstoff weniger wegen der Toxizität des entstehenden Ammoniaks als vielmehr des pH-Anstieges wegen nicht überleben kann (16), ließ doch die Schnelligkeit der Harnstoffumsetzung durch die erregerigene Urease erhoffen, daß der Nachweis in den meisten Fällen weit *vor* einer Abtötung *aller* Erreger stattfinden würde.

Soltész verglich die Auswirkungen des Harnstoffzusatzes zu NaCl-Lösung mit einer Konzentration von 2 % (wt/vol) mit unversetzter physiologischer NaCl-Lösung. Bei 20° C war für sieben untersuchte Isolate nach 24 Stunden in NaCl-Lösung noch spärliches Wachstum zu verzeichnen. Für die Isolate im Harnstoff-NaCl-Ansatz ließ sich bei der gleichen Temperatur schon nach sechs Stunden Aufenthalt kein Wachstum mehr nachweisen. Leider schlüsselte er nicht die Anzahl der jeweils überlebenden Isolate auf, sondern gibt nur das Ausmaß des Wachstums in Grobeinheiten (0 – 4) für die getesteten Isolate insgesamt an (122). Nichtsdestotrotz führte der Zusatz von Harnstoff in *jedem* der Ansätze, die sich durch Temperatur und Dauer voneinander unterschieden, zu einer Reduktion des Wachstums. In den Ansätzen, aus denen auch aus NaCl-Lösung kein Erreger mehr rekultiviert werden konnte, gelang dies

auch für die entsprechenden Ansätze mit Harnstoffzusatz nicht. Er schlußfolgerte daher, daß Harnstoffzusätze zum Transportmedium vermieden werden sollten.

Diese Empfehlung steht mit unseren Beobachtungen in Einklang. In beiden Harnstoffansätzen erfolgte zwar immer der erwünschte Nachweis des Erregers durch Farbumschlag, aber dafür auch zu jedem Testzeitpunkt eine deutliche Verringerung überlebender Stämme im Vergleich zu den harnstofffreien Varianten. Ein Ziel war, durch das *Aufschichten* der Christensen-Harnstofflösung sowohl auf das halbfeste Portagerm pylori[®] als auch die visköse Thioglykolatbouillon die Zeit, in der Biopsie und Harnstoff Kontakt hatten, auf den Inokulationsvorgang zu begrenzen. Immerhin reichte diese kurze Zeit aus, so viele Erreger in die Harnstoffschicht zu bringen, daß der Ureasenachweis immer gelang. Es ist vorstellbar, daß der tägliche Kontakt von Erreger und Harnstoff bei den Entnahmen der Watteträger zur Re-kultivierung weiter schädigend wirkte. Bei jeder Entnahme bestand die Möglichkeit, Harnstoff mit dem Watteträger aufzunehmen, mit austreichen und so den Erreger auf der Agarplatte noch zu schädigen. Das ließe sich mit einer Versuchsanordnung umgehen, die die Entnahme des Erregers ohne Kontakt zur Harnstoffschicht gestattete, zum Beispiel aus einer Öffnung am Boden.

Eine der ersten Untersuchungen, die der Kombination von Nachweis- und Transportmedium galten, stammt von Czinn. Er transportierte die Biopsien von 25 Kindern in jeweils 0,2 ml einer harnstoffhaltigen Ureasetest-Bouillon ungekühlt zur Anzucht, allerdings nur dann, wenn ein Farbumschlag stattgefunden hatte. Damit schloß er von vornherein Infizierte mit falsch negativem Ureasetest aus. Die histologische Untersuchung diente als Referenzmethode. Acht Kinder hatten einen positiven Ureasetest, sieben davon innerhalb einer Stunde und einer nach 24 Stunden bei 37° C. Von diesen acht ließen sich in jedem Falle Erreger anzüchten, also selbst nach einem Tag Aufenthalt im 37° C warmen Nachweismedium. Da sein Nachweistest mit der Histologie als Referenzmethode eine 100 %ige Sensitivität aufwies, empfahl er diesen Test als vorzüglich mit dem zusätzlichen Vorteil, daß nach dem Schnelltest die Biopsie für Anzuchtzwecke weiterverwendbar sei (22). Diese Schlußfolgerung ist wegen des geringen Probenumfangs zwar gewagt, aber seine Ergebnisse lassen vermuten, daß ein mit Harnstoff versetztes Medium wenigsten den Anforderungen kürzerer Transportwege innerhalb eines Krankenhausgeländes genügen könnte.

Auch West interessierte der Einfluß von Harnstoff auf die Vitalität von *H. pylori*. Von der epidemiologischen Fragestellung nach dem Übertragungsmodus ausgehend, untersuchte er

das Überleben von drei Isolaten in NaCl-Lösungen ansteigender Molarität (0,05 M; 0,15 M; 0,6 M), in gepufferten NaCl-Lösungen unterschiedlicher Azidität sowie in physiologischer Kochsalzlösung mit 0,1 mM/l oder 5 mM/l Harnstoffzusatz (136). 5 mM/l Harnstoff liegt im Bereich der im Magen gemessenen Werte (1 bis 14 mM) (16). Er beobachtete wie andere Autoren auch, daß *H. pylori* in einer im Vergleich zu anderen Pathogenen großen pH-Spanne von 4,5 bis 9,0 einige Tage überleben kann. PH-Werte unter 4,5 tolerierte er nicht. Das geht mit den Ergebnissen von Clyne (16) konform. Clyne gab aber als höchsten pH-Wert 7,0 an. Das bedeutet, daß zumindest die Möglichkeit besteht, daß Wasser (natürlicherweise pH 3,0 bis 10,0) eine Übertragungsquelle darstellt.

Diese Schlußfolgerung interessiert weniger unter epidemiologischen Gesichtspunkten als vielmehr dahingehend, daß mit dem Umschlagbereich des Phenolrots (pH 6,5 bis 8,0) noch keine für den Erreger intolerablen Werte erreicht werden. Das läßt vermuten, daß bei sofortiger Entnahme der Biopsie nach beginnendem Farbumschlag und der Unterbrechung der pH-verändernden Reaktion durchaus mit dem Überleben des Erregers gerechnet werden könnte. Der Harnstoffzusatz von 0,1 mM/l bei West ließ die drei Stämme genauso lange leben wie in reiner NaCl-Lösung. Bei Zusatz von 5 mM/l Harnstoff überlebten zwei der drei Stämme nicht einen Tag. Einer dieser Stämme überlebte in NaCl-Lösung ebenfalls keinen Tag, der andere einen Tag. Der dritte Stamm überlebte genauso lange wie in NaCl-Lösung ohne Zusatz: zwei Tage. Trotz der dreifachen Wiederholung jedes Testansatzes seiner Studie ist eine Untersuchung von nur drei Isolaten, von denen eines in die Abbildungen gar nicht aufgenommen wurde, weil es *keinen* der verschiedenen Ansätze einen Tag überlebte, für unsere Fragestellung nicht ausreichend. Obwohl West im Grunde nur für *einen* Stamm feststellte, daß er durch 5 mM/l Harnstoffzusatz geschädigt wurde, faßte er zusammen, daß in neutraler, ungepufferter Kochsalzlösung das Überleben von *H. pylori* durch den Zusatz von Harnstoff in physiologischer Konzentration signifikant reduziert würde.

Clyne, die einen ureasepositiven Wildstamm und einen ureasenegativen Mutantenstamm, der also keinen Harnstoff umsetzen konnte, untersuchte und das Überleben bei verschiedenen pH-Werten mit oder ohne Zusatz von 10 mM Harnstoff eine Stunde nach Ansatz überprüfte, kam zu interessanten Ergebnissen. Ohne Harnstoff überlebten beide Isolate „gut“ (eine Stunde!) im pH-Bereich 4,5 bis 7,2. Bei Zusatz von Harnstoff vertrug der Wildstamm nur einen anfänglich niedrigen pH-Wert von 2,2. Bei höheren pH-Werten tolerierte dieser den Zusatz, anders als die Mutante, nicht. Die pH-Änderungen, die natürlich nur beim Wildstamm und Harnstoffzu-

satz zu erwarten waren, fanden sämtlich während der ersten zehn Minuten nach Ansatz statt. Der schnelle Anstieg führte dazu, daß der Wildstamm dem anfänglichen pH-Wert 2,2, den er normalerweise nicht toleriert, nur so kurzfristig ausgesetzt war, daß einige Erreger überleben konnten. Bei höheren pH-Werten als 2,2 führte derselbe rasche Anstieg aber zu einer Alkalisierung des Ansatzes, offenbar über den tolerierbaren pH-Wert 7,2 hinaus. Diese Resultate ließen sie vermuten, daß eine saure Umgebung für das Überleben des Erregers in Gegenwart von Harnstoff geradezu notwendig sei. Sie beobachtete ebenfalls, daß die Menge des beim Harnstoffabbau entstehenden Ammoniaks unter sauren und neutralen Bedingungen gleich war, und daß die Mutante selbst Ammoniakkonzentrationen von 85 mM gewachsen war (eine Stunde) und schlußfolgerte, daß nicht das entstehende Ammoniak toxisch sei, sondern der pH-Anstieg über 7,2 hinaus (16).

Die von uns verwendete gepufferte Thioglykolatbouillon liegt mit einem pH-Wert 7,1 nach diesen Erkenntnissen am oberen Rand des tolerierbaren pH-Bereichs, Portagerm pylori® (pH-Wert 6,3) deutlich innerhalb. Allerdings gilt, wie oben ausgeführt, dieser Bereich nur, wenn *kein* Harnstoff zugesetzt wird. Bei unseren beiden harnstoffhaltigen Varianten war der Erreger vermutlich also schon innerhalb kurzer Zeit einem viel zu alkalischen Milieu ausgesetzt. Das mag zu der geringen Rekultivierungsrate aus diesen beiden Medien beigetragen haben.

Nach Clynes Angabe läge der Umschlagbereich von Phenolrot (pH-Bereich 6,5 bis 8,0) zum Teil schon in für *H. pylori* toxischen Bereichen. Und auch der ideale pH-Wert der erregereigenen Urease pH-Wert 8,2 (86) läge im toxischen Bereich. Ein möglicher Ansatz künftiger Untersuchungen könnte daher der Einsatz eines Indikators mit niedrigerem Umschlagbereich sein und die Einstellung eines niedrigen pH-Wertes 2,2 in mit Harnstoff versetzten Transportmedien.

Während der letzten zwei bis drei Jahre wurden einige Studien veröffentlicht, deren Autoren ähnlich wie Czinn befanden, daß die im Schnelltest positiven Biopsien danach noch für die Klärung von Resistenzen zur Anzucht nutzbar seien (57, 109, 139).

So untersuchte Rautelin die Biopsien von 57 Patienten histologisch, im Schnelltest und kulturell. Er verglich die Anzuchterfolge für Stuart Transport Medium (STM) und einen harnstoffhaltigen Ureaseschnelltest (Jatrox, Procter & Gamble, Deutschland). Der Schnelltest wurde bei Raumtemperatur nach zwei Stunden beurteilt und innerhalb von weiteren zwei Stunden ungekühlt ins Labor gebracht. Bei 15 Patienten war die Anzucht jeweils von beiden Transportmedien erfolgreich, wobei in sechs Fällen der Harnstoffzusatz das Wachstum um

drei Tage verzögerte und auch spärlicher erscheinen ließ. Jedoch gab es keinen Fall, in dem die Anzuchtergebnisse qualitativ differierten (109). In zwei Fällen mit positivem Schnelltest und positiver Histologie blieb die Anzucht für beide Medien negativ. Dieses Versagen kann daher nicht dem Harnstoffzusatz angelastet werden. Die Sensitivität seiner Anzucht aus harnstoffhaltigem Schnelltest lag bei 88 % nach vier Stunden Transportdauer. Wir haben die Anzucht nach frühestens 24 Stunden vorgenommen, weil kein Gastroenterologe außerhalb eines Klinikgeländes solche kurzen Transportzeiten für die Biopsien gewährleisten kann. Rautelin selbst empfahl die Wiederholung dieser Versuche für längere Transportzeiten.

Ähnlich gute Erfahrungen mit dem Gebrauch des Schnelltests als Transportmedium machte Windsor. 141 im CLO-Test positive Biopsien schickte er zum Teil bei Umgebungstemperatur (105 mal), zum Teil bei 4° C (36 mal) zur Anzucht ins Labor. In 43 Fällen wurden parallel Biopsien in NaCl mitgeschickt. Die Sensitivität der Anzucht aus NaCl lag bei 100 %. Leider gab er hier nicht die Transportdauer an. Die Sensitivität der Anzucht aus dem CLO-Test war wie erwartet zeit- und temperaturabhängig. Anders als Rautelin (88 % Sensitivität bei Kultivierung innerhalb von vier Stunden) differenzierte er aber die Transportzeiten genauer und stellte einen signifikanten Abfall der Sensitivität fest, wenn die Inokulation statt innerhalb der ersten zwei Stunden (84 bis 93 %, Transport bei Umgebungstemperatur) erst zwischen zwei und vier Stunden (22 bis 35 %) nach CLO-Test-Ansatz erfolgte. Zusätzlich unterstützte die Tatsache, daß beim Transport in NaCl die Kolonien größer und üppiger sowie in 72 % der Kulturen zwei bis drei Tage früher erschienen, unsere Beobachtung, daß der Harnstoffzusatz die Vitalität des Erregers schon lange vor unserem ersten Testzeitpunkt von 24 Stunden entscheidend beeinträchtigt. Für die Anzucht nach zwei bis vier Stunden beobachtete er außerdem einen signifikanten Anstieg der Sensitivität, wenn der Transport bei 4° C durchgeführt wurde (70 bis 78 %) (139).

Diese Tendenzen wurden von Jaup bestätigt, der ebenfalls die Chancen einer Kultivierung anhand von vorher im Schnelltest positiven Biopsien untersuchte. Anders als Windsor beließ er die Biopsien nach dem Positivwerden des hauseigenen flüssigen Schnelltests (ungepuffert) nicht darin, sondern entnahm und transportierte sie in Portagerm pylori® innerhalb von vier bis fünf Stunden bei Raumtemperatur ins Labor. 118 der 260 Patienten hatten einen positiven Schnelltest, davon 117 innerhalb von einer Stunde. In 117 Fällen (Sensitivität 99,2 %) war aus der gleichen Biopsie eine Anzucht und anschließende Resistenztestung möglich (57).

Diese hohe Sensitivität entspricht etwa Windsors Ergebnis für eine Untergruppe, die maximal eine Stunde im harnstoffhaltigen - und damit zu alkalischen - Milieu verbrachte (93 %).

Diese beeindruckenden Daten, die wegen der geringeren Anzahl zu entnehmender Biopsien für eine mögliche Zeitersparnis sprechen, haben für den niedergelassenen Gastroenterologen und die Klinik unterschiedliche Relevanz:

Für den niedergelassenen Arzt sind die untersuchten Zeiten zu kurz und damit nicht praxisnah. Unter den Bedingungen eines Klinikums mit Mikrobiologielabor sollte auf den Einsatz einfacher Transportmedien nicht verzichtet werden. Stattdessen nur die im Schnelltest positiven Biopsien entweder in demselben Medium oder in einem Transportmedium wie Portagerm pylori[®] ohne Harnstoff zu transportieren, kann wegen der möglichen falsch negativen Resultate im Schnelltest nicht ohne weiteres empfohlen werden. In unserem Patientenkollektiv waren das 25 Patienten (Histologie oder Anzucht positiv), also 13,3 %.

Zusammenfassend läßt sich also für den Zusatz von Harnstoff zu einem Transportmedium oder zum Gebrauch eines Ureaseschnelltests als Transportmedium sagen, daß die vorliegenden Daten vermuten lassen, daß sich dieser Einsatz nur für höchstens zwei Stunden Transportzeit, bei 4° C etwas länger eignet. Die Untersuchungen von Clyne lassen zwar vermuten, daß größere zeitliche Verzögerungen bei für den Erreger günstigeren pH-Bedingungen im Medium möglich sein könnten. Die von uns getesteten Medien Portagerm pylori[®] und Thio-glykolatbouillon mit aufgeschichtetem Harnstoff bei 18° C eignen sich jedoch wegen der geringen Anzuchtrate nicht für den Postversand.

5.4.5. Einfluß der Kühlung von Transportmedien auf die Anzuchtrate

Wie es in den vorliegenden Ergebnissen dokumentiert wird, fördert eine Kühlung bei 4° C während des Transports die Ausbeute der Anzucht.

Bezerra entnahm jedem von 26 Patienten acht antrale Biopsien, von denen zwei histologisch untersucht wurden. Die restlichen sechs für Anzucht, Ureasetest und Ausstriche für mikroskopische Untersuchung wurden in „adäquaten“ Transportmedien, die er leider nicht näher beschrieb, bei Kühlschranktemperaturen transportiert. Die Sensitivität seiner Kultur lag wie bei uns unter der der Histologie und des Schnelltests (11). Er untersuchte die Korrelationen der diagnostischen Methoden, ohne dabei dem Einfluß der Temperatur beim Transport auf die

Sensitivitäten besondere Beachtung zu schenken. Daß er trotzdem während des Transports kühlte, zeigt vielleicht, wie wenig der damit verbundene positive Einfluß noch in Frage gestellt wird.

Anders als die im letzten Abschnitt besprochenen Auswirkungen von Harnstoff während des Transports wurde der Einfluß der Kühlung schon sehr früh in der *H.-pylori*-Forschung untersucht. 1985 untersuchte Goodwin an zehn Biopsien, die er jeweils teilte und eine Hälfte sofort kultivierte, die andere Hälfte bei 4° C unterschiedlich lange stehenließ, vor allem den Einfluß von Verzögerungen auf die Anzucht. Den größeren Teil seiner Studie, der 93 Biopsien umfaßte, ließ er ebenfalls bei 4° C transportieren und die Dauer des Transport jeweils festhalten. Das heißt, daß er keinen wirklichen Vergleich verschiedener Transporttemperaturen durchführte. Jedoch beobachtete er keinen signifikanten Unterschied der Wachstumsdichte zwischen sofortiger Kultivierung und nach bis zu fünfständigem Aufenthalt bei 4° C und empfahl daher diese Art des Transports (41). Als Medium nutzte er 2 ml isotone NaCl-Lösung mit 0,5 ml hypotoner 20 %iger Glukoselösung, um durch die Hypotonisierung eine befürchtete Auflösung der den Erreger bedeckenden Mukusschicht zu verhindern.

Bald wurde klar, daß sich mit komplexen Medien längere Transportzeiten überbrücken ließen. Glupczynski empfahl Stuart Transport Medium bei 15° C für Verzögerungen bis zu sechs Stunden, bei 4° C dagegen sogar für bis zu 48 Stunden (38).

Han untersuchte die Anzuchtsunterschiede bei Transporttemperaturen von 4° C, -20° C, -70° C und Raumtemperatur in verschiedenen Medien (Cystein-Albimi-Medium mit 20 % Glycerol, halbfette Milch mit 17 % Glycerol, Brucellabouillon mit 20 % Glycerol, Stuart Transport Medium und physiologische NaCl-Lösung) anhand der Biopsien von 16 Ulkuspatienten. Da er vor allem die Anlage eines für experimentelle Studien verfügbaren Grundstocks von *H.-pylori*-Isolaten im Sinn hatte, interessierten ihn Langzeitüberlebensraten nach einer, zwei, vier und zwölf Wochen. Nach einer Woche in Cystein-Albimi-Medium bei 4° C lebten noch 81 % (45). Bei uns lebten nach einer Woche in Portagerm pylori[®] bei 4° C noch knapp 3 %. Abgesehen von der Verschiedenheit der beiden Medien, ersparte er seinen Biopsien den täglichen O₂-Streß während der Entnahmeprozedur. Um diesen Einfluß vermeiden und trotzdem mindestens 50 Isolate testen zu können, wäre eine Versiebenfachung unseres materiellen Aufwandes nötig gewesen. Bei -20° C lebten bei Han nach einer Woche sogar noch alle der 16 untersuchten Stämme, nach weiteren acht Wochen immerhin noch 50 %. Ein anderer Versuch seiner Studie ergab anhand von zwei Laborisolaten für fünf verschiedene Medien, daß

mit sinkender Temperatur der Erfolg der Anzucht steigt. Das Überlebensverhalten ähnelte sich hierbei in den unterschiedlichen Medien bis auf NaCl-Lösung, in der bei -20°C und -70°C signifikant weniger lebende Erreger gezählt wurden. Eine Kühlung bei -20°C oder -70°C , zum Beispiel durch Transport der Biopsiebehälter in flüssigem Stickstoff, stellt also eine für längere Transportwege attraktive Variante dar, die auf der anderen Seite ungleich teurer ist als der Transport bei 4°C und erst recht als der ungekühlte Transport und damit höchstens im Rahmen von Studien bezahlbar sein dürfte.

Auch Kjöllers Ergebnisse von 1991 unterstützen die Empfehlung, während des Transports zu kühlen. Er verglich die Anzuchtergebnisse nach zweistündigem Transport in Stuart Transport Medium mit denen nach Transport in NaCl-Lösung, jeweils ohne Kühlung. Es zeigte sich kein Unterschied (jeweils 24 von 35 Biopsien positiv). In einem zweiten Versuch dauerte der ungekühlte Transport in NaCl wieder nur zwei Stunden, im nunmehr bei 4°C gekühlten Stuart Transport Medium dagegen 24 Stunden. Hierbei war die Anzucht nach dem längeren, aber gekühlten Transport sogar erfolgreicher (13 versus 12 positiv von 30 Biopsien) (63). Leider hat er nicht den Einfluß der Kühlung bei *gleicher* Transportzeit von zwei Stunden untersucht, was die Frage hätte klären können, ob sich die Kühlung bei kurzen Wegen überhaupt signifikant auswirkt.

Die Verwendung von mit Erregersuspension getränkten Wattestäbchen als Biopsiemodell, wie wir sie auch einsetzten, findet sich nur in einer Arbeit von Owen. Er untersuchte das Überleben in Stuart Transport Medium (STM), halbfestem „motility test medium“ (SMTM) und Brain Heart Infusion Medium (BHIM) bei 4°C , bei Raumtemperatur und einer Temperaturkombination (erster Tag bei 37°C , danach Raumtemperatur) nach zwei, drei, sieben, acht und zehn Tagen (103). Anders als Kjøller, der STM empfahl, konnte er keinen Erreger nach Aufenthalt in diesem Medium anzüchten. Es sei aber angemerkt, daß er auch nur zwei Laborisolate untersuchte. Im SMTM überlebten beide Stämme bei 4°C bis zu sieben Tagen, bei höheren Temperaturen maximal zwei Tage. Im BHIM überlebte ein Stamm acht Tage unabhängig von der Temperatur und zwei weitere Tage bei Raumtemperatur und 4°C . Der andere Stamm allerdings überlebte entgegen der anfänglichen Vermutung zehn Tage, wenn er den ersten Tag bei 37°C und die folgenden neun Tage bei Raumtemperatur gehalten wurde. Dieser Stamm überlebte bei 4°C nur drei Tage und bei Raumtemperatur sieben Tage. Er überlebte in BHIM also umso länger, je höheren Temperaturen er ausgesetzt war. Das ist jedoch ein selten beschriebener Ausgang. Der Artikel ist ein typisches Beispiel dafür, wie aus der

Untersuchung von sehr geringen Ansatzzahlen Schlüsse gezogen und Empfehlungen abgegeben werden.

Angesichts der zum Teil widersprüchlichen Empfehlungen zahlreicher Transportmedien stellte Roosendaal die interessante These in den Raum, daß die Anzucht aus Biopsien im Gegensatz zur Anzucht aus Erregersuspensionen nicht vom Transportmedium abhängt. Er untersuchte zuerst sechs Laborisolate und danach Biopsien von 33 Patienten. Die *Isolate* wurden in fünf verschiedene Medien (Brucellabouillon, gepufferte NaCl-Lösung, 20 % Glukose, Stuart Medium (SM), NaCl-Lösung mit Fildes-Extrakt) bei Raumtemperatur mit dem Ziel inokuliert, die beiden Medien mit den innerhalb von 24 Stunden am weitesten auseinanderfallenden Resultaten im zweiten Teil der Studie anhand von Biopsien zu testen. Fildes-Extrakt ist ein Zusatz für anspruchsvolle Mikroorganismen, wie zum Beispiel *Haemophilus influenzae*. Es handelt sich um mit Pepsin defibriniertes Pferdeblut und enthält Wachstumsfaktoren und Coenzyme (8). Den stärksten Vitalitätsverlust erlitten die Isolate im SM, dagegen praktisch keinen in Brucellabouillon und in gepufferter NaCl-Lösung mit Fildes-Extrakt. In NaCl-Lösung, dem einzigen Medium, in dem sich unsere Untersuchungen überschneiden, nahm die Vitalität, anders als bei uns als durchschnittliche Erregerkonzentration gemessen, schon nach fünf Stunden signifikant ab. Aber auch nach 24 Stunden waren noch Erreger anzüchtbar. Für den Transport von jeweils fünf *Biopsien* pro Patient verwendete Roosendaal im zweiten Teil seiner Studie dann die genannten drei Medien mit verschiedenen Transportzeiten und Temperaturen. Beim Vergleich der Anzuchtraten nach Aufenthalt in der „guten“ NaCl-Lösung mit Fildes-Extrakt und dem „schlechten“ SM zeigte sich *kein* signifikanter Unterschied (113). Das macht deutlich, wie sehr die Verwendung von Isolatens statt Biopsien ins Gewicht fallen kann.

Im Zusammenhang mit unserer Untersuchung sollte daher in einer weiteren Arbeit, die die beobachteten Tendenzen verfolgt, wenn möglich mit Biopsien gearbeitet werden.

Roosendaal schlußfolgerte, daß das Überleben von *H.-pylori*-Isolaten in Suspensionen bei Raumtemperatur sehr stark vom Medium abhängt, eine Beobachtung, die wir ebenfalls gemacht haben. Für die Primäranzucht aus Biopsien ist nach seiner Ansicht dagegen die Verhinderung der Austrocknung die vordringliche Aufgabe des Transportmediums, die von seinen drei getesteten Medien gleich gut erfüllt wurde. Zu diesem Schluß kam er aufgrund der Beobachtung, daß SM und NaCl-Lösung mit Fildes, die sich beim Transport von Isolatens einmal verheerend (SM) und einmal günstig (NaCl) auswirkten, beim Transport von Biopsien

gleich gute Dienste leisteten. Diese Schlußfolgerung aus dem Verhalten von nur zwei Transportmedien zu ziehen, erscheint jedoch nicht zulässig. Die Kühlung der Biopsien auf Eis innerhalb von fünf Stunden (Brucellabouillon) war hinsichtlich des Anzuchterfolges genauso erfolgreich wie der fünfstündige Transport bei Raumtemperatur (NaCl-Lösung mit Fildes): in jeweils 19 Fällen. Einen 24-stündigen Transport auf Eis untersuchte Roosendaal nicht. 24 Stunden bei Raumtemperatur führten bei Aufenthalt in NaCl-Lösung mit Fildes 18 mal zur Anzucht und einmal zur Kontamination, bei Aufenthalt in SM 16 mal zur Anzucht und ebenfalls einmal zur Kontamination. Die Anzuchtrate war demnach nicht signifikant geringer als nach fünfstündigem gekühlten Transport. Um der stärkeren Kontamination nach 24 Stunden entgegenzuwirken, empfahl er abschließend den Einsatz eines nährstofffreien Mediums wie Kochsalzlösung, weil er vorher gezeigt zu haben meinte, daß die Verhinderung der Austrocknung an erster Stelle stehe. Dahinter verbirgt sich allerdings ein etwas vorschneller Schluß, da er den Transport von *Biopsien* in NaCl-Lösung gar nicht getestet hat. In der Empfehlung von NaCl stimmt so auch nur mit Veenendaal mit ihm überein (129).

Nichtsdestotrotz kann die Beantwortung unserer Hauptfrage, ob die getesteten Medien sich für den Postversand von *Biopsien* eignen, im Lichte von Roosendaals Ergebnissen nur eingeschränkt erfolgen, da wir mit *Isolaten* arbeiteten.

Anders als Roosendaal beobachtete Soltesz eine Steigerung der Anzuchtraten durch die Kühlung. Er untersuchte sieben Isolate bei 4° C, 10° C, 15° C, 20° C und 30° C nach sechs, 24 und 48 Stunden. Bei Verzögerungen bis zu sechs Stunden und Aufenthalt in Stuart Medium (SM) tolerierten die Isolate Temperaturen bis 20° C, zeigten bei tieferen Temperaturen aber üppigeres Wachstum. Bei Aufenthalt in NaCl hingegen wurde das spärlichere Wachstum schon ab 10° C und aufwärts deutlich. 20° C tolerierten nur noch drei der sieben Isolate. Nach einem Tag Aufenthalt in SM zeigten die meisten Isolate das stärkste Wachstum wieder bei 4° C, das gleiche bei Aufenthalt in NaCl. Das gleiche Bild bot sich nach zwei Tagen (122).

Um das Übergewicht derjenigen, die eine Kühlung propagieren, noch deutlicher zu machen, seien noch Meunier und Mégraud zitiert: Meunier testete in der ersten Phase seiner Studie 57 Biopsien, die er unter „unkontrollierten“ Bedingungen ungekühlt ins Labor transportierte. „Unkontrolliert“ bedeutete, daß sie unvollständig oder nicht permanent vom Serum, das als Transportmedium diente, umschlossen waren. Die Sensitivität der Anzucht erreichte 59 %. In der zweiten Phase wurden 56 Biopsien, die ständig von Serum umgeben waren und deren

Behälter auf Eis transportiert wurden, zum Labor gebracht. Die Sensitivität stieg auf 84 % (91). Leider hat diese Arbeit den Fehler, daß nicht systematisch hinterfragt wurde, welche Veränderung den Sensitivitätsanstieg verursachte.

Mégraud empfahl für Transportzeiten bis zu vier Stunden gekühltes NaCl (4° C), bei Verzögerungen bis zu 24 Stunden komplexe Medien wie Portagerm pylori[®], ebenfalls bei 4° C (90). In unserer Studie verglichen wir Portagerm pylori[®] bei Raumtemperatur mit Portagerm pylori[®] bei 4° C. Die Anzuchtraten sind für die gekühlte Variante mit 66 % versus 57 % deutlich besser. Für die Nutzung als Transportmedium sind aber auch eine 66 %ige und erst recht 56 %ige Anzuchtrate nach zwei Tagen zu wenig. Heep erreichte deutlich bessere Anzuchtraten, allerdings für Biopsien. Andere Autoren erzielten mit anderen Medien (wie zum Beispiel Stuart Transport Medium) ebenfalls bessere Anzuchtraten. Woran könnte das liegen?

An erster Stelle ist sicher der Problempunkt unserer Methode zu sehen, die verlangte, die Watteträger jeden Tag zu entnehmen, auszustreichen und wieder zurückzustecken. Dabei wurde der mikroaerophile Erreger jedesmal einer sauerstoffreichen Atmosphäre ausgesetzt. Hätten wir die Methode so verändert, daß der Reaktivierungsversuch nach einem, zwei und so weiter bis einschließlich sieben Tagen an solchen Ansätzen hätte erfolgen können, die nach der Inokulation nicht wieder geöffnet worden wären, dann hätten wir statt 68 Portagerm-pylori[®]-Behältern 476 gebraucht, ebenso viele für den 4° C-Ansatz und für den Ansatz mit Harnstoff. Da wir das Portagerm pylori[®] von der Firma bioMérieux freundlicherweise zur Verfügung gestellt bekamen, waren Versuche in solchen Größenordnungen nicht realisierbar. Es gilt aber zu bedenken, daß unter realen Bedingungen, unter denen die Biopsien bis zu ihrer Kultivierung ungestört im luftdicht verschlossenen Behälter verbleiben, der Anzucherfolg auch bei 4° C größer wäre.

Ein weiterer Angriffspunkt unserer Methodik ist die Verwendung von Isolaten. Daher sollten die Versuche mit Biopsien wiederholt werden.

Abschließend läßt sich in bezug auf Portagerm pylori[®] bei 4° C festhalten, daß unbedingt weitere Untersuchungen mit Biopsien erfolgen sollten, die das Überleben von H. pylori nach ein bis vier Tagen dokumentieren. Unsere Ergebnisse wurden zwar systematisch und mit einer statistisch analysierbaren Menge von H.-pylori-Isolaten durchgeführt, können aber mit den in der Literatur vorliegenden spärlichen Daten nicht vernünftig verglichen werden. Nichtsdestotrotz kann durch die Dokumentation unserer Resultate die besondere Eignung

eines bestimmten Mediums für den Transport von Biopsien auf dem Postweg zwar nicht eindeutig unterstützt, jedoch ebensowenig vollkommen ausgeschlossen werden.