

### **3. Materialien und Methoden**

#### **3.1. Patienten**

Vom März bis Oktober 1997 wurden 195 aufeinanderfolgende Patienten in die Studie aufgenommen, die sich wegen dyspeptischer Symptome einer Ösophagogastroduodenoskopie unterzogen. 112 von diesen waren Patienten der gastroenterologischen Abteilung des Virchow-Klinikums der Charité, die anderen 83 wurden in einer gastroenterologischen Praxis (MR Dr. med. G. Rogalla, Florastraße 44, 13187 Berlin) betreut. Bis auf die Ablehnung durch den Patienten selbst und eine bekannte HIV-Infektion gab es keine Ausschlußkriterien. Alle Patienten wurden, bevor sie ihre Teilnahme zusagten, über das Ziel der Studie aufgeklärt, die zuvor von der Ethikkommission des Virchow-Klinikums bewilligt worden war.

#### **3.2. Biopsien**

Während der Gastroskopie wurden von jedem Patienten zwei Biopsien (einmal Antrum, einmal Korpus) für die histologische Begutachtung entnommen.

Bei 112 Patienten wurden zusätzlich zwei Biopsien (einmal Antrum, einmal Korpus) für den Ureaseschnelltest Jatrox<sup>®</sup> (C.H.R. Heim Arzneimittel GmbH, Darmstadt, Deutschland), bei 83 anderen Patienten für den vergleichbaren HUT-Test<sup>®</sup> (HUT=H.-pylori-Urease-Test) (Astra, Wedel, Deutschland) nur eine Antrumbiopsie entnommen.

Außer für die Pathologie und einen Schnelltest vor Ort wurden Proben zum Transport in das mikrobiologische Labor wie folgt entnommen:

Von 87 Patienten wurden je zwei Biopsien (einmal Antrum, einmal Korpus) gemeinsam in das halbfeste Transportmedium Portagerm pylori<sup>®</sup> (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) gegeben.

Bei 25 anderen Patienten wurden stattdessen je zwei Biopsien (einmal Antrum, einmal Korpus) für den gemeinsamen Transport in einem verschließbaren Transportröhrchen entnommen, das mit 10 ml Thioglykolatbouillon (Difco, Augsburg, Deutschland) gefüllt war.

Von jedem der verbliebenen 83 Patienten wurden sowohl für den Transport im Portagerm-pylori<sup>®</sup>-Medium zwei Biopsien (einmal Antrum, einmal Korpus) als auch für den Transport in Thioglykolatbouillon je zwei Biopsien (einmal Antrum, einmal Korpus) entnommen (Tab. 5).

Tab. 5: Übersicht über die Anzahl, den Entnahmeort und die Nutzung von Biopsien im Rahmen der Endoskopie bei insgesamt 195 Patienten

Anzahl der Patienten (von insgesamt 195)	Zweck der Entnahme	Ort der Entnahme	Anzahl der Biopsien
190	Histologie	Antrum und Korpus	2
112	Jatrox-Test	Antrum und Korpus	2
83	HUT-Test	Antrum	1
170	Transport in Portagerm pylori	Antrum und Korpus	2
108	Transport in Thiogly- kolatbouillon	Antrum und Korpus	2

Ein Patient wurde als H.-pylori-infiziert angesehen, wenn er in mindestens einem der Tests (Schnelltest, Histologie, Kultur) ein positives Resultat zeigte. Als nicht infiziert galt derjenige mit ausschließlich negativen Testergebnissen.

### 3.3. Ureasetest im Endoskopieraum

Der Ureasetest Jatrox (im Klinikum) und der HUT-Test (bei Dr. Rogalla) wurden zur direkten Suche nach einer Ureaseaktivität der Biopsien eingesetzt. Beide Tests basieren auf dem gleichen Prinzip: Das Testsubstrat enthält Harnstoff, der von Urease hydrolysiert wird. Dadurch entsteht Ammoniak, dessen Anreicherung zum pH-Anstieg führt. Dieser Vorgang wird mit Hilfe des ebenfalls enthaltenen Indikators Phenolrot sichtbar gemacht. Das Ablesen erfolgte unmittelbar nach der endoskopischen Untersuchung, nach einer, zwei und 24 Stunden. Der Farbumschlag von Gelb nach Pink bedeutete ein positives Ergebnis, ein fehlender Farbumschlag nach 24 Stunden wurde als negativ gewertet.

### 3.4. Histologische Untersuchung der Biopsien

Die jeweils zwei Biopsien für die Pathologie wurden sofort nach Entnahme in phosphatgepuffertem Formalin fixiert und transportiert. Die in der Klinik entnommenen Proben wurden vom Pathologielabor des Virchow-Klinikums untersucht, die in der Praxis von Dr. Rogalla entnommenen Proben untersuchte Prof. Dr. sc. med. P. Buntrock, Wörther Straße 15, 10405 Berlin. Im Virchow-Klinikum wurde die Methylenblaufärbung verwendet, bei Prof. Buntrock die Giemsa-Färbung. In beiden Fällen wurden die Schnitte der in Paraffin gebetteten Gewebe-

stücke nach morphologischen Erscheinungen im Rahmen der Gastritisdiagnostik als auch nach dem Vorkommen von *H. pylori* untersucht.

### **3.5. Mikrobiologische Untersuchung der Biopsien**

#### **3.5.1. Transportbedingungen und -medien**

Die zur Kultivierung von *H. pylori* entnommenen Biopsien wurden teilweise in gelartigem Portagerm-pylori<sup>®</sup>-Transportmedium und teilweise in flüssiger Thioglykolatbouillon bei Raumtemperatur aufbewahrt, innerhalb von maximal sechs Stunden nach Entnahme in das mikrobiologische Labor des Virchow-Klinikums transportiert und sofort weiterverarbeitet.

Die Thioglykolatbouillon und das Portagerm-pylori<sup>®</sup>-Medium hatten zum Zeitpunkt der Biopsieeinbringung immer Raumtemperatur. Nach Biopsieeinbringung lagerten beide Medien bis zum Transport bei Raumtemperatur.

Die Thioglykolatbouillon war zum Zeitpunkt der Biopsieeinbringung nie älter als zwei Wochen und wurde nach Bedarf vom mikrobiologischen Labor des Virchow-Klinikums hergestellt.

#### **3.5.2. Mikrobiologische Verarbeitung der Biopsien**

Die Biopsien wurden auf Columbia-Kochblutagarplatten mit Skirrow-Supplement (Oxoid, Wesel, Deutschland) und 2 mg/l Amphotericin B (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) ausgeimpft. Dazu wurde jede Biopsie einzeln mit Hilfe einer sterilen Glaspipette angesaugt, auf jeweils eine Platte inokuliert und mit einem sterilen Drigalskispatel zerrieben.

Die Platten wurden fünf Tage bei 37° C in mikroaerober Atmosphäre (84 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 6 % O<sub>2</sub>) inkubiert. Zur Gewährleistung dieser Atmosphäre wurden Anaerocult C<sup>®</sup>-Beutel (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Die Ansätze wurden nach fünf Tagen auf Wachstum inspiziert.

### 3.5.3. Identifizierung, Subkultivierung, Langzeitkonservierung

Der Befund „Anzucht positiv“ wurde gestellt, wenn nach fünf Tagen Inkubation auf der Platte transparente, glänzende, im Durchmesser etwa 1 mm große Kolonien imponierten, die ureasepositiv, katalasepositiv sowie oxidasepositiv waren und sich im Grampräparat als gramnegative Stäbchen darstellten.

War nach fünf Tagen kein Wachstum sichtbar, wurde der Befund „Anzucht negativ“ gestellt. Bei positivem Befund erfolgte anschließend eine doppelte Subkultivierung, um genügend Bakterienmaterial für die Langzeitkonservierung zu gewinnen. Hierfür wurde das Bakterienmaterial mit einem Spezialtupfer (Transwab<sup>®</sup>-Transportmedium, Mast Diagnostica, Großbritannien) aufgenommen und bei -70° C eingefroren.

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden diese Tupfer im Wasserbad bei 35° C eine halbe Stunde aufgetaut und dann auf Columbia-Kochblutagarplatten mit Skirrow-Supplement und Amphotericin B ausgestrichen und drei Tage wie oben beschrieben inkubiert.

### 3.6. Evaluation einer Erregerkonzentration, bei der die Ureasereaktion makroskopisch noch erkennbar ist

Von elf Stämmen wurde das Bakterienmaterial je einer Columbia-Kochblutagarplatte mit einem sterilen Watteträger in jeweils 2 ml steriler physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert und die Suspension auf dem Laborschüttler durchmischt. Der Trübungsgrad dieser Suspension wurde nach McFarland (standardisierte BaSO<sub>4</sub>-Trübungsreihe zur Trübungsbestimmung von Bakteriensuspensionen (Tab. 6)) durch makroskopischen Vergleich festgehalten.

Tab. 6: McFarland-Skala und entsprechende Zusammensetzung der Vergleichslösungen (7)

Trübungsgrad nach McFarland	10 ml der Vergleichslösung bestehen aus	
	1 %iger BaCl <sub>2</sub> -Lösung	und 1 %iger H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Lösung
1	0,1 ml	9,9 ml
2	0,2 ml	9,8 ml
3	0,3 ml	9,7 ml
4	0,4 ml	9,6 ml
5	0,5 ml	9,5 ml

### 3.6.1. Bestimmung der Erregerkonzentration der hergestellten Suspensionen

Vor dem Versuch wurden für jeden der zu untersuchenden elf Stämme als Doppelansatz zwei mal fünf Verdünnungsröhrchen mit jeweils 0,9 ml steriler NaCl-Lösung (0,9 %ig) gefüllt.

Vor jedem Gebrauch der eingangs hergestellten Suspension wurde diese immer wieder auf dem Schüttler durchmischt.

Nun wurden in die jeweils ersten Röhrchen der beiden Ansätze 0,1 ml der gut durchmischten Erreger-NaCl-Suspension pipettiert. Aus der entstandenen Verdünnung wurden jeweils 0,1 ml abgenommen und in das nächste Röhrchen übertragen, bis beide Verdünnungsreihen vollständig waren.

Im folgenden wurden aus jedem Röhrchen einer Verdünnungsreihe sowie aus der unverdünnten Suspension je 25 µl auf eine gemeinsame Platte mit Columbia-Kochblutagar pipettiert. Dabei wurden jeweils sechs 25 µl-Portionen auf eine Platte ausgeimpft und auf waagerechter Fläche getrocknet, um ein Ineinanderverlaufen zu verhindern.

Die Platten wurden anschließend bei 37° C in mikroaerober Umgebung drei Tage inkubiert. Danach erfolgte das Auszählen der koloniebildenden Einheiten (=KBE) desjenigen Feldes, das zwischen 30 und 300 Kolonien aufwies, die Bildung eines Mittelwertes aus den Ergebnissen beider Verdünnungsreihen und die Berechnung der Erregerkonzentration in der unter 3.6. hergestellten Erreger-NaCl-Suspension für jeden der elf Stämme.

Auf diese Weise entstand für jeden untersuchten Stamm ein Wertepaar aus Trübungsgrad nach McFarland und Erregerkonzentration der Erreger-NaCl-Suspension.

### 3.6.2. Bestimmung derjenigen Erregerkonzentration, bei der der Ureasetest innerhalb einer festgesetzten Zeit als eben positiv erkennbar ist

Wie unter 3.6.1. wurden vor dem Versuch für jeden der elf zu untersuchenden Stämme als Doppelansatz zwei mal fünf Rundküvetten (Fa. LKB, Bromma, Schweden) mit jeweils 0,9 ml Blake-Christensen-Harnstoff (enthält alkoholische Phenolrotlösung 0,1 %, Merck, Darmstadt, Deutschland) gefüllt. In die jeweils erste Küvette beider Ansätze wurden 0,1 ml der anfangs unter 3.6. hergestellten und auf dem Schüttler gut durchgemischten Erreger-NaCl-Suspension pipettiert. Aus der entstandenen Verdünnung wurden jeweils 0,1 ml abgenommen und in die

nachfolgende Küvette übertragen, bis im Doppelansatz je fünf verschiedene Konzentrationen des Erregers in Blake-Christensen-Harnstoff vorlagen.

Diesen zehn Küvetten wurde eine nur mit Blake-Christensen-Harnstoff gefüllte Küvette als Negativkontrolle vorangestellt.

Von diesem Doppelansatz einer fünffachen Verdünnungsreihe wurde sofort (=0), nach 10, 20, 30, 60, 120 Minuten und 24 Stunden im Photometer (Ultralab Calculating Absorptionsmeter, LKB, Bromma, Schweden) bei 546 nm die Extinktion jeder Küvette gemessen.

Aus beiden Ansätzen ergaben sich also fünf Mittelwerte der Extinktionen für jeden Stamm in Abhängigkeit von fünf verschiedenen Konzentrationen und der Zeit.

### 3.6.3. Bestimmung des Extinktionswertes, der dem makroskopisch erkennbaren Farbumschlag des Ureasetests entspricht

Während des Versuches 3.6.2. wurde durch fortwährenden Vergleich von Extinktionen und der zugehörigen Färbung der Küvetten ein Extinktionswert ermittelt, der den makroskopisch erkennbaren Umschlagpunkt des Ureasetests mit Blake-Christensen-Harnstoff repräsentiert.

## 3.7. Überlebensversuche in verschiedenen Medien

### 3.7.1. Ansetzen der Medien

Folgende Medien wurden als Transportmedien untersucht:

1. Physiologische Kochsalzlösung (2 ml im Plastschraubröhrchen) bei Raumtemperatur,
2. Thioglykolatbouillon (Oxoid, Wesel, Deutschland) (9 ml im Plastschraubröhrchen) bei Raumtemperatur,  
 Zusammensetzung in g/l: Hefeextrakt 5,0; Trypton 15,0; Glucose 5,5; Natriumthioglykolat 0,5; NaCl 2,5; L-Cystin 0,5; Resazurin 0,001; Agar 0,5,
3. Mischung aus 9 ml Thioglykolatbouillon und 2 ml Blake-Christensen-Harnstoff bei Raumtemperatur,  
 Zusammensetzung des Blake-Christensen-Harnstoffs für 2000 ml Aqua dest.:  
 Pepton aus Fleisch 2,0 g; NaCl 10,0 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,0 g; 4-normale NaOH-Lösung 4,5 ml; D-Glucose 2 g; Harnstoff 40 g; alkoholische Phenolrotlösung 0,1 % 24 ml,

4. Portagerm-pylori<sup>®</sup>-Transportmedium (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) bei Raumtemperatur,
5. Portagerm-pylori<sup>®</sup>-Transportmedium bei 4° C,
6. Portagerm-pylori<sup>®</sup>-Transportmedium, dem unter sterilen Bedingungen 0,5 ml Blake-Christensen-Harnstoff aufpipettiert wurden, bei Raumtemperatur.

Von 68 Stämmen wurde das Bakterienmaterial von je zwei Columbia-Kochblutagarplatten mit einem sterilen Watteträger in ein Reagenzglas mit 2 ml 37° C warmer Brucellabouillon (Difco, Augsburg, Deutschland) eingerührt. Aus dieser Suspension, die auf dem Schüttler gemischt wurde, wurden jeweils 0,11 ml in sechs Verdünnungsröhrchen pipettiert. (0,11 ml entspricht dem Volumen, das ein Watteträger restlos aufsaugen konnte.) Jeweils ein steriler Watteträger wurde mit der Suspension aus einem Verdünnungsröhrchen getränkt. Drei der Watteträger wurden vorher mit sterilen Handschuhen und abgeflammter Schere auf etwa 2 cm gekürzt, damit die kleinen Behälter des Portagerm-pylori<sup>®</sup>-Mediums wieder zugeschraubt werden konnten. Anschließend wurden die oben aufgeführten Medien mit jeweils einem getränkten Watteträger bestückt. Dabei wurden für die drei Portagerm-pylori<sup>®</sup>-Behälter die drei gekürzten Watteträger verwendet. Alle Behälter wurden verschlossen und bis auf das vorgekühlte Portagerm-pylori<sup>®</sup>-Medium, das auch mit Watteträger bei 4° C gelagert wurde, bei Raumtemperatur stehengelassen.

### 3.7.2. Bestimmung der Zeitdauer bis zum Umschlag des Ureasetests in den beiden mit Harnstoff modifizierten Medien

Sobald die harnstoffhaltigen Medien „Mischung aus Thioglykolatbouillon und Harnstoff“ sowie „Portagerm pylori<sup>®</sup> mit Harnstoff“ mit Watteträgern bestückt waren, wurde dokumentiert, ob und wann ein Farbumschlag des Indikators innerhalb von 24 Stunden vorhandene Urease nachwies. Dabei wurde speziell die unmittelbare Umgebung des Tupfers im Medium beobachtet, weil dort der Farbumschlag zuerst zu erkennen war. Ohne Urease blieb das erste Medium orange, das zweite blaßgelb. Als positiv wurde der Nachweis in beiden Medien beim Auftreten einer Pinkfärbung angesehen.

### 3.7.3. Bestimmung der Erregerkonzentration in der unter 3.7.1. hergestellten Erreger-Brucellabouillon-Suspension

Die unter 3.7.1. beschriebene Prozedur mußte zügig vonstatten gehen, da mit der anfangs hergestellten Erreger-Brucellabouillon-Suspension (die unterdessen bei 35° C gehalten wurde) weitergearbeitet wurde.

Nun wurde analog zum Vorgehen unter 3.6.1., ausgehend von der unter 3.7.1. für jeden der 68 Stämme hergestellten Originalsuspension, eine Verdünnungsreihe im Doppelansatz hergestellt, allerdings unter Verwendung der Erreger-Brucellabouillon-Suspension anstelle der Erreger-NaCl-Suspension. Auf diese Weise wurde die Konzentration der Suspension festgestellt, mit welcher die Watteträger unter 3.7.1. getränkt worden waren.

### 3.7.4. Untersuchung der Überlebensrate von 68 Stämmen in sechs verschiedenen Medien

Nachdem die Medien mit getränkten Watteträgern bestückt waren, wurde alle 24 Stunden über sieben Tage jeder Tupfer entnommen, auf jeweils eine Columbia-Kochblutagarplatte ausgestrichen und zur weiteren Inkubation in sein Medium zurückgegeben.

Die Entnahme und das Ausstreichen der drei gekürzten Watteträger erfolgte mit steriler Pinzette, die der ungekürzten Watteträger mit sterilen Handschuhen.

Die Platten wurden bei 37° C in mikroaerober Atmosphäre inkubiert. Nach vier Tagen wurde das Wachstum makroskopisch und mittels Ureasetest (Blake-Christensen-Harnstoff) wie unter 3.5.3. beschrieben beurteilt.