

Aus dem Labor Dres. Fenner und Partner, Institut für
Klinische Chemie und Mikrobiologie und dem
Zentrum für Klinische Experimentelle Tumor Diagnostik
und Therapie, Hamburg. Direktor: Prof. Dr. med. R. Klapdor

**Evaluation eines neu entwickelten Westernblots
zur Erkennung von IgG-Serumantikörpern
gegen *Helicobacter pylori***

Auswertung, Gütekriterien und mögliche Pathogenitätsfaktoren

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Katja Lippmann
aus Reutlingen

Hamburg, 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 11.09.2003

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. B. Fleischer
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: PD Dr. J. Ch. Brümmer
Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: PD Dr. A. de Weerth

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung

1.1 Klinische Bedeutung von <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2 Wichtige Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i>	3
1.3 Diagnostische Möglichkeiten einer <i>H. pylori</i> -Infektion	5
1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit	7

2 Material

2.1 Patientenkollektiv	8
2.2 Datenerhebung	10
2.3 Untersuchungsmaterial	11

3 Methoden

3.1 Untersuchungsablauf	12
3.2 Durchführung der etablierten <i>Helicobacter pylori</i> -Diagnostik	13
3.3 Prinzip des Westernblots	15
3.4 Herstellung und Gewinnung des <i>H. pylori</i> -Antigenmaterials	17
3.5 Herstellung des <i>Helicobacter pylori</i> -Westernblots	18
3.5.1 Reagenzien	18
3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
3.5.3 Proteintransfer auf Nitrocellulose	26
3.6 Immundetektion	27
3.7 Auswertung des Westernblots	29
3.7.1 Ablesen der immunreaktiven Proteinbanden auf dem Westernblot	29
3.7.2 Statistik	31
3.8 Untersuchung der Proteinbande CagA auf dem Westernblot	32

4 Ergebnisse

4.1 Analyse des Patientenkollektives	34
4.2 Evaluierung des <i>Helicobacter pylori</i> -Westernblots	43
4.2.1 Identifizierung <i>H. pylori</i> -eigener Proteine auf dem Westernblot mit Hilfe spezifischer Antikörper	43
4.2.2 Identifizierung aller immunreaktiven Proteinbanden auf dem Westernblot	45
4.2.3 Statistische Auswertung des Westernblots	47
4.2.4 Zusammenfassung der Evaluierungsergebnisse	57
4.3 Vergleich des Westernblots mit einem kommerziellen ELISA	58
4.4 Bestätigung der Proteinbande CagA als Pathogenitätsfaktor	59

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Evaluierungsergebnisse	62
5.2 Einfluss der Methodik auf die Ergebnisse	67
5.3 Eignung des Westernblots zur Erkennung von Pathogenitätsfaktoren	70
5.4 Indikationen und Grenzen unseres <i>H. pylori</i> Westernblots	72
5.5 Perspektiven	74

6 Zusammenfassung

75

7 Literaturverzeichnis

76

8 Anhang

Fragebogen Diagnostik und Befunde der <i>Helicobacter pylori</i> -Evaluation	81
Fragebogen an Patienten vor einer Magenspiegelung	82
Proteinbandenintensitäten auf Westernblots <i>H. pylori</i> -positiver Patienten	83
Proteinbandenintensitäten auf Westernblots <i>H. pylori</i> -negativer Patienten	84

9 Danksagung

85

10 Lebenslauf

86

11 Erklärung

87

1 EINLEITUNG

1.1 Klinische Bedeutung von *Helicobacter pylori*

***H. pylori*-assoziierte Erkrankungen**

Die Revolutionierung der Theorie der Pathogenese von Erkrankungen des Magens und des Duodenums begann 1983 mit der Entdeckung von *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) durch die australischen Forscher Marshall und Warren. Sie assoziierten erstmals die aktive chronische Gastritis und peptische Ulzera mit einer bakteriellen Besiedelung der Magenschleimhaut und kultivierten den Erreger - damals als *Campylobacter pyloridis* bezeichnet - aus Antrumbiopsien infizierter Patienten [33, 55].

Inzwischen ist die Bedeutung von *H. pylori* als ätiopathogenetischer Cofaktor nicht nur bei der Entstehung der aktiven chronischen Gastritis und der Ulcera ventriculi et duodeni gesichert, sondern auch sein Zusammenhang mit dem Adenokarzinom des Magens und dem MALT-Lymphom (MALT= mucosa-associated lymphoid tissue) allgemein anerkannt [7, 8, 42, 54, 58].

Epidemiologie

H. pylori ist ein weltweit in der Humanpopulation verbreitetes Bakterium, dessen Prozentsatz der Prävalenz in Industrieländern in etwa dem Durchschnittsalter der Untersuchten in Jahren entspricht, d.h. bei 50-Jährigen entspricht die Prävalenz 50%. In Entwicklungsländern sind bereits bis zu 80% der 20-Jährigen durchseucht. Die Infektion mit *H. pylori* erfolgt meist im Kindesalter direkt von Mensch zu Mensch ohne Geschlechtspräferenz und persistiert in der Regel ohne adäquate Therapie lebenslang. Niedriger sozioökonomischer Status, Kinderreichtum und enge Wohnverhältnisse gelten als gesicherte Risikofaktoren. Die Reinfektionsrate nach einer erfolgreichen Eradikationstherapie liegt im Erwachsenenalter unter 1,5% [25].

Pathogenese

Im Selbstversuch von Marshall et al. führte die orale Ingestion von *H. pylori* zur akuten oder chronischen Gastritis [34]. Die Besiedelung der Magenschleimhaut mit *H. pylori* induziert histologisch betrachtet stets eine lokale Entzündungsreaktion und eine systemische humorale Immunantwort [8]. Das Bakterium aus der Gruppe der gramnegativen gekrümmten Stäbchen nistet sich felderförmig bevorzugt auf der Antrumschleimhaut überdeckt von Mucus ein, so dass es vor dem bakteriziden Magensaft geschützt wird [33].

Das Spektrum der durch *H. pylori* induzierten aktiven chronischen Gastritis (B-Gastritis) reicht von einer asymptomatischen, klinisch irrelevanten minimalen Infiltration der Lamina propria bis hin zu schwersten Entzündungen mit der Bildung von Mikroabszessen und reaktiven Zellatypien [14]. Eine schwere Antrumgastritis mit konsekutiver Hyperazidität des Magens erhöht das Risiko für die Entstehung von Ulcera duodeni. Kommt es dagegen infolge einer zusätzlichen schweren Corpusgastritis mit zunehmender Atrophie und intestinaler Metaplasie zur Hypochlorhydrie, so steigt das Risiko für ein Magenkarzinom [24]. Die Ursachen für diese enorme pathogenetische Variabilität sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Es werden sowohl stammspezifische Unterschiede der Erreger bezüglich bestimmter Pathogenitätsfaktoren, als auch komplexe Reaktionen des Wirtes auf die Infektion vermutet. Diskutiert wird auch ein Zusammenhang mit antigastrischen Autoimmunprozessen [24].

1.2 Wichtige Virulenzfaktoren von *H. pylori*

Helicobacter pylori hat eine Reihe von Virulenzfaktoren entwickelt, die ihm die Kolonisation, Persistenz und Gewebsschädigung im Magen als ökologische Nische ermöglichen, während das saure Milieu für fast alle anderen Bakterien keine Überlebenschance bietet.

Eines der markantesten Merkmale von *H. pylori* ist die Bildung großer Mengen von Urease, ein Enzym, das die Spaltung von Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxid katalysiert. Indem sich das Bakterium mit einer Wolke von Ammoniak umgibt, kann es die bakterizide Säure des Magensaftes neutralisieren [35]. Das Molekül der für die Kolonisation von *H. pylori* absolut essentiellen Urease besteht aus den zwei Unter-einheiten UreA (30 kDa) und UreB (64 kDa) [52].

Mit Hilfe seiner Geißeln (Flagellen) erreicht *H. pylori* eine außergewöhnlich hohe Motilität, die ihm die Fortbewegung auch in dem viskösen Mucus der Magenschleimhaut ermöglicht. Diese Eigenschaft ist für die Persistenz der Bakterien essentiell. Die für *Helicobacter* Spezies typische Flagellenhülle (flagellar sheath) scheint die säurelabilen Filamente der Geißeln vor dem Einfluss der Magensäure zu schützen [49, 50]. Eines der flagellar sheath-Proteine mit 29 kDa (HpaA) wurde genauer untersucht und als Hämagglutinin identifiziert [22, 31]. Hauptbestandteil der Filamente ist das Flagellin A (FlaA) mit einem Molekulargewicht von 54 kDa [30, 49].

Die zellschädigende Wirkung von *H. pylori* wird durch das vakuolisierende Zytotoxin (VacA) hervorgerufen, das eine Vakuolisierung im Zytoplasma der Endothelzellen des Magens bewirkt. Das VacA-Toxin kommt in 50-65% der klinischen *H. pylori*-Stämme vor und erscheint unter denaturierenden Bedingungen als 87 kDa-Protein [10, 11]. Die Toxinproduktion steht in enger Verbindung mit dem vacA Genotyp s1. Dieser Genotyp ist nicht nur assoziiert mit einer verstärkten Gastritis und dem Auftreten von Ulcera duodeni, sondern auch mit dem Gen cagA [2, 5, 45].

Mehrere Studien haben inzwischen ein vermehrtes Vorkommen von Serum-antikörpern gegen VacA bei Patienten mit einem Adenokarzinom des Magens festgestellt [20, 44]. Auch dem Cytotoxin-assoziierten Antigen (CagA) wird eine Assoziation mit schwereren Gastritisformen mit Atrophie und intestinaler Metaplasie sowie mit Ulcera duodeni und dem Magenkarzinom zugeschrieben [12, 38, 44]. Das 120 kDa- [12] oder 128 kDa-Protein [9] dient als serologischer Marker für das Vorhandensein der sogenannten Pathogenitätsinsel von *H. pylori*, einer größeren Gensequenz, die nur in 60-70% der *H. pylori*-Stämme existiert [50].

Die Erkenntnis, dass bestimmte Proteine von *H. pylori* wie CagA und VacA als mögliche Pathogenitätsfaktoren besondere Bedeutung besitzen, hat auch wichtige Konsequenzen in der *H. pylori*-Diagnostik. Der direkte oder indirekte Nachweis von *H. pylori* allein reicht nicht mehr aus. Um zwischen pathogenen und wenig oder apathogenen Stämmen unterscheiden zu können, werden Tests erforderlich, die einzelne spezifische Proteine bzw. ihre entsprechenden Antikörper nachweisen können.

1.3 Diagnostische Möglichkeiten einer *H. pylori*-Infektion

Durch die neu erlangte zentrale Bedeutung von *H. pylori* bei vielen Magen-erkrankungen und den damit verbundenen veränderten Therapieansatz besteht ein hoher Bedarf an zuverlässigen und einfachen Diagnostikverfahren. Generell kann man die verfügbaren Tests nach ihrer Invasivität unterscheiden. Die invasiven Verfahren sind mit einer Gastroskopie und gleichzeitiger Biopsie verbunden. In der Routinediagnostik dominieren der Urease-Schnelltest und die Histologie, während die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die Bakterienkultur mit Resistenztestung eher Forschungszwecken oder speziellen Indikationen wie z.B. epidemiologischen Studien vorbehalten sind [14, 25, 53, 56].

Zu den nicht-invasiven Testverfahren zählen der ^{13}C -Atemtest und verschiedene serologische Methoden zum Nachweis von Antikörpern gegen *H. pylori*, insbesondere der ELISA (enzyme-linked immunoabsorbent assay) und der Westernblot [1, 14, 18, 23, 25, 29, 53, 54]. Der Antikörpernachweis aus Urin oder Speichel ist generell möglich, hat sich jedoch bisher nicht entsprechend bewährt.

Während der ^{13}C -Atemtest besonders zur Therapiekontrolle nach erfolgter Eradikation eingesetzt wird, dient die Serologie derzeit meist dem Screening einer *H. pylori*-Infektion, epidemiologischen Untersuchungen oder der Diagnostik bei Kindern. Nahezu alle *H. pylori*-positiven Patienten zeigen eine dauerhafte humorale Immunantwort, solange die Kolonisation besteht [26, 51]. Am häufigsten sind Antikörper des Typs IgG im Serum nachweisbar, während IgA unregelmäßig und IgM nur selten auftreten [23, 26, 54]. Kosunen et al. [26] fanden außerdem einen Abfall des IgG-Titers um mindestens 50% 6 Monate nach erfolgreicher Eradikationstherapie.

Neue Erkenntnisse auf molekularer Ebene führen derzeit zu einer differenzierteren Betrachtung und Trennung von *H. pylori* in Stämme mit unterschiedlicher Pathogenität. Dieser Fortschritt erfordert auch in der Diagnostik die Entwicklung spezifischerer Tests, um die Basis für eine individuellere Therapie von *H. pylori*-infizierten Patienten zu schaffen. Einige serologische Tests sind bereits in der Lage, einzelne *H. pylori*-Proteine, die als Pathogenitätsfaktoren diskutiert werden, getrennt nachzuweisen. Antikörper gegen CagA oder VacA sind signifikant häufiger im Serum von Patienten mit einem Adenokarzinom des Magens nachweisbar, als in der Kontrollgruppe von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen [44]. Eine weitere Studie [9] fand bei 75,3% der Patienten mit gastroduodenalen Erkrankungen und bei 100% der Patienten mit Ulcus duodeni im ELISA eine Immunantwort gegen CagA.

Dies lässt einen Zusammenhang zwischen CagA und der Ulzerogenese vermuten.

Wegen der hohen Immunogenität von CagA erscheint der Nachweis seiner Serumantikörper zur Identifizierung von Hochrisikopatienten gut geeignet.

Tabelle 1.1 Übersicht der gängigen Verfahren zur *H. pylori*-Diagnostik

Methode	Material	Vorgehen	Nachweis von
<i>direkter Antigennachweis</i>			
Histologie	Biopsie	Giemsa-, Eosin-Hämatoxylin- oder Silberfärbung	Bakterien, zusätzlich Beurteilung der hervorgerufenen Pathologie
Mikrobiologie	Biopsie	Anzucht auf Nährboden	lebenden Bakterien, zusätzlich Erstellen eines Antibiogramms
Genetik	Biopsie (Stuhl, Speichel, Magensaft)	Polymerase-Kettenreaktion	spezifischen Nukleotidsequenzen, Differenzierung verschiedener Stämme
<i>indirekter Nachweis</i>			
Urease-Schnelltest	Biopsie	Inkubation in Medium mit pH-Indikator	Ammoniumionen aus Harnstoffspaltung durch Urease
¹³C-Atemtest	Atemluft	Testmahlzeit mit ¹³ C-markiertem Harnstoff	¹³ C-Kohlendioxyd aus Harnstoffspaltung durch Urease
Serologie	Serum	ELISA	<i>H. pylori</i> -spezifischen Serumantikörpern
		Westernblot	spezifischen Serumantikörpern gegen einzelne <i>H. pylori</i> -Proteine, Differenzierung eventueller Pathogenitätsfaktoren

[25]

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist, einen neuen Westernblot zum Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern gegen Proteine von *Helicobacter pylori* zu entwickeln und zu evaluieren, um ihn in der serologischen *H. pylori*-Diagnostik etablieren zu können. Bei der Entwicklung des Tests wurde besonderer Wert gelegt auf die Kombination von Zuverlässigkeit, gemessen an einer hohen Sensitivität und Spezifität, und Praktikabilität in der Routinediagnostik.

Es soll ein übersichtliches Schema zur Auswertung des Westernblots erarbeitet werden, das eine zuverlässige serologische Diagnostik im Sinne der Unterscheidung zwischen *H. pylori*-positiven und -negativen Patienten ermöglicht.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Qualität und den Vor- und Nachteilen unseres Tests im Vergleich zu bereits etablierten serologischen Verfahren. Darum sollen die Ergebnisse unseres Westernblots denen eines kommerziellen ELISA gegenübergestellt werden.

Um dem heutigen Forschungsstand mit einer differenzierten, in der Routine praktikablen Diagnostik gerecht zu werden, soll weiterhin die Frage beantwortet werden, ob der Westernblot zur Detektion von Antikörpern gegen den Pathogenitätsfaktor CagA eingesetzt werden kann, und inwieweit dies tatsächlich prognostische Relevanz besitzt.

Unter Berücksichtigung der wissenschaftlichen Literatur beschäftigt sich diese Arbeit mit der Frage nach Möglichkeiten und Grenzen von serologischen Testverfahren in der *H. pylori*-Diagnostik auf der Basis unseres neuen Westernblots sowie nach möglichen Veränderungen im klinische Umgang mit einer *H. pylori*-Infektion.

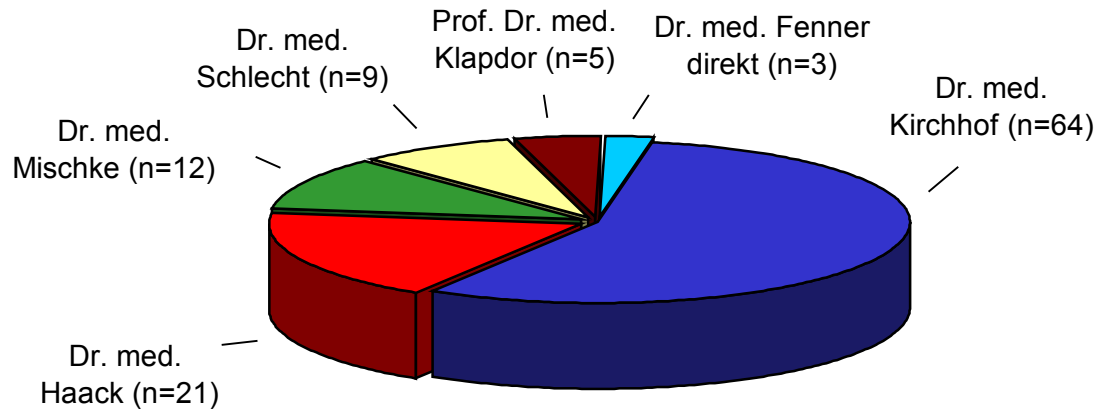
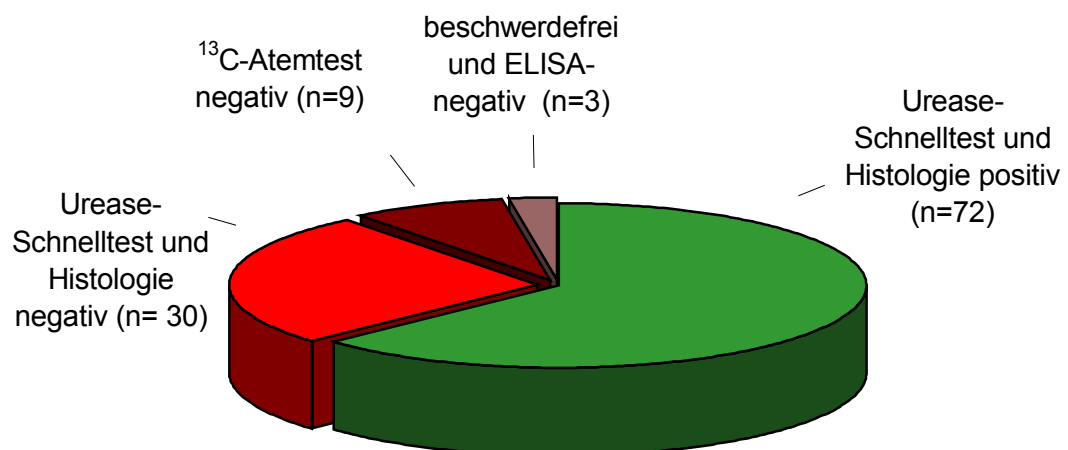
2 MATERIAL

2.1 Patientenkollektiv

Die für die vorliegende Studie verwandten Seren stammen von insgesamt 114 Patienten, die sich zur Abklärung einer gastroenterologischen Beschwerdesymptomatik in einer von fünf verschiedenen Hamburger Arztpraxen (siehe Abbildung 2.1) im Zeitraum von November 1997 bis Januar 1998 vorstellten. Bei 102 Patienten wurde eine Gastroskopie mit Biopsien durchgeführt, und eine *H. pylori*-Diagnostik im Sinne eines Urease-Schnelltests sowie eine histologisch-mikroskopische Untersuchung angeschlossen. 72 Patienten hatten sowohl einen positiven Urease-Schnelltest, als auch einen positiven Nachweis von *H. pylori* in der histologischen Färbung, und wurden daraufhin als *H. pylori*-positive Patienten definiert.

30 Patienten zeigten negative Ergebnisse in beiden Untersuchungen, so dass sie in die Gruppe der *H. pylori*-negativen Patienten aufgenommen wurden. Weitere 9 Patienten mit negativem ^{13}C -Atemtest und 3 beschwerdefreie, im ELISA negative Blutspender wurden in die *H. pylori*-negative Patientengruppe eingeschlossen (siehe Abbildung 2.2).

Patienten mit unvollständigen oder gegensätzlichen Befunden in Urease-Schnelltest und Histologie konnten wegen ihres fraglichen *H. pylori*-Status nicht in diese Studie aufgenommen werden. Aufgrund länger persistierender Antikörper können serologische Tests bei erfolgreich therapierten Patienten falsch positiv ausfallen [26, 51]. Aus diesem Grund wurden Patienten der *H. pylori*-negativen Gruppe mit anamnestisch bereits erfolgter Eradikationstherapie von der Studie ausgeschlossen.

Abbildung 2.1 Herkunft der Patientenseren nach beteiligten Arztpraxen**Abbildung 2.2 Zusammensetzung des Patientenkollektives*****H. pylori*-negative Patienten*****H. pylori*-positive Patienten**

2.2 Datenerhebung

Zur Datenerhebung dienten zwei Fragebögen, die nach Rücksprache mit den behandelnden Ärzten entwickelt wurden. Die Patientendaten wurden vertraulich und anonym weiterbearbeitet. Der *Fragebogen an Patienten vor einer Magenspiegelung* (siehe Anhang) erfasste Basisdaten wie *Alter*, *Größe* und *Gewicht* des Patienten sowie Angaben zu der Art der Beschwerdesymptomatik. Hierfür waren 9 typische Beschwerden bei gastrointestinalen Erkrankungen vorgegeben: *Schmerzen*, *Brennen* oder *Druck im Oberbauch*, *Schmerzen hinter dem Brustbein*, *Sodbrennen*, *Völlegefühl*, *Schluckbeschwerden*, *Übelkeit/Erbrechen*, *Gewichtsabnahme*, *Blähungen* und *Luftaufstoßen*. Die individuelle Bedeutung der einzelnen Symptome konnte in Form einer Graduierung (*häufig*, *manchmal*, *nein*) angekreuzt werden.

Im zweiten Abschnitt des Fragebogens wurden die Dauer der Beschwerdesymptomatik, bereits erfolgte Therapieversuche sowie die Medikamentenanamnese erfasst.

Der dritte Abschnitt befasste sich mit allgemeinen Risikofaktoren, die zum Auftreten von gastrointestinalen Beschwerden prädisponierten. Dazu gehörten Operationen an Magen, Darm oder Speiseröhre, die Einnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika, Stress, Rauchen sowie die Familienanamnese. Zur Erkennung von Übergewicht als weiteren Risikofaktor wurde der Body Mass Index (BMI) nach der Formel $BMI = \text{Gewicht [kg]} / \text{Größe [m]}^2$ berechnet. Dabei galten Patienten mit einem $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ als übergewichtig.

Der Fragebogen *Diagnostik und Befunde der Helicobacter pylori-Evaluation* (siehe Anhang) richtete sich an den gastrokopierenden Arzt und befasste sich im Kernstück mit den Gastroskopiebefunden. Zum Ankreuzen vorgegeben waren die *Diagnosen* *Ulcus ventriculi*, *Ulcus duodeni*, *Gastritis*, *Magenkarzinom*, *MALT-Lymphom* und *Refluxösophagitis* sowie die Komplikationen *Blutung*, *Perforation*, *Penetration*, *Magenausgangsstenose* und *karzinomatöse Entartung*. Es bestand die Möglichkeit zur Angabe sonstiger Diagnosen und zur genaueren Lokalisation der Befunde. Zusätzlich wurde das Ergebnis des Urease-Schnelltests erfasst.

Des weiteren sollten bereits vor der gastrokopischen Diagnostik durchgeführte Therapiemaßnahmen, insbesondere eine Eradikationstherapie, vermerkt werden.

2.3 Untersuchungsmaterial

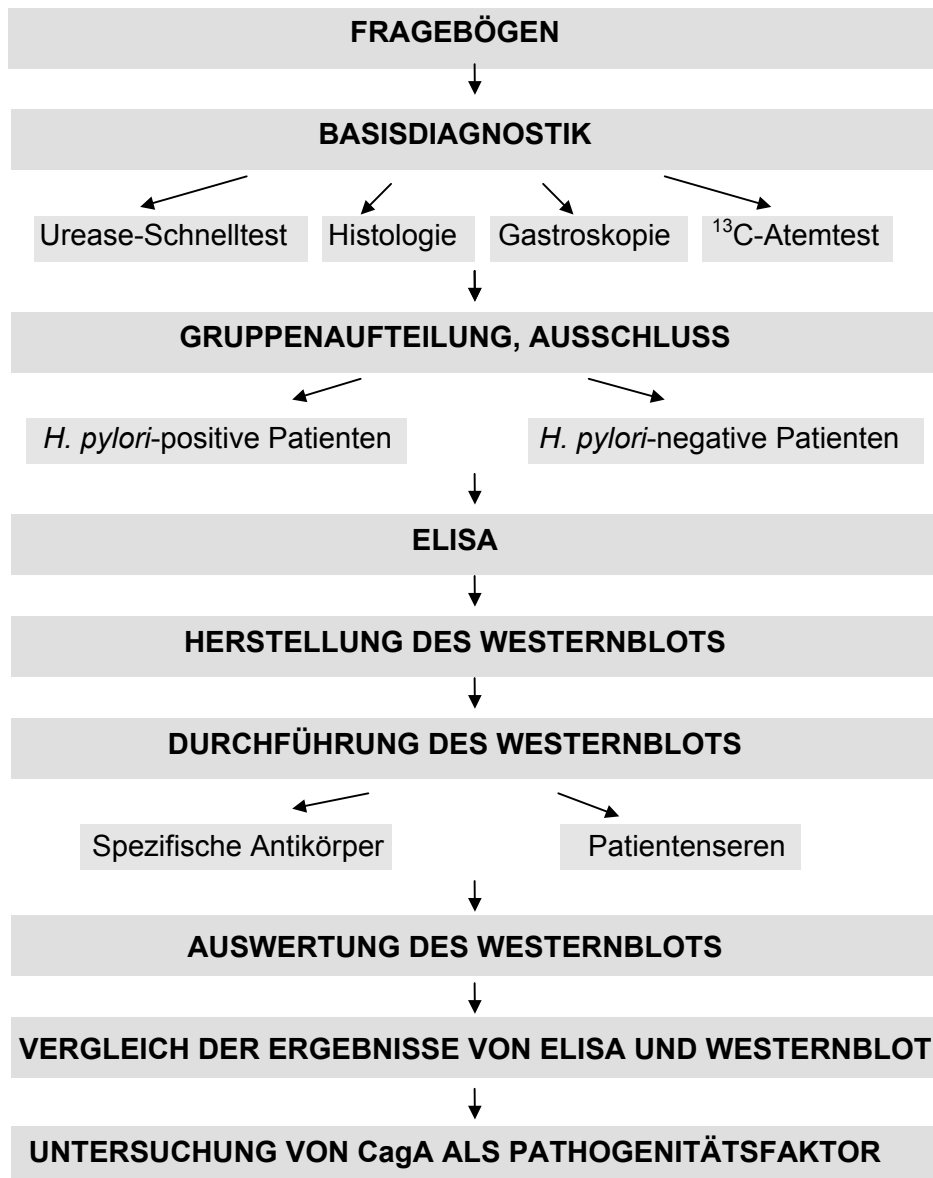
Das Einverständnis der Patienten für die Untersuchung ihres Blutes auf Antikörper gegen *Helicobacter pylori* und für die Verwendung ihrer Daten zu Studienzwecken wurde in den beteiligten Arztpraxen eingeholt.

Von den 114 Patienten wurden im Rahmen einer Routineblutentnahme durch periphere Venenpunktion zusätzlich ca. 10 ml Vollblut gewonnen. Maximal 48 Std. nach Abnahme und Zwischenlagerung des Materials bei +7°C erfolgte die Zentrifugation bei 4800 U/min für 3 min zur Abtrennung zellulärer Bestandteile. Nach der Aliquo-tierung und Beschriftung wurde das Serums bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

3 METHODEN

3.1 Untersuchungsablauf

Abbildung 3.1



3.2 Durchführung der etablierten *Helicobacter pylori*-Diagnostik

Gastroskopie und Urease-Schnelltest

Die gastroskopische Untersuchung und die für die weitere Diagnostik erforderlichen Biopsien wurde von erfahrenen gastroskopisch geschulten Ärzten (Dr. med. Haack, Dr. med. Kirchhof, Dr. med. Klapdor, Dr. med. Mischke, Hamburg) in Anlehnung an die Empfehlungen einer Expertenrunde 1995 [13] durchgeführt. Die Erfassung der Untersuchungsbefunde erfolgte gemäß der Kriterien auf dem Fragebogen *Diagnostik und Befunde der Helicobacter pylori-Evaluation* (vgl. Abschnitt 2.2).

Direkt nach der Probeentnahme schloss sich der Urease-Schnelltest (HUT) nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers (Astra, Wedel) an. Die Biopsie wurde in einen mit Harnstoff und einem pH-Indikator versehenen Behälter gebracht. War *H. pylori* vorhanden, wurde der Harnstoff durch das Enzym Urease gespalten, und der entstehende Ammoniak verursachte im Sinne eines erhöhten pH-Wertes einen Farbumschlag.

Histologisch-mikroskopische Untersuchung

Die histologische Untersuchung der gastroskopisch gewonnenen Biopsien wurde mit Hilfe einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung durch erfahrene Pathologen (Praxis Dr. med. Thilo Hartmann, Gemeinschaftspraxis Dres. med. A. Angelkort und W. Krause, Hamburg) durchgeführt. Die Untersuchung auf *H. pylori* im Sinne eines Nachweises gekrümmter Stäbchenbakterien erfolgte im Giemsa-Präparat.

Zur Beurteilung der Gastritis fand die 1990 anlässlich des Weltkongresses für Gastroenterologie erarbeitete Sydney-Klassifikation [37] in Einklang mit der Klassifikation der Arbeitsgemeinschaft für Gastroenterologie der Deutschen Gesellschaft für Pathologie von 1989 Anwendung [19, 47]. Dabei diente das Ausmaß der lymphoplasmazellulären Infiltration der Lamina propria zur Beurteilung des Schweregrades der Entzündung. Die Dichte der neutrophilen Granulozyten im Untersuchungspräparat stellte hingegen ein Maß für die Aktivität der Entzündung dar.

Die Begriffe A-, B- und C-Gastritis wurden in dieser Arbeit wie folgt benutzt:

Typ A: Autoimmungastritis der Corpusschleimhaut

Typ B: (aktive) chronische Antrumgastritis bei *H. pylori*-Besiedelung

Typ C: chemisch induzierte Gastritis durch Gallereflux oder durch
nichtsteroidale Antirheumatika

In die Auswertung der Histologiebefunde wurden sämtliche im Befundbericht aufgeführten Pathologien aufgenommen. Veränderungen, die der näheren Beschrei-

bung der Hauptdiagnose B-Gastritis dienten, wurden als histologische Zusatzbefunde bezeichnet.

¹³C-Atemtest

Der ¹³C-Atemtest basiert auf dem Prinzip der Erstbeschreiber Graham et al. 1987 [18]. Er erfolgte mit dem IRIS® (Infrarot Isotopen) - Analysator gemäß Anleitung des Herstellers (Wagner, Bremen) durch Fachkräfte des Labors Dres. med. Fenner (Hamburg). Je eine Atemprobe wurde direkt vor und 30 Minuten nach oraler Verabreichung der 75 mg ¹³C markierten Harnstoffs (Promochem, Wiesel) abgenommen. War *H. pylori* im Magen des Patienten vorhanden, wurde der Harnstoff durch Urease gespalten, und das entstehende markierte CO₂ abgeatmet. Der Anstieg des ¹³C in der CO₂-Ausatemluft der zweiten Atemprobe des Patienten wurde infrarotspektrometrisch gemessen. Bei einem Ergebnis größer oder gleich 5‰ galt der ¹³C-Atemtest als positiv, während Werte bis 4‰ als negativ bewertet wurden. Von 4,01‰ bis 4,99‰ war das Ergebnis grenzwertig.

Enzyme-linked-Immunoassay (ELISA)

Alle an der Studie beteiligten Seren wurden im *H. pylori* ELISA der Firma Biorad (München) gemäß Herstelleranweisung im Labor Dres. med. Fenner (Hamburg) getestet. Es erfolgte der getrennte quantitative Nachweis von IgG, IgM und IgA-Antikörpern. Die jeweiligen Mindestwerte für einen positiven Antikörperbefund waren wie folgt definiert: IgG 20 U/ml, IgA 20 U/ml, IgM 40 U/ml. Sobald ein Serum einen positiven IgG-Befund aufwies, galt der ELISA - unabhängig vom IgA oder IgM-Antikörperstatus - als Hinweis auf eine chronische Infektion als positiv. Ebenfalls ELISA-positiv waren Seren mit gleichzeitig positivem Nachweis von IgA und IgM-Antikörpern. Traten isoliert nur IgA oder IgM-Antikörper auf, so wurde der ELISA als fraglich bewertet, da es sich sowohl um eine Frühphase einer *H. pylori*-Infektion, als auch um eine unspezifische Begleitreaktion handeln konnte. Lagen die Titer aller drei Antikörpertypen unterhalb der Mindestgrenze, so wurde der ELISA ebenfalls als negativ interpretiert.

3.3 Prinzip des Westernblots

Das Western-Blotting ist eine immunologische Technik zum Nachweis bereits geringer Mengen bestimmter Proteine. In der serologischen *H. pylori*-Diagnostik entsprechen diese Proteine Antikörpern (Immunglobulinen) gegen als Antigen wirkende Proteine von *H. pylori*.

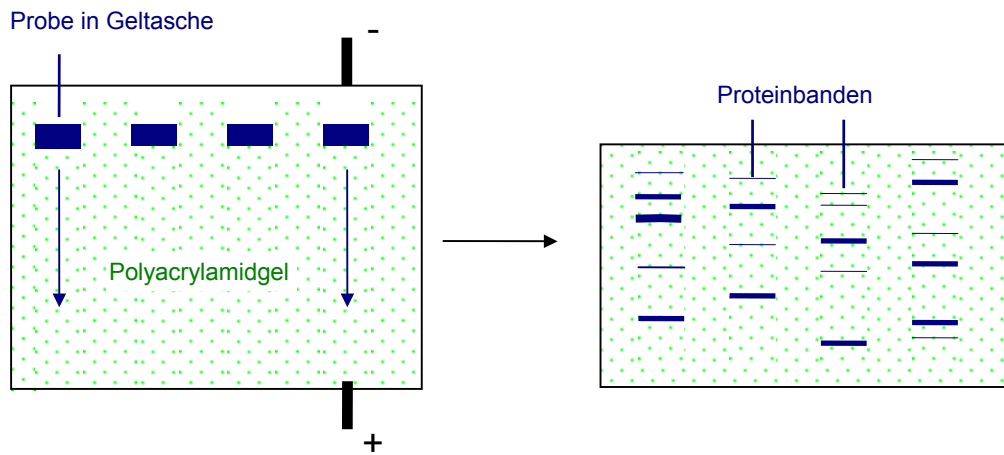
Dem Westernblot geht die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) voraus, die eine Methode zur Trennung der *H. pylori*-Proteine darstellt.

Das Prinzip beruht auf unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Proteine im elektrischen Feld. Als Trägermedium dienen Polyacrylamidgele, die als Molekularsiebe wirken, und deren Porengröße durch die Polymerisation unterschiedlicher Konzentrationen von Acrylamid und Methylenbisacrylamid (einem quervernetzenden Reagens) variiert werden kann. Unter denaturierenden Bedingungen durch Zusatz des Detergenses Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) lassen sich die Proteine hauptsächlich aufgrund ihrer Masse in Polyacrylamidgelen trennen. Bei Anlegen einer Spannung erfolgt die Wanderung der Protein-SDS-Komplexe zur Anode, wobei kleine Proteine rascher durch das Gel wandern als größere. Die Beweglichkeit der meisten Proteine ist dem Logarithmus ihrer Masse direkt proportional. Auf diese Weise entstehen sogenannte Banden aus Proteinen gleichen Molekulargewichtes (siehe Abbildung 3.2a).

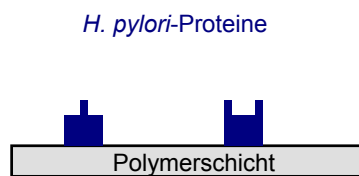
Nach der Auftrennung der *H. pylori*-Proteine in der SDS-PAGE erfolgt das Blotting, der Proteintransfer auf eine Polymerschicht wie z.B. Nitrocellulose (siehe Abbildung 3.2b), um die Proteine bei der anschließenden Immundetektion dem 1. Antikörper besser zugänglich zu machen. Dieser entspricht in unserem Fall den Antikörpern gegen *H. pylori*-Proteine im Serum infizierter Patienten. Als nächster Schritt werden die Antigen-Antikörperkomplexe mit einem 2. Antikörper inkubiert, der spezifisch für den 1. Antikörper ist (Anti-Human-Antikörper). Durch Variation des 2. Antikörpers lassen sich isoliert einzelne Isotypen (IgG, IgA oder IgM) der Serumantikörper nachweisen. An den 2. Antikörper ist ein Enzym (z.B. alkalische Phosphatase) gebunden, das die Reaktion eines farblosen Substrats zu einem gefärbten Produkt katalysiert. Auf diese Weise lassen sich die Immunkomplexe in Form von gefärbten Protein-banden sichtbar machen (siehe Abbildung 3.2c).

Abbildung 3.2 Prinzip des Westernblots

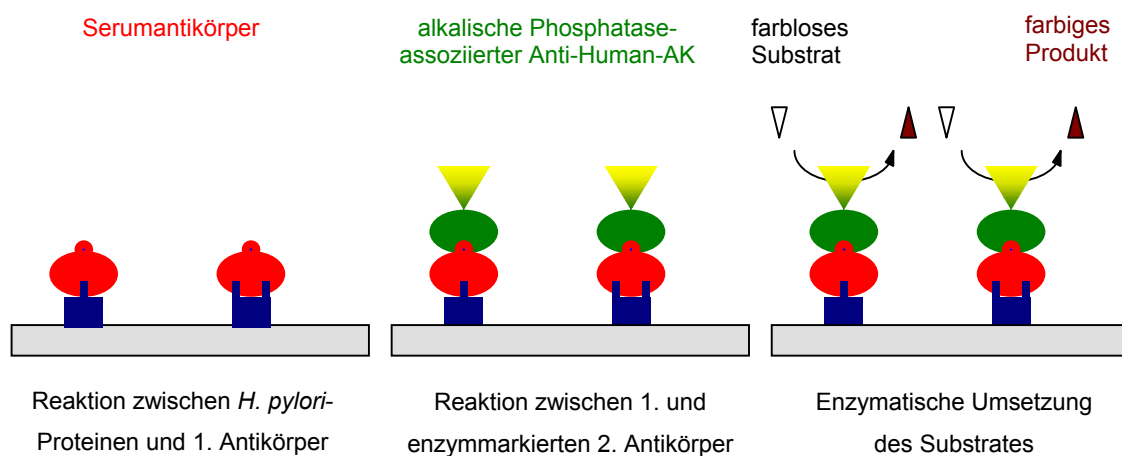
a) SDS-PAGE



b) Proteintransfer auf Polymerschicht (Blotting)



c) Immundetektion



[48]

3.4 Herstellung und Gewinnung des *H. pylori*-Antigenmaterials

Für die Westernblots (SDS-PAGE) wurde ein Gesamtzelllysate von *Helicobacter pylori* eingesetzt. Der *H. pylori*-Stamm 18 (Becton Dickinson, Heidelberg) wurde auf Blutagarplatten (Schaedler™, BBL, Becton Dickinson, Heidelberg) unter mikroaerophilen Bedingungen (Campylobacter-Gas-Generating Kit, BR 60, Oxoid, Wesel) über 3 Tage bei 37°C kultiviert. Zur Bakteriengewinnung wurden die Kolonien in 2 ml PBS (siehe *Puffer, Lösungen, Chemikalien für die Immundetektion S.20*) aufgenommen und 2 min mit 10.500 g bei RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde zum Abwaschen der mit den Bakterien lose assoziierten Proteine das Sediment in 1 ml 4°C Hochsalzpuffer (modifiziert nach Fujiki et al. '82 [17]; 0,5M KCl; 20mM Tris pH 7,5; 5 mM DDT; 3 mM MgCl₂) solubilisiert und für 2 min bei 10.900 U RT zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde dieser Zentrifugationsschritt wiederholt. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment gewogen (Feuchtgewicht) und in 5x SDS-Probenpuffer aufgenommen (285 mg/ml, siehe *Puffer, Lösungen, Chemikalien für SDS-PAGE und Westernblot S.18*), 5 min bei 95°C gekocht und zur Aufbewahrung bei -30°C eingefroren.

3.5 Herstellung des *Helicobacter pylori*-Westernblots

3.5.1 Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien im Reinheitsgrad zur Analyse von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

Puffer, Lösungen, Chemikalien für SDS-PAGE und Westernblot

20% SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate=Sodium-Lauryl-Sulfate)

20 g SDS

- lösen in 90 ml a. dest., unter Rühren auf 68°C erhitzen
- auf RT (Raumtemperatur) kühlen
- auffüllen auf 100 ml

30% Acrylamid/0,8% bis-Acrylamid

150 g Acrylamid (Sigma, Deisenhofen)

4 g Bis-Acrylamid (Sigma, Deisenhofen)

- unter Rühren lösen in 400 ml a. dest., auffüllen auf 500 ml
- filtrieren durch Einmal-Sterilfilter (V115, 0,45 µm, Sartorius, Göttingen)
- bei 4°C dunkel lagern

10% APS (Ammoniumperoxydisulfat)

- 30 mg APS mit Feinwaage in Eppendorftube einwiegen
- auflösen in 300 µl a. dest., bei 4°C zwei Tage haltbar

TEMED (N,N,N',N',-Tetramethyl-ethylendiamin)

- lagern bei 4°C

Elektrophoresepuffer (10x Elpho)

30 g Trisbase (Roth, Karlsruhe)

144 g Glycin

- unter Rühren auflösen in 800 ml a. dest., ergibt pH 8,3, auffüllen auf 1 l zum Gebrauch (1x Elpho):

100 ml 10x Elpho

5 ml 20% SDS

- auffüllen auf 1 l mit a. dest.

Tabelle 3.1 Herstellung von Trenngel- und Sammelgelpuffer

Trenngelpuffer (4x Tris-Cl/SDS pH 8,8)	Sammelgelpuffer (4x Tris-Cl/SDS pH 6,8)
91 g Trisbase	6,05 g Trisbase
=Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan) (Roth, Karlsruhe)	
Trisbase unter Rühren in	
300 ml a. dest.	40 ml a. dest.
auflösen. Mit	
1N HCl (ca. 100 ml 1,5 N HCl) auf pH 8,8	1N HCl (ca. 6,5 ml HCl konz.) auf pH 6,8
einstellen.	
0,5 ml 20% SDS	0,5 ml 20% SDS
dazugeben, auf	
500 ml	100 ml
auffüllen. Filtrieren durch Einmal-Sterilfilter	
V500, 0,45 µm (Sartorius, Göttingen)	V115, 0,45 µm (Sartorius, Göttingen)
Bei 4°C lagern	

5x SDS-Probenpuffer (nach Brand) mit DTT

25,25 g Glycerin 99%

16,5 ml Tris-Stocklösung 2M Tris, 16,6% SDS pH 6,8

1,93 g DTT (Sigma, Deisenhofen)

0,05 g Bromphenolblau-Na-Salz

a) ansetzen der Tris-Stocklösung 2M Tris, 16,6% SDS pH 6,8:

- 24,228 g Trisbase (Roth, Karlsruhe) in 50 ml a. dest. lösen
- mit rauchender HCl den pH-Wert auf 6,8 einstellen
- 16,6 g SDS dazugeben, unter Rühren und eventuellem Erhitzen lösen
- auf 100 ml auffüllen

b) Bromphenolblau und das DTT vorlegen

- Glycerin einwiegen, 5 ml a. dest. hinzufügen
- 16,5 ml Tris-Stocklösung hinzufügen, unter Rühren mit Magnetrührer und evtl. Erhitzen mischen
- mit a. dest. auf 50 ml auffüllen und erneut mit Magnetrührer gründlich mischen

Blotpuffer

- 5,81 g Trisbase (Roth, Karlsruhe)
- 2,93 g Glycin
- 1,875 ml 20% SDS
- 200 ml Methanol
- auffüllen auf 1 l mit a. dest.

Puffer, Lösungen, Chemikalien für die Immundetektion

PBS-Waschpuffer (pH 7,2-pH 7,3)

- 1,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,2 g KH_2PO_4
- 0,2 g KCl
- 8,0 g NaCl
- auf 1000 ml mit a. bidest. auffüllen, Lagerung bei 4°C

Verdünnungspuffer (für Serum und Konjugat)

- 100 ml PBS-Waschpuffer
- 50 µl Tween 20
- mischen, Lagerung bei 4°C

Blocklösung

- 3 g Magermilchpulver (Reformhaus)
- in 100 ml Verdünnungspuffer (37°C) auflösen
- Menge nach Bedarf stets frisch herstellen

Avidin-AP Conjugat (Biorad, München)

- Lagerung bei 4°C

Substratpuffer (pH 9,4)

- 1,52 g Tris-Hydrochlorid (Roth, Karlsruhe)
- 11,0 g Trisbase (Roth, Karlsruhe)
- 5,47 g NaCl
- 1,016 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
- in 1000 ml a. bidest. lösen, Lagerung bei 4°C

Substratlösungen für Alkalische Phosphatase:

a) NBT (Nitro-blue-Tetrazolium) Stocklösung (10 mg/ml):

100 mg NBT (Sigma, Deisenhofen)

- in 10 ml a. bidest. lösen, Lagerung im Dunkeln bei 4°C

b) BCIP (5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat-Dinatriumsalz) Stocklösung (50 mg/ ml):

- 100 mg BCIP (Sigma, Deisenhofen)

- in 2 ml a. bidest. lösen, Lagerung eingefroren bei -20°C

Stopp-Puffer (10x PBS-EDTA, pH 7,2-7,3)

14 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

2,0 g KH_2PO_4

2,0 g KCl

80,0 g NaCl

7,444 g Na-EDTA (Sigma, Deisenhofen)

- in 1000 ml a. bidest. lösen, Lagerung bei 4°C

- zum Gebrauch 1:10 verdünnen

Molekulargewichtsstandards

„Kaleidoskope Prestained Standard“ (Biorad, München)

Der gefärbte Standard diente bei der SDS-PAGE der Laufkontrolle der Proteine und enthielt 7 unterschiedlich gefärbte Proteine mit Molekulargewichten zwischen ca. 200 und 6,5 kDa.

„Biotinylated SDS-PAGE Standard“ (Biorad, München)

Anhand des biotinylierten Markers wurde nach der Immundetektion eine Berechnung der Molekulargewichte der immunreaktiven Banden durchgeführt. Die enthaltenen Proteine besaßen Gewichte von 200, 116.25, 97.4, 66.2, 45, 31, 21.5, und 14.4 kDa.

Antikörper

Alkalische Phosphatase konjugierte Ziege anti-human-IgG (Dianova, Hamburg)

spezifische Antikörper gegen *H. pylori*-Proteine (siehe Tabelle 3.2)

Die monoklonalen Antikörper GF6, I1C9, F3B1 und G4C5 wurden freundlicherweise von Dr. C. W. Penn, School of Biological Science, University of Birmingham, United Kingdom bereitgestellt. Der Antikörper gegen CagA (#3, Lot.15.12.1994) wurde freundlicherweise von Dr. A. Covacci, Immunobiological Research Institute of Siena, Chiron Vaccines, Italien zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.2 Spezifische Antikörper zur Immundetektion von *H. pylori*-Proteinen

Antikörper	gewonnen aus Spezies	Antigen	Referenz
GF6	Maus, monoklonal	HpaA (flagellar sheath)	[22, 31]
I1C9	Maus, monoklonal	UreA	[52]
F3B1	Maus, monoklonal	FlaA	[30]
G4C5	Maus, monoklonal	UreB	[52]
#3, Lot. 15.12.1994	Kaninchen, polyklonal	CagA	[9]

3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Elektrophorese wurde nach dem von Laemmli 1970 [27] erstmals beschriebenen Prinzip durchgeführt.

Herstellung des Polyacrylamidgels

Für die SDS-PAGE in Mini Protean II-Kammern der Firma Biorad (München) wurden Gradienten-Trenngele mit Konzentrationen von 10%, 11% und 14% nach Tabelle 3.3 hergestellt. Die Angaben gelten für 4 Gele der Größe 8,3 cm x 9,5 cm x 0,75 mm.

Tabelle 3.3 Herstellung des Gradienten-Trenngels

Zugabe von	Gelkonzentration		
	10%	11%	14%
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	2,5 ml	2,75 ml	3,63 ml
Trenngelpuffer	1,80 ml	1,88 ml	1,88 ml
aqua dest.	3,13 ml	3,13 ml	2,25 ml
TEMED	0,005 ml	0,005 ml	0,005 ml
10% APS	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml

Nach Zugabe des APS und Mischen durch Schwenken wurden die Gele sofort gegossen.

Pro Gel wurden erst 1,1 ml des 14%igen Gels, dann 1,4 ml 11%, dann 1,2 ml 10% vorsichtig längs der Glasplattenspalte gegossen, um ein Durchmischen der Schichten zu vermeiden. Zum luftdichten Abschluss wurde das Trenngel während der Polymerisation (ca. 30 min) mit aqua dest. überschichtet.

Tabelle 3.4 **Herstellung des Sammelgels**

Zugabe von	Menge für 4 Gele
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	1,2 ml
Sammelgelpuffer	2,2 ml
aqua dest.	5,2 ml
TEMED	25 µl
Bromphenolblau in Tris pH 6,8	30 µl
10% APS	80 µl

Die Sammelgelherstellung erfolgte nach Tabelle 3.4. Nach Entfernen des aqua dest. auf dem polymerisierten Trenngel und Zugabe des APS zur Sammelgellösung wurde das Sammelgel sofort auf das Trenngel gegossen. Zur Konstruktion einer Tasche wurde ein Kamm mit einem Zahn bis zur vollständigen Polymerisation (ca. 30 min) 1 cm tief in die Lösung gesteckt, so dass das Sammelgel eine Höhe von 0,5 cm erhielt. Um ein Schrumpfen der Tasche zu vermeiden, wurde mehrfach Gellösung nach-gefüllt.

Elektrophorese

Die Gelplatten wurden in die Halterungen der Mini Protean II-Kammern (Biorad, München) eingespannt und in 1x Elektrophoresepuffer (4°C) in die Fußwanne gestellt, so dass die Platten ca. 1 cm tief im Puffer standen. Die obere Wanne wurde ebenfalls mit 1x Elektrophoresepuffer (4°C) gefüllt.

Tabelle 3.5 **Vorbereitung der Proben**

Molekulargewichtsstandard	Menge pro Gel
„Kaleidoskope Prestained Standard“	5 µl
„Biotylated SDS-PAGE Standard“	7,5 µl
5x SDS-Probenpuffer n. Brand+DTT (80°C)	3,5 µl

<i>H. pylori</i>-Proteine	Menge pro Gel
1:10-Verdünnung des Gesamtzelllysats	8x10 µl

Die Probenvorbereitung wurde nach den in Tabelle 3.5 angegebenen Mengen vorgenommen. Die Molekulargewichtsstandards wurden mit dem Probenpuffer (80°C) gemischt, 5 min bei 95°C gekocht und in die einzige Tasche gefüllt.

Zur Herstellung der Probe aus denaturierten *H. pylori*-Proteinen wurde eine 1:10 Verdünnung des Gesamtzelllysats (siehe Absatz 3.4) mit 5x SDS-Probenpuffer nach Brand+DTT (80°C) verwandt. Für eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Probe wurden auf jedes Gel mit der Multipipette 8x10 µl Verdünnung in die durchgehende Tasche eingebracht. Nachdem sich die Proben in ca. 2-3 min gesetzt hatten, wurde die Gelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht bei 200 V für ca. 45 min durchgeführt. Sie wurde beendet, wenn die blaue Bande des „Kaleidoskope Prestained Standard“ gerade das Gelende erreicht hatte.

3.5.3 Proteintransfer auf Nitrocellulose

Der Proteintransfer auf Nitrocellulose erfolgte im Westernblot semi-dry-Verfahren mit dem Semi-Dry-Blotter von Biorad (München). Dafür wurde ein Blatt in Blotpuffer eingeweichte Nitrocellulose (8,2 x 6,9 cm) auf 4 Blatt blotpuffergetränktes Filterpapier gelegt. Das Gel wurde darüber geschichtet und ebenfalls von 4 Blatt nassem Filterpapier abgedeckt. Zur Vermeidung von Luftbläschen wurde ein Glasstab mit leichtem Druck über die einzelnen Schichten gerollt. Der Proteintransfer erfolgte bei 15 V für 45 min.

Nach dem Westernblot wurde die Nitrocellulose mit einem Numerierungsaufkleber versehen und entsprechend in Streifen geschnitten, wobei die jeweils 2 randständigen Streifen der mit *H. pylori*-Proteinen besetzten Membran verworfen wurden. Nach dem Trocknen wurden die Streifen in verschließbare Plastikröhrchen gegeben und bei +7°C aufbewahrt.

3.6 Immundetektion

Zur Identifizierung einiger typischer *H. pylori*-eigener Proteine und deren Lokalisation auf dem Westernblot erfolgte die Immundetektion mit den in Tabelle 3.2 beschriebenen spezifischen Antikörpern. Daran schloss sich die Testung aller Seren der *H. pylori*-positiven und -negativen Patienten auf dem Westernblot an.

Bei der Immundetektion wurde mit den Patientenseren und den spezifischen Antikörpern prinzipiell gleichermaßen verfahren. Die Blotstreifen wurden mit Hilfe einer Pinzette mit der Vorderseite nach oben in die Reagenzreservoirs der Inkubationswanne (Multiwell-Plastikschale) gegeben und in je 2 ml PBS-Waschpuffer 5 min unter Schwenken durchfeuchtet. Nach Absaugen des Waschpuffers wurden die Streifen zur Blockierung freier Bindungsstellen sofort mit 2 ml Blocklösung (37°C) versehen und unter Schwenken 15 min inkubiert.

Nach gründlichem Entfernen der Blocklösung wurden die Streifen mit 2 ml einer in Tabelle 3.6 erläuterten Verdünnung des Patientenserums, bzw. der spezifischen Antikörper (in Verdünnungspuffer 37°C) versehen.

Tabelle 3.6 Verdünnungen des 1. Antikörpers

Antikörper	Verdünnung
Patientenserum	1:100
GF6	1:10
F3B1	1:10
I1C9	1:10
G4C5	1:10
#3, Lot. 15.12.94	1:100

Um eine Bindung zwischen den *H. pylori*-Proteinen und den entsprechenden Antikörpern zu erreichen, erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 1 Std. 15 min. Nach Absaugen der Verdünnung des 1. Antikörpers wurden die Streifen 3x gespült und 5 min mit 2 ml PBS-Waschpuffer unter Schwenken gewaschen. Dieser Waschvorgang wurde mit 1x spülen wiederholt.

Tabelle 3.7 Herstellung der Konjugatgebrauchslösung

Konjugat	Verdünnung
alkalische Phosphatase konjugierte Ziege anti-human-IgA	1:1000
+ Avidin-AP Konjugat	1:6000

Tabelle 3.8 Herstellung der Substratgebrauchslösung

Zugabe von	Menge für 5 Streifen
Substratpuffer	10 ml
NBT-Stocklösung	330 µl
BCIP-Stocklösung	33 µl

Die Konjugatgebrauchslösung zur Detektion des 1. Antikörpers und des biotinylierten Molekulargewichtsstandards wurde nach Tabelle 3.7 mit Verdünnungspuffer hergestellt. Die Streifen wurden nach Zugabe von je 2 ml Konjugatgebrauchslösung 1 Std. bei RT unter Schwenken inkubiert. Nach Absaugen des 2. Antikörpers wurde der zweimalige Waschvorgang wie oben wiederholt.

Die Substratgebrauchslösung wurde aus den in Tabelle 3.8 angegebenen Substanzen frisch zubereitet und bis zur Verwendung dunkel aufbewahrt. Nach Zugabe von 2 ml Substratgebrauchslösung zu jedem Streifen konnte unter 5-minütigem Schwenken die Reaktion zwischen Konjugat und Substrat im Sinne einer Anfärbung der Proteinbanden beobachtet werden.

Nach Absaugen des Substrats wurde die Reaktion mit 2 ml Stopp-Puffer beendet, und die Streifen anschließend zwischen Filterpapier getrocknet. Die trocknen Streifen wurden mit Hilfe von selbstklebender Bucheinbinderfolie auf Overheadfolien geklebt, beschriftet und im Dunkeln aufbewahrt.

3.7 Auswertung des Westernblots

3.7.1 Ablesen der immunreaktiven Proteinbanden auf dem Westernblot

Sämtliche immunreaktiven Proteinbanden aller Westernblots der getesteten Patientenseren wurden hinsichtlich ihrer Lage und ihrer Intensitäten erfasst. Zur Vermeidung von Ungenauigkeiten aufgrund von subjektiven Unterschieden in der Beurteilung wurde die Untersuchung aller Westernblots von einer einzigen Person durchgeführt.

Chargenvergleich

Trotz möglichst gleicher Bedingungen bei der Herstellung der einzelnen Westernblot-Chargen ließen sich geringfügige Schwankungen, z.B. bei der Trenngellänge und der Dauer der Gelelektrophorese nicht vermeiden. Um die Lage der Proteinbanden verschiedener Chargen miteinander vergleichen zu können, wurde aus jeder Charge ein Westernblotstreifen eines positiven Kontrollserums zum Entwurf einer Schablone verwandt. Diese Schablone diente als Grundlage für die Auswertung der Western-blots der Patientenseren. Auf dem Kontrollstreifen nicht identifizierbare Protein-banden, die auf später ausgewerteten Westernblots auftraten, wurden nachträglich auf der Schablone aufgetragen.

Molekulargewichtsbestimmung der immunreaktiven Proteinbanden

Zur Molekulargewichtsbestimmung diente der biotinylierte Molekulargewichtsstandard, der bei der Immundetektion mit dem Avidin-AP Conjugat reagierte. Mit Hilfe einer graphischen Darstellung der definierten Molekulargewichte der Markerproteine gegen ihren RF ($RF = \frac{\text{bei der SDS-PAGE zurückgelegte Strecke der Proteine}}{\text{Gesamtlänge des Trenngels}}$) in einer Eichkurve wurden die Molekulargewichte der immunreaktiven *H. pylori*-Proteine ermittelt.

Intensitäten der Proteinbanden

Zur Erfassung der einzelnen Proteinbanden in ihren unterschiedlichen Intensitäten wurde ein Schema zum Ablesen der Bandenstärke festgelegt:

- 0 = nicht sichtbar
- 1 = schwach/dünn
- 2 = kräftig
- 3 = sehr dick/sehr kräftig

Diese Kategorisierung diene der späteren Berechnung, ab welcher Intensität eine Proteinbande auf dem Westernblot als positiv zu bewerten ist, bzw. inwiefern die Intensität einer Proteinbande die Unterscheidung zwischen *H. pylori*-positiven und -negativen Patienten ermöglicht. Zu diesem Zweck erfolgte die in 3.7.2 dargestellte Berechnung des Cutpoints jeder Proteinbande.

3.7.2 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der freundlichen Unterstützung von Prof. Dr. J. Berger, Institut für Biomathematik und Datenverarbeitung der Universitätsklinik Eppendorf, Hamburg. Wegen des relativ kleinen Stichprobenumfanges kam der „exakte Test“ von R.A. Fisher (Fisher-Test) zur Anwendung [46].

Beim Ablesen der immunreaktiven Proteinbanden auf dem Westernblot wurden die Bandenintensitäten 0 bis 3 unterschieden. Die Intensität allein konnte jedoch noch keinen Aufschluss über die Wertigkeit einer Proteinbande (positiv oder negativ) geben. Die statistische Auswertung dieser Daten mit dem Fisher-Test diente für jede Proteinbande der Festlegung des Punktes der besten Trennschärfe (Cutpoint) zwischen *H. pylori*-positiven und -negativen Patientenserum. Der Cutpoint war in diesem Zusammenhang definiert als die stärkste Intensität einer Proteinbande, bei der sie noch als negativ bewertet wurde.

Zur Erstellung eines Auswertungsschemas für den Westernblot wurden nach Berechnung der Cutpoints die positiven und negativen Proteinbanden in den beiden Vergleichsgruppen gezählt. Daraus wurde Spezifität, Sensitivität und Anteil richtiger Befunde (Resultatvalidität) jeder einzelnen Proteinbande rechnerisch ermittelt. Um zu überprüfen, ob eine Kombination mehrerer Proteinbanden bei der Interpretation diese Kriterien noch verbessern konnte, wurden das Auftreten von 10 Proteinbanden mit hoher Spezifität und relativ hoher Sensitivität (120, 72, 35, 31, 30.5, 27, 26, 23, 17 und 15.5 kDa) auf den UreA-negativen Westernblots ausgewertet.

3.8 Untersuchung der Proteinbande CagA auf dem Westernblot

Die vielfach in der Literatur als Pathogenitätsfaktor beschriebene Proteinbande CagA sollte auch auf unserem Westernblot auf ihren Nutzen hinsichtlich des Erkennens einer Infektion mit stärker pathogenen *H. pylori*-Stämmen überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden die *H. pylori*-positiven Patienten nach ihrem Gastroskopie-befund in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Häufigkeit der CagA-Bande auf Westernblots von Patienten mit Ulcus ventriculi oder Ulcus duodeni wurden mit der Häufigkeit bei Patienten mit anderen Diagnosen (zusammengefasst: Gastritis, Duodenitis, Refluxösophagitis und Gallereflux) und mit einem Normalbefund verglichen.

Zur Untersuchung einer Korrelation zwischen dem Auftreten der CagA-Bande auf dem Westernblot und dem Schweregrad / Aktivitätsgrad der B-Gastritis sowie der Manifestation einer intestinalen Metaplasie oder Schleimhautatrophie wurden deren Häufigkeiten bei CagA-positiven und -negativen Patienten der *H. pylori*-positiven Gruppe verglichen.

4 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse dieser Arbeit setzen sich aus zwei Teilen zusammen. Der erste Teil basiert auf der Auswertung der Fragebögen, die von den beteiligten Ärzten und von den Patienten ausgefüllt wurden. Die Daten dienen der genaueren Beschreibung des Patientenkollektives und dem Vergleich der *H. pylori*-positiven mit der *H. pylori*-negativen Patientengruppe. Bei der Auswertung wurden jeweils folgende Kriterien der beiden Gruppen gegenüber gestellt: Alter, gastroscopische Diagnosen, histologische Diagnosen, Beschwerdesymptomatik sowie unterschiedliche Risikofaktoren für das Auftreten von Magenbeschwerden.

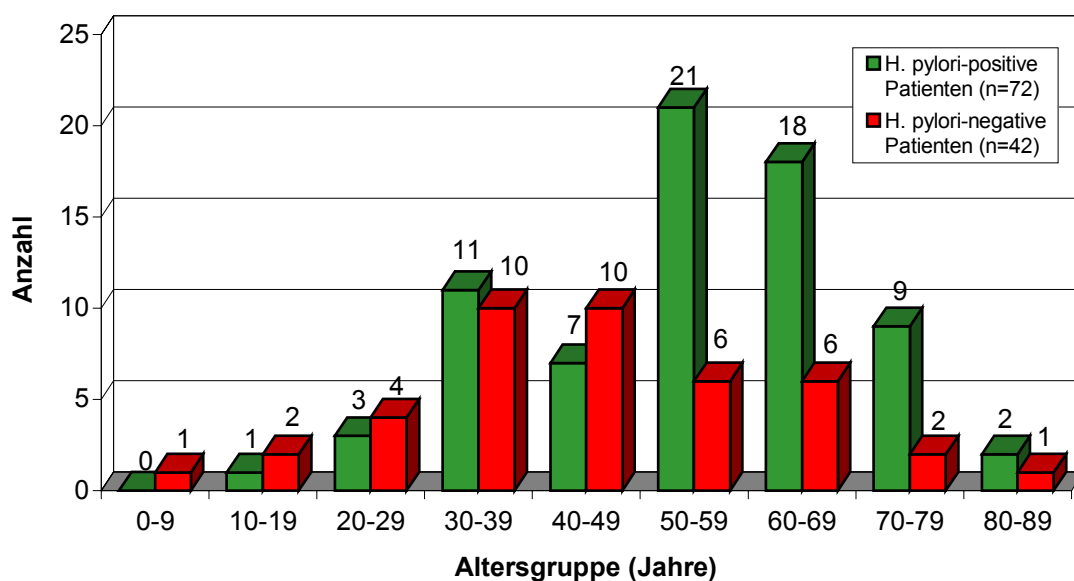
Im zweiten Teil werden die Ergebnisse des *Helicobacter pylori* Westernblots dargestellt. Nach der Identifizierung der immunreaktiven Proteinbanden und der statistischen Auswertung des Westernblots werden diese Ergebnisse mit den Validitätskriterien eines kommerziellen ELISA verglichen. Am Ende stehen die Ergebnisse der Untersuchung der Proteinbande CagA als Pathogenitätsfaktor.

4.1 Analyse des Patientenkollektives

Alter

Insgesamt 114 Patientenseren wurden in diese Studie aufgenommen. In der *H. pylori*-positiven Gruppe betrug das Alter 19 bis 83 Jahren (Median 57 Jahre), die *H. pylori*-negativen Patienten waren zwischen 7 und 85 Jahren alt (Median 42 Jahre) (siehe Abbildung 4.1).

Abbildung 4.1 Altersverteilung der *H. pylori*-positiven und -negativen Patienten



Gastroskopische Diagnosen

Für diese Studie wurden die gastroskopischen Untersuchungsbefunde von insgesamt 101 Patienten ausgewertet. In der Gruppe der *H. pylori*-positiven Patienten wurde als häufigste gastroskopische Diagnose eine Gastritis gestellt. 31 der 71 untersuchten Patienten wiesen eine reine Gastritis auf, in weiteren 16 Fällen lag sie zusätzlich zu anderen pathologischen Veränderungen vor. An zweiter Stelle imponierten Ulcera duodeni, die insgesamt in 14 Fällen gastroskopisch entdeckt wurden. Ulcera ventriculi sowie eine Refluxösophagitis wurden bei jeweils 9 Patienten diagnostiziert. Bei 5 Patienten bestand gastroskopisch kein pathologischer Befund.

Unter den 30 gastroskopisch untersuchten *H. pylori*-negativen Patienten war mit 17 Fällen der makroskopische Normalbefund die meist gestellte Diagnose. Eine Gastritis bestand in 12 Fällen, Ulcera duodeni oder ventriculi wurden im Kontrast zur *H. pylori*-positiven Gruppe nicht beschrieben. Zusätzlich zur Gastritis bestand bei 4 Patienten

eine Refluxösophagitis, und ein Patient wies gastroscopische Zeichen einer aphtösen Bulbitis auf. Bei einem Patienten zeigte sich allein ein Gallereflux.

Die Verteilung der einzelnen Diagnosen finden sich in den Balkendiagrammen der Abbildungen 4.2 und 4.3. Da auf dem Fragebogen Mehrfachnennungen bei gastroscopischen Diagnosen möglich waren, ergab sich eine Gesamtsumme an Diagnosen, die über der Anzahl der Patienten lag.

Abbildung 4.2 **Gastroskopische Diagnosen**
der *H. pylori*-positiven Patienten (n=72)

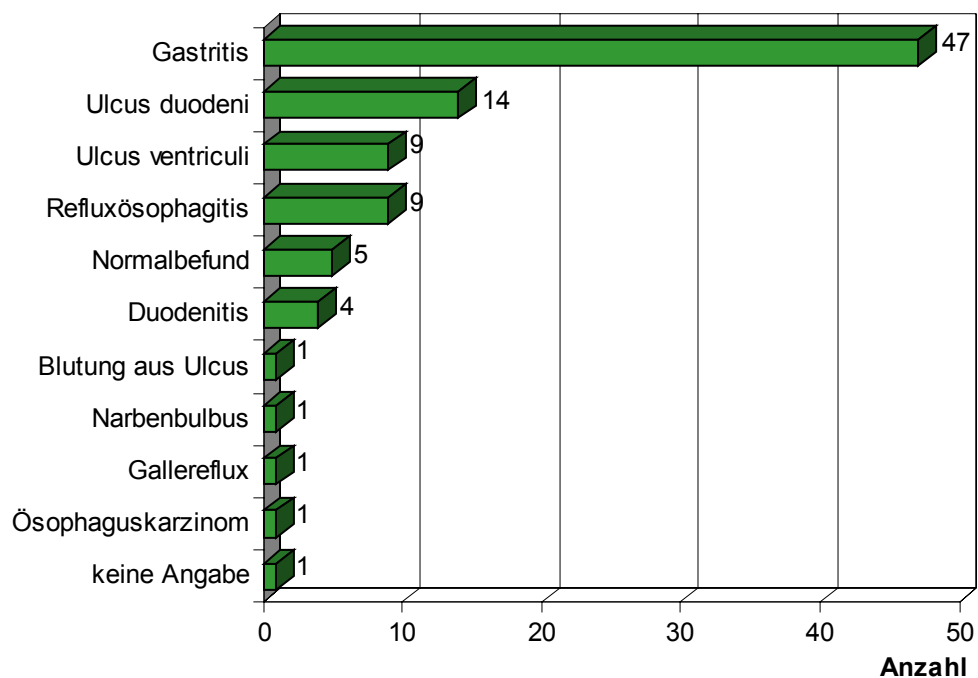
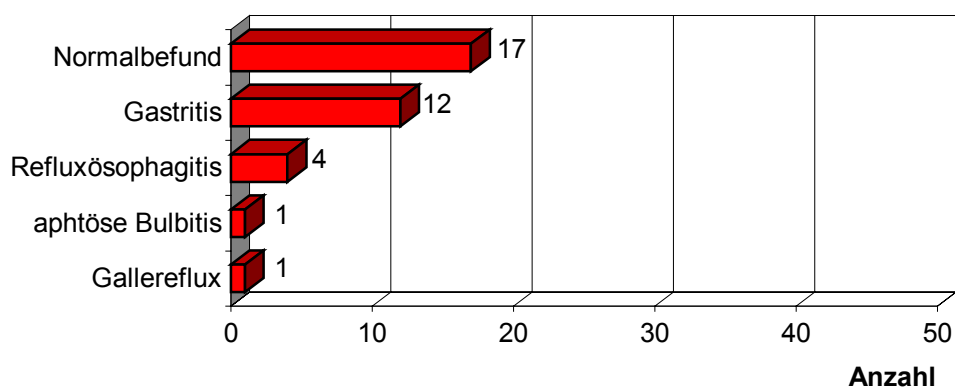


Abbildung 4.3 **Gastroskopische Diagnosen**
der *H. pylori*-negativen Patienten (n=30)



Histologische Diagnosen

Über insgesamt 102 Patienten lagen histologische Diagnosen aus gastroscopisch gewonnenen Biopsien des Magens, des Duodenums oder des Ösophagus vor. Alle 72 *H. pylori*-positiven Patienten wiesen bei der histologischen Beurteilung eine chronische Antrumgastritis (B-Gastritis) auf. In Kombination mit der Gastritis wurden außerdem in 4 Fällen *Ulcer ventriculi* sowie bei einem Patienten ein Magenkarzinom diagnostiziert. Bei 3 weiteren Patienten lagen als Zweitdiagnose pathologische Ösophagusbefunde, und bei zwei Patienten gering aktive chronische Duodenitiden vor (siehe Abbildung 4.4). Histologische Zusatzbefunde, die in den Biopsien der *H. pylori*-positiven Patienten mit B-Gastritis erhoben wurden, sind in Tabelle 4.1 differenziert.

Abbildung 4.4 **Histologische Hauptdiagnosen**
der *H. pylori*-positiven Patienten (n=72)

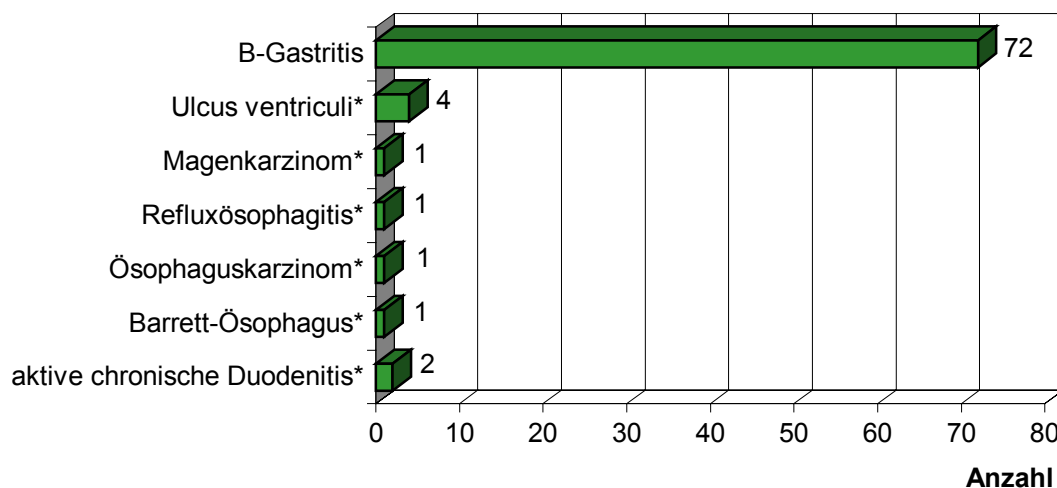


Tabelle 4.1 **Histologische Zusatzbefunde der**
***H. pylori*-positiven Patienten mit B-Gastritis (n=72)**

Zusatzbefund	Anzahl
intestinale Metaplasie	18
herdförmige Atrophie	10
lymphofollikuläre Hyperplasie	6
entzündliches Ödem	5
Schleimhauterosionen	3
foveoläre Hyperplasie	3
petechiale Blutungen	2

Die genauere Klassifikation der B-Gastritiden unserer *H. pylori*-positiven Patienten ergab einen überwiegenden Anteil an aktiven chronischen Antrumgastritiden mäßigen Schweregrades (40 von 72 Patienten) (siehe Abbildung 4.5). In Bezug auf den Aktivitätsgrad der B-Gastritis lag der Schwerpunkt auf den Graden 1 und 2, die zusammen bei 58 Patienten des Gesamtkollektives diagnostiziert wurden (siehe Abbildung 4.6).

Abbildung 4.5 **Schweregrad der B-Gastritis**
der *H. pylori*-positiven Patienten (n=72)

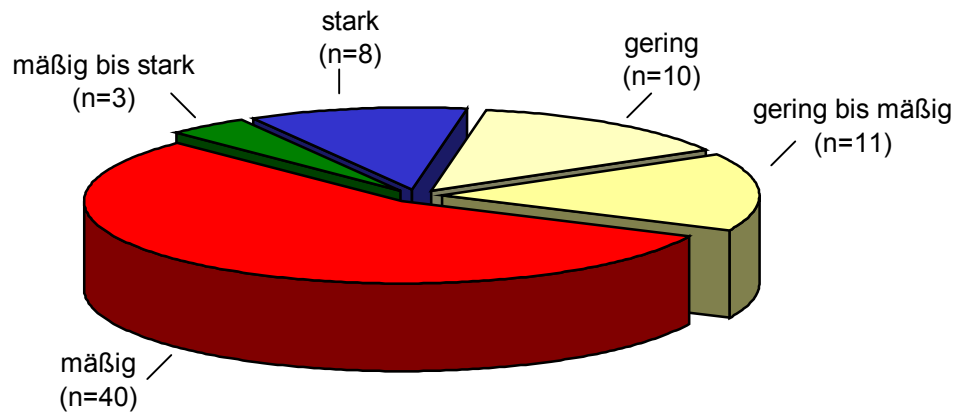
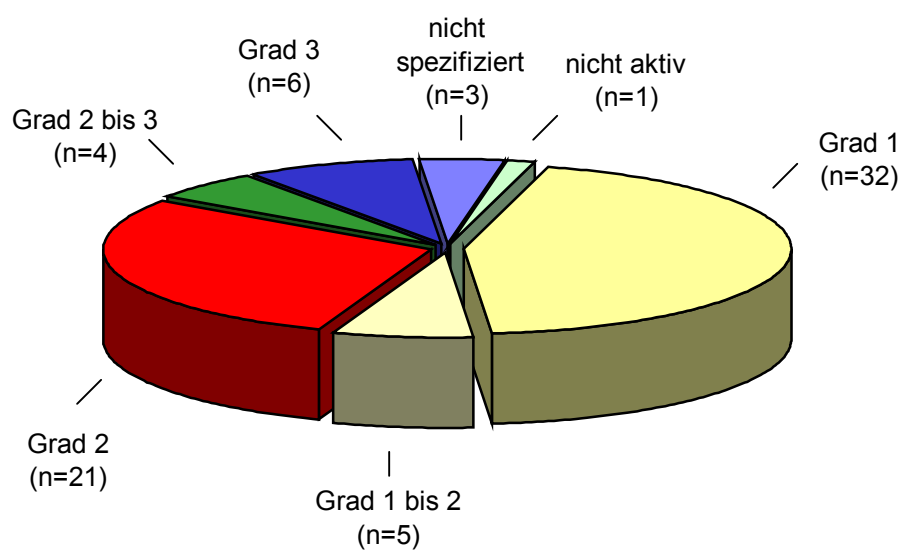
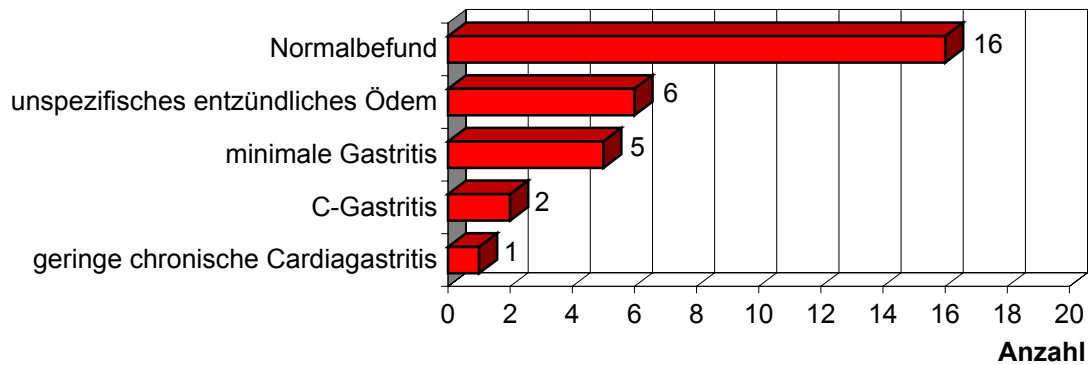


Abbildung 4.6 **Aktivitätsgrad der B-Gastritis**
der *H. pylori*-positiven Patienten (n=72)



Während keine der Biopsien der *H. pylori*-positiven Patienten einen Normalbefund zeigte, war dies bei 16 der 30 histologisch untersuchten *H. pylori*-negativen Patienten der Fall. In dieser Gruppe wurden neben zwei C-Gastritiden hauptsächlich leichte pathologische Befunde erhoben, wie unspezifische entzündliche Ödeme und mini-male Gastritiden. Bei nur einem Patienten bestand eine geringe aktive chronische Cardia gastritis mit einer mäßigen aktiven chronischen erosiven Duodenitis. Ulzera, Karzinome oder andere Zusatzdiagnosen waren histologisch nicht nachweisbar (siehe Abbildung 4.7).

Abbildung 4.7 **Histologische Hauptdiagnosen**
der *H. pylori*-negativen Patienten (n=30)



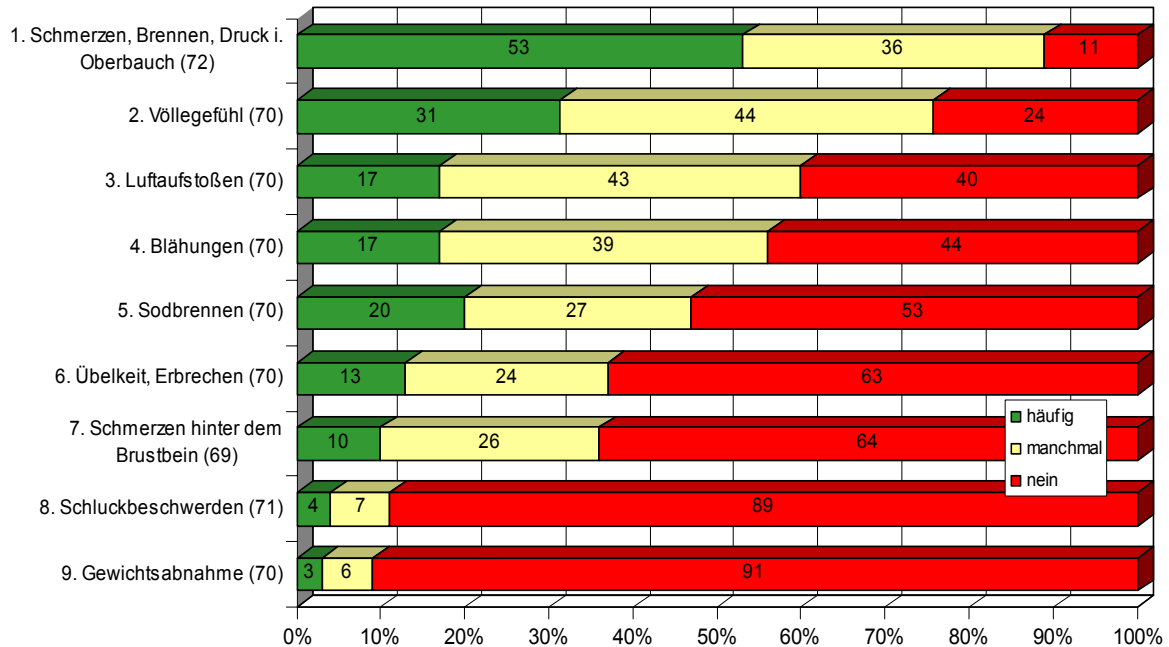
Beschwerdesymptomatik

Auf dem *Fragebogen an Patienten vor einer Magenspiegelung* (siehe Anhang) hatten die Patienten die Möglichkeit, bei neun vorgegebenen Beschwerden jeweils zu differenzieren, ob diese häufig, manchmal oder nicht empfunden wurden. Bei der Auswertung stellten sich Schmerzen, Brennen oder Druck im Oberbauch sowohl in der *H. pylori*-positiven als auch -negativen Patientengruppe als Hauptbeschwerden heraus. In über der Hälfte der Fälle wurden sie als häufig auftretende Beschwerden angegeben, während nur 11 bzw. 29% der Patienten gar nicht darüber klagten. Weiterhin imponierten in beiden Gruppen als Leitsymptome Völlegefühl, Luftaufstoßen und Blähungen. Sodbrennen wurde von rund der Hälfte aller Patienten manchmal oder häufig beklagt. Weitere Symptome, wie z.B. Übelkeit und Erbrechen, traten unregelmäßiger auf. Während 89% der *H. pylori*-positiven Patienten zu der Frage nach Schluckbeschwerden *nein* angaben, so litten 38% der *H. pylori*-negativen Patienten zumindest manchmal darunter.

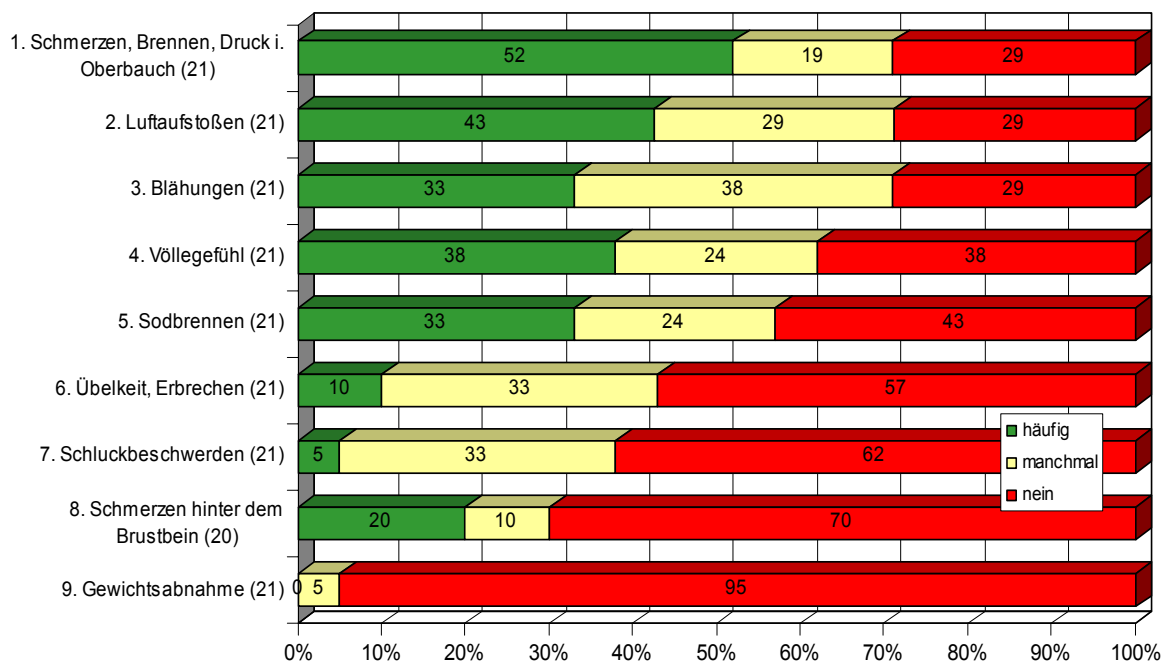
Die prozentualen Häufigkeiten der einzelnen Beschwerden in den zwei Vergleichsgruppen sind in den Balkendiagrammen der Abbildung 4.8 dargestellt. Der Übersichtlichkeit halber wurde jeweils eine Reihenfolge erstellt, die sich an der aufsteigenden Häufigkeit der Angabe *nein* orientierte.

Abbildung 4.8

Beschwerden der *H. pylori*-positiven Patienten



Beschwerden der *H. pylori*-negativen Patienten



Zahlen in Klammern entsprechen berücksichtigter Anzahl von Patienten

Risikofaktoren

Bei der Auswertung der Patientenangaben bezüglich der Risikofaktoren fiel ein deutlich höherer Anteil an Zigaretten-Rauchern unter den *H. pylori*-negativen Patienten (48%) im Vergleich zu den *H. pylori*-positiven Patienten (28%) auf. Auch der Faktor *Stress* wurde häufiger von *H. pylori*-negativen Patienten angegeben (63% vs. 41%). Während die Hälfte der *H. pylori*-positiven Patienten mit einem Body Mass Index (BMI) über 25 kg/m² als übergewichtig angesehen werden mussten, war es in der Vergleichsgruppe lediglich ein Fünftel. Die tägliche Einnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAR) wurde in beiden Gruppen von je 10% der Patienten bestätigt, während insgesamt eine Voroperation am Gastrointestinaltrakt zu vernachlässigen war (siehe Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2 **Häufigkeiten von Risikofaktoren für die
Begünstigung von Magenbeschwerden**

Risikofaktor	<i>H. pylori</i> -positive Patienten		<i>H. pylori</i> -negative Patienten	
Zigaretten	19/69	(28%)	10/21	(48%)
Stress	28/69	(41%)	12/19	(63%)
Übergewicht	37/71	(52%)	4/20	(20%)
regelmäßig NSAR	7/69	(10%)	2/21	(10%)
Operation an Magen, Darm oder Speiseröhre	1/70	(1%)	0/21	(0%)

4.2 Evaluierung des *Helicobacter pylori*-Westernblots

4.2.1 Identifizierung *H. pylori*-eigener Proteine auf dem Westernblot mit Hilfe spezifischer Antikörper

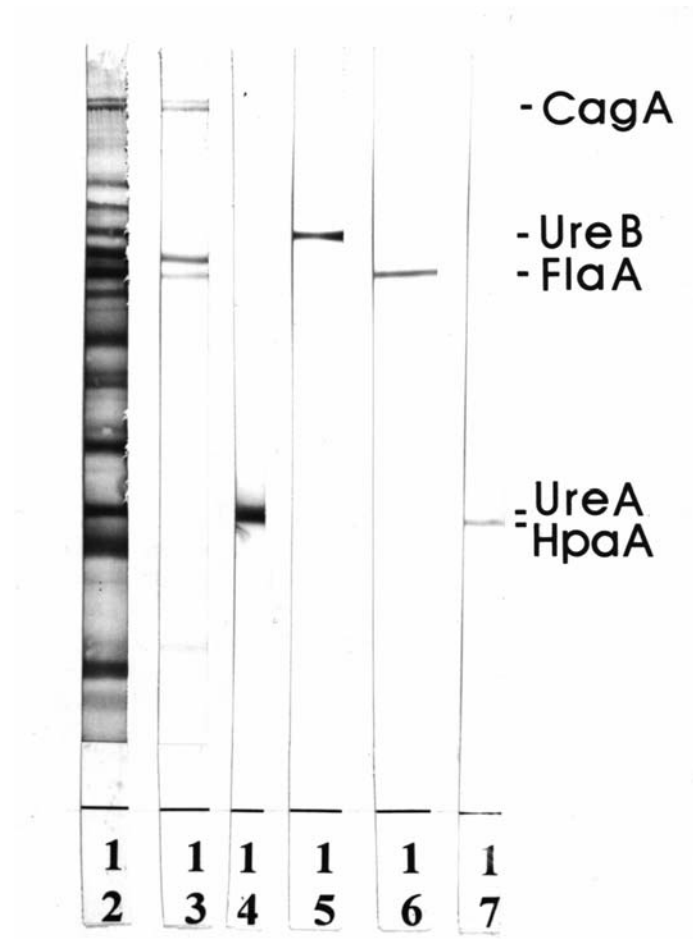
Durch Inkubation der *Helicobacter pylori* Westernblot-Streifen mit den spezifischen Antikörpern konnten 5 typische *H. pylori*-Proteine auf dem Westernblot identifiziert werden. 4 Antikörper detektierten jeweils genau eine Proteinbande auf dem Westernblot: HpaA (29 kDa), UreA (30 kDa), FlaA (54 kDa) und UreB (61 kDa). Der Antikörper gegen CagA reagierte neben der detektierten hochmolekularen 120 kDa-Protein-bande noch mit drei weiteren niedermolekularen Proteinen (siehe Abbildung 4.9).

Nach Berechnung der Molekulargewichte der identifizierten Proteine ergab sich die in Tabelle 4.3 dargestellte Zuordnung der *H. pylori*-Proteine zu den entsprechenden Proteinbanden auf dem *Helicobacter pylori* Westernblot.

Tabelle 4.3 Zuordnung der *H. pylori*-eigenen Proteine zu Proteinbanden auf dem Westernblot

<i>H. pylori</i> -eigenes Protein	Proteinbande
HpaA	29 kDa
UreA	30 kDa
FlaA	54 kDa
UreB	61 kDa
CagA	120 kDa

Abbildung 4.9 **Durch spezifische Antikörper identifizierte Proteinbanden auf dem Westernblot**



12: Westernblot inkubiert mit einem *H. pylori*-positiven Kontrollserum

13 - 17: Westernblots inkubiert mit den spezifischen Antikörpern gegen
CagA (13), UreA (14), UreB (15), FlaA (16), HpaA (17)

4.2.2 Identifizierung aller immunreaktiven Proteinbanden auf dem Westernblot

Die Bestandsaufnahme sämtlicher detektierter Proteinbanden und ihrer Intensitäten auf den 114 Westernblots der *H. pylori*-positiven und -negativen Patienten ist im Anhang (S. 83-84) dargestellt. Es ergab sich insgesamt eine Anzahl von 32 immun-reaktiven Proteinbanden mit Molekulargewichten von 120 kDa bis 13 kDa (Zusammenfassung siehe Tabelle 4.4)

Abbildung 4.10 Beispiel einiger repräsentativer Westernblots
H. pylori-positiver Patienten

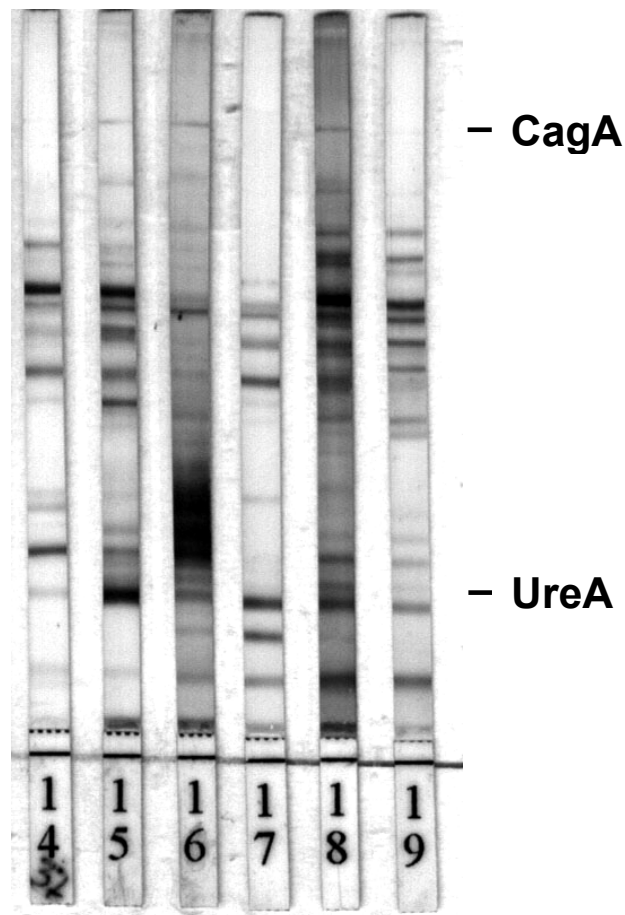


Tabelle 4.4 **Anzahl der abgelesenen Proteinbanden-Intensitäten**
auf den Westernblots beider Vergleichsgruppen

***H. pylori*-positive Patienten (n= 72)**

Bande kDa	Intensität			
	0	1	2	3
120	16	24	26	6
95	45	27	0	0
90	47	21	4	0
72	20	41	11	0
64	26	33	12	1
61	35	26	10	1
57	58	12	2	0
56	12	9	16	35
54	6	23	41	2
50	50	21	1	0
49	30	24	16	2
47	47	24	1	0
46	37	31	4	0
45	16	38	11	7
42	45	20	7	0
41	43	25	4	0
39	49	22	1	0
35	47	18	5	2
33	39	14	14	5
31	39	23	7	3
30.5	58	9	3	2
30	5	37	21	9
29	44	24	4	0
27	56	15	1	0
26	8	29	24	11
25.5	70	2	0	0
23	40	26	6	0
21	71	1	0	0
19	26	36	9	1
17	68	4	0	0
15.5	50	13	9	0
13	22	32	16	2

***H. pylori*-negative Patienten (n= 42)**

Bande kDa	Intensität			
	0	1	2	3
120	38	4	0	0
95	42	0	0	0
90	42	0	0	0
72	39	2	1	0
64	38	4	0	0
61	37	4	1	0
57	41	1	0	0
56	29	10	2	1
54	14	21	7	0
50	41	0	1	0
49	41	1	0	0
47	41	1	0	0
46	42	0	0	0
45	35	7	0	0
42	42	0	0	0
41	41	1	0	0
39	38	4	0	0
35	42	0	0	0
33	41	0	1	0
31	42	0	0	0
30.5	41	1	0	0
30	41	1	0	0
29	41	1	0	0
27	42	0	0	0
26	36	6	0	0
25.5	39	3	0	0
23	41	1	0	0
21	41	1	0	0
19	40	2	0	0
17	41	1	0	0
15.5	38	2	2	0
13	29	8	5	0

4.2.3 Statistische Auswertung des Westernblots

a) Errechnete Cutpoints der einzelnen Proteinbanden

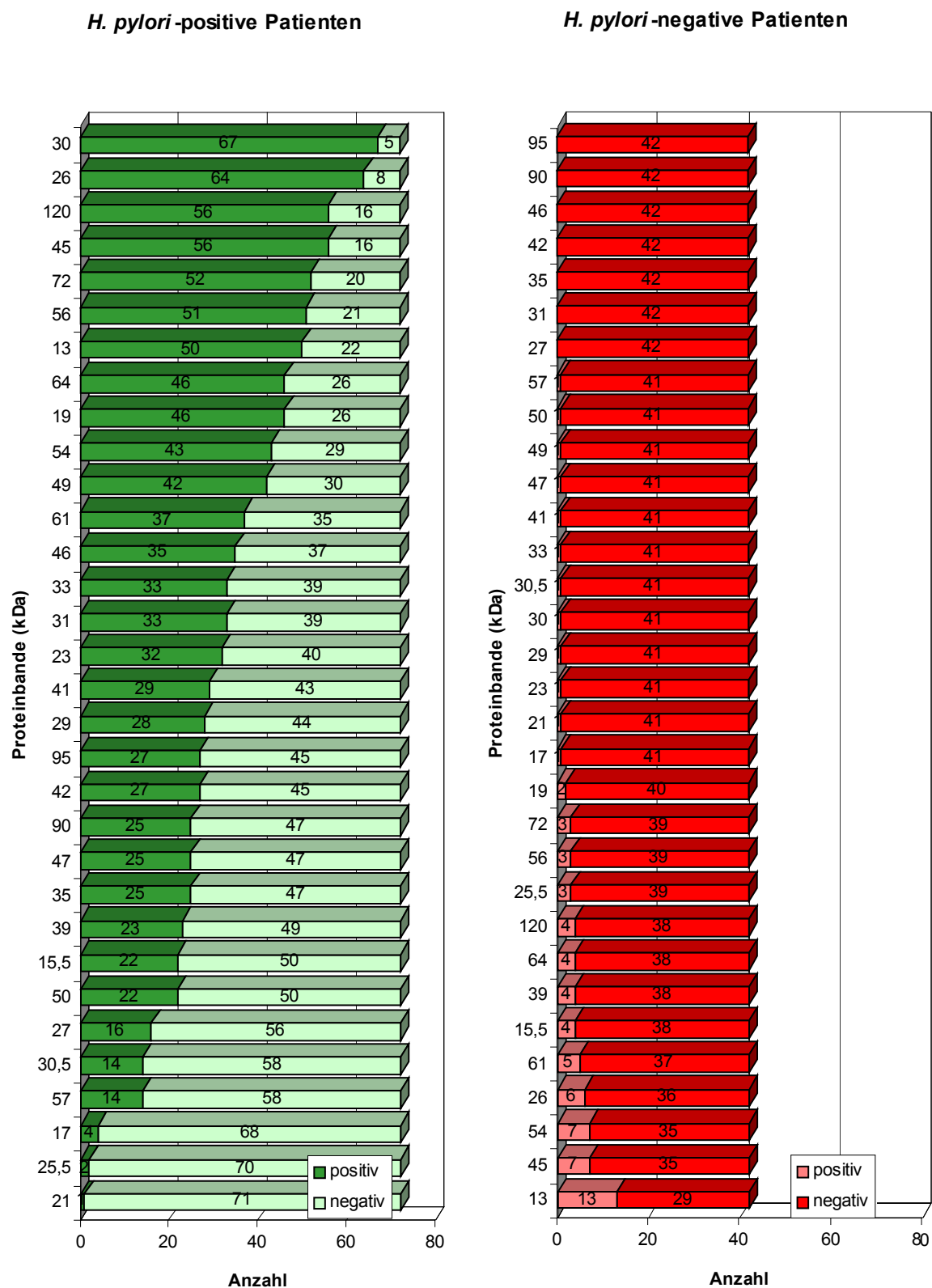
Der Fisher-Test ergab für die überwiegende Anzahl der Proteinbanden Cutpoints von 0. Lediglich bei der 56 kDa- und 54 kDa-Proteinbande wurde ein Cutpoint von 1 berechnet. Die nach diesem Beurteilungsschema errechneten Anzahlen der positiven und negativen Proteinbanden in den beiden Vergleichsgruppen sind in Tabelle 4.5 dargestellt. Die graphische Darstellung in Abbildung 4.11 zeigt besonders deutlich, wie unterschiedlich stark das Auftreten der einzelnen Proteinbanden mit dem *H. pylori*-Status der Patienten korrelierte. Die 30 kDa-Bande UreA war bei 67 der 72 *H. pylori*-positiven Patienten positiv, wobei sie nur bei 1 der 42 *H. pylori*-negativen Patienten auftrat. Antikörper gegen das 26 kDa-Protein war bei 64 der *H. pylori*-positiven Patienten und bei 6 der *H. pylori*-negativen Patienten nachweisbar, während es für das 120 kDa-Protein CagA bei 56 und 4 Patienten der jeweiligen Gruppe der Fall war.

**Tabelle 4.5 Anzahl positiver und negativer Proteinbanden
auf den Westernblots der beiden Vergleichsgruppen**

Proteinbande kDa	Cutpoint	Bewertung	<i>H. pylori</i> -Status	
			positiv	negativ
120	0	positiv	56	4
		negativ	16	38
95	0	positiv	27	0
		negativ	45	42
90	0	positiv	25	0
		negativ	47	42
72	0	positiv	52	3
		negativ	20	39
64	0	positiv	46	4
		negativ	26	38
61	0	positiv	37	5
		negativ	35	37
57	0	positiv	14	1
		negativ	58	41
56	1	positiv	51	3
		negativ	21	39
54	1	positiv	43	7
		negativ	29	35
50	0	positiv	22	1
		negativ	50	41
49	0	positiv	42	1
		negativ	30	41
47	0	positiv	25	1
		negativ	47	41
46	0	positiv	35	0
		negativ	37	42
45	0	positiv	56	7
		negativ	16	35
42	0	positiv	27	0
		negativ	45	42

Proteinbande kDa	Cutpoint	Bewertung	<i>H. pylori</i> -Status	
			positiv	negativ
41	0	positiv	29	1
		negativ	43	41
39	0	positiv	23	4
		negativ	49	38
35	0	positiv	25	0
		negativ	47	42
33	0	positiv	33	1
		negativ	39	41
31	0	positiv	33	0
		negativ	39	42
30,5	0	positiv	14	1
		negativ	58	41
30	0	positiv	67	1
		negativ	5	41
29	0	positiv	28	1
		negativ	44	41
27	0	positiv	16	0
		negativ	56	42
26	0	positiv	64	6
		negativ	8	36
25,5	0	positiv	2	3
		negativ	70	39
23	0	positiv	32	1
		negativ	40	41
21	0	positiv	1	1
		negativ	71	41
19	0	positiv	46	2
		negativ	26	40
17	0	positiv	4	1
		negativ	68	41
15,5	0	positiv	22	4
		negativ	50	38
13	0	positiv	50	13
		negativ	22	29

Abbildung 4.11 Anzahl positiver und negativer Proteinbanden



b) Spezifität, Sensitivität und Anteil richtiger Befunde der Proteinbanden

Die 32 Proteinbanden wiesen eine Spezifität von 69% bis 100% auf, wobei 27 Proteinbanden über 90% lagen. Die Proteinbanden mit 95, 90, 46, 42, 35, 31 und 27 kDa besaßen die höchste Spezifität von 100%. Mit 97,6% ebenfalls hochspezifisch waren die 57, 50, 49, 47, 41, 33, 30.5, 30 (UreA), 29 (HpaA), 23, 21 und 17 kDa-Proteinbanden. Auch die 19 kDa-Bande (96,2%), die 72, 56 und 25.5 kDa-Bande (jeweils 92,9%), sowie die 120 (CagA), 64, 39, und 15.5 kDa-Bande (jeweils 90,5%) wiesen eine Spezifität von über 90% auf. Darauf folgten die Proteinbanden mit Molekulargewichten von 61 kDa (UreB) (88,1%), 26 kDa (85,7%) und 54 (FlaA) und 45 kDa mit einer Spezifität von je 83,3%. Im Vergleich zu den anderen Proteinbanden war die 13 kDa-Bande mit 69% relativ unspezifisch (siehe Abbildung 4.12).

In der Sensitivität unterschieden sich die Proteinbanden erheblich stärker, als in ihrer Spezifität. Die Werte erstreckten sich zwischen 93,1% und 1,4%. Die 30 kDa-Bande (UreA) lag mit 93,1% deutlich an der Spitze, gefolgt von der 26 kDa-Bande mit 88,9%, der 120 kDa (CagA)- und 45 kDa-Bande mit jeweils 77,8%. Die Proteinbanden mit 72 kDa (72,2%) und 56 kDa (70,8%) hatten noch eine Sensitivität über 70%. 6 Proteinbanden wiesen Werte zwischen 70% und 50% auf: 13 kDa (69,4%), 64 kDa (63,9%), 19 kDa (63,9%), 54 kDa (59,7%), 49 kDa (58,3%) und 61 kDa (51,4%). Für weitere 14 Proteinbanden wurde eine Sensitivität zwischen 50% und 30% berechnet (46 kDa (48,6%), 33 und 31 kDa (je 45,8%), 23 kDa (44,4%), 41 kDa (40,3%), 29 kDa (38,9%), 95 und 42 kDa (je 37,5%), 90, 47 und 35 kDa (je 34,7%), 39 kDa (31,9%), 50 und 15,5 kDa (je 30,6%)). Die geringsten Werte (unter 30%) wurden für die 6 Banden mit 27 kDa (22,2%), 57 kDa und 30,5 kDa (je 19,4%), 17 kDa (5,6%), 25.5 kDa (2,8%) und 21 kDa (1,4%) ermittelt (siehe Abbildung 4.13).

Der aus Spezifität und Sensitivität errechnete Anteil richtiger Befunde (Resultatvalidität) ergab für die 32 Proteinbanden Werte zwischen 94,7% und 36%. UreA (30 kDa) stellte sich als die Proteinbande mit dem höchsten Anteil richtiger Befunde (94,7%) zur Beurteilung des *H. pylori*-Status heraus. An zweiter und dritter Stelle standen die 26 kDa-Proteinbande (87,7%) und CagA (120 kDa) mit 82,5%. Für die restlichen 29 Proteinbanden lag der Wert unter 80% (siehe Abbildung 4.14).

Die genaueren statistischen Berechnungen zur Bewertung des optimalen Trennpunktes für die 30 kDa-Bande UreA ergaben eine Spezifität von 97,6% (95%-Konfidenzintervall 0,874-0,999) und eine Sensitivität von 93,1% (95%-Konfidenzintervall

0,845-0,977). Der Likelihood Quotient eines positiven Befundes betrug 39,1 (95%-Konfidenzintervall 5,63-271,31) und der Likelihood Quotient eines negativen Befundes 0,07 (95%-Konfidenzintervall 0,031-0,166).

Abbildung 4.12

Spezifität der einzelnen Proteinbanden

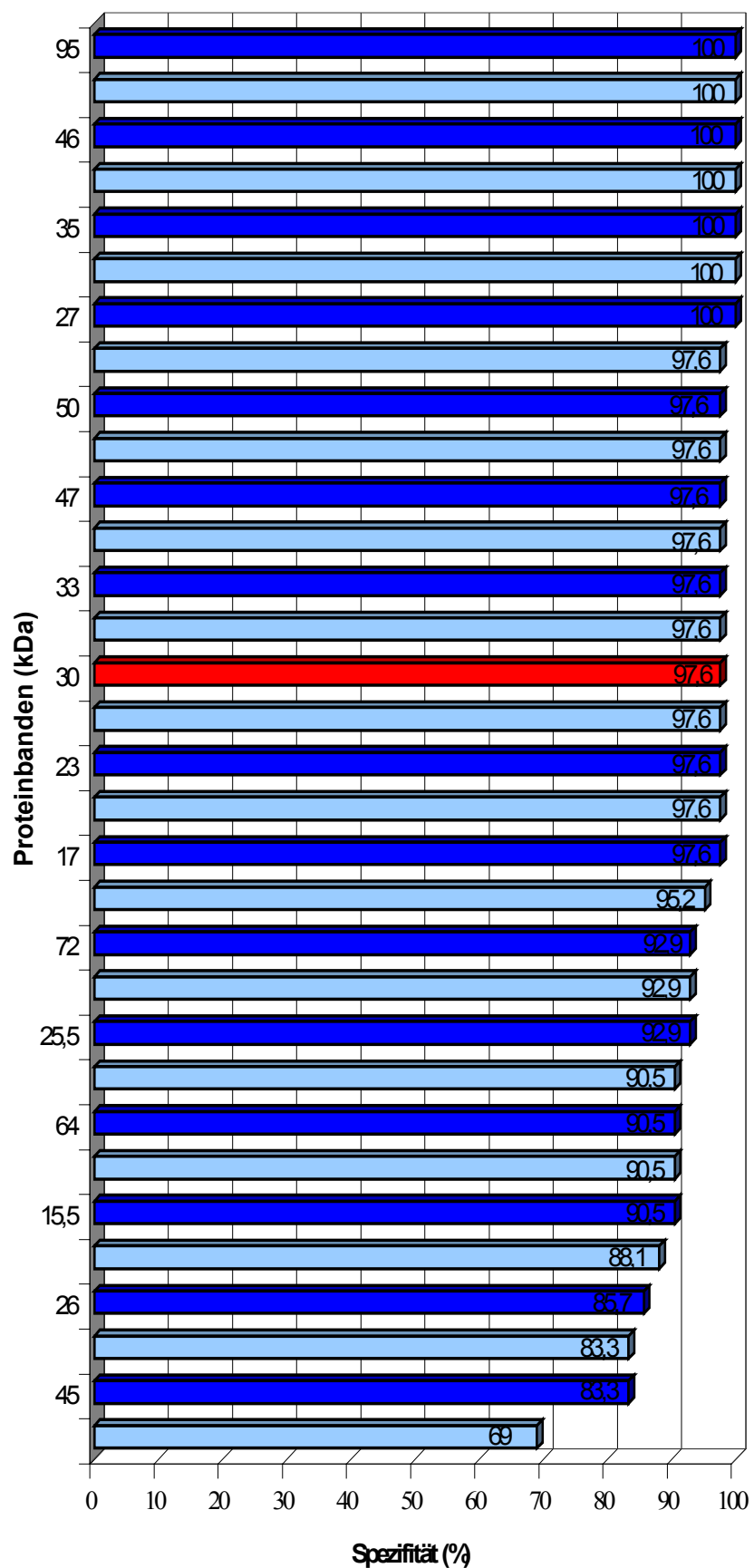


Abbildung 4.13

Sensitivität der einzelnen Proteinbanden

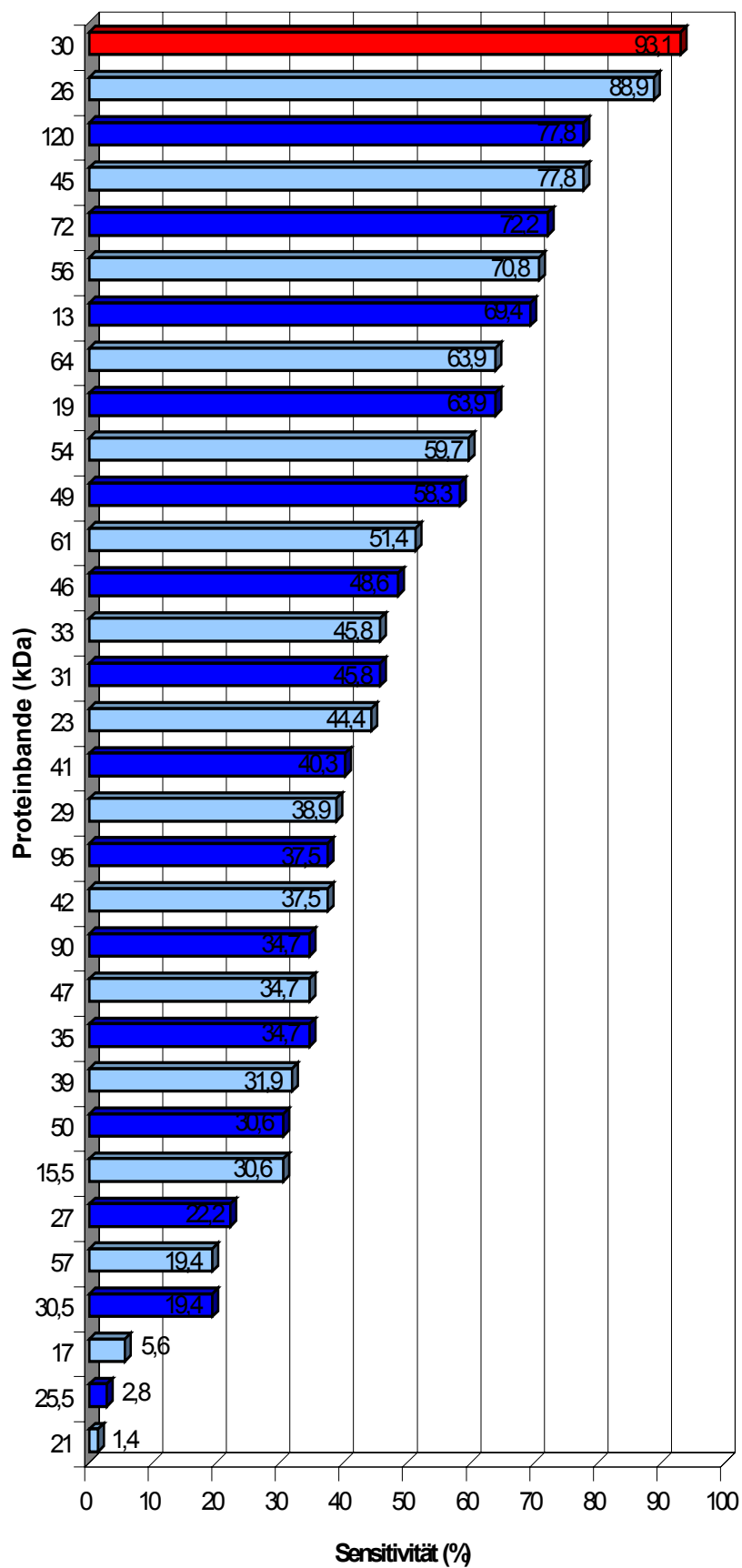
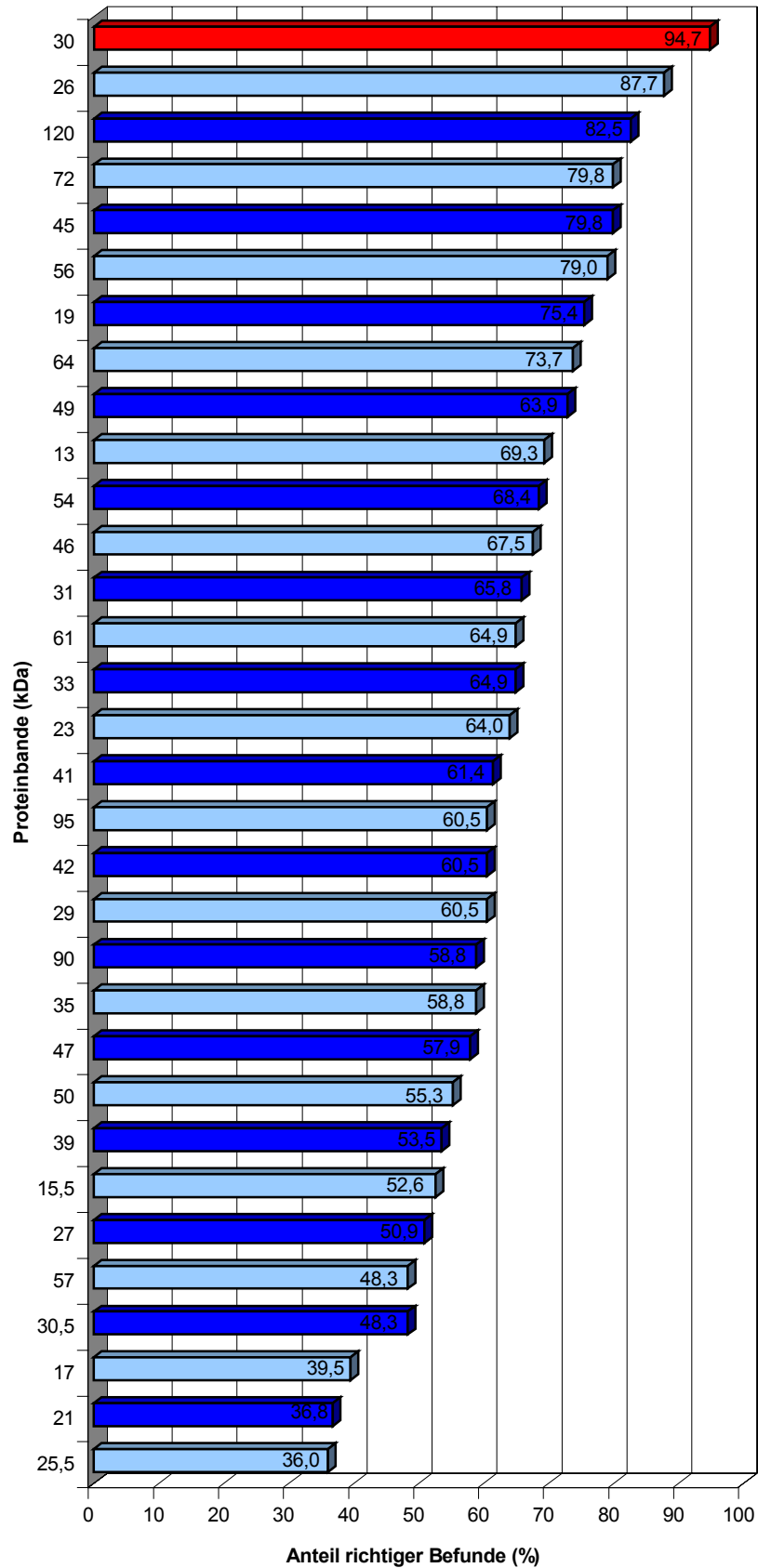


Abbildung 4.14 Anteil richtiger Befunde der einzelnen Proteinbanden



c) Versuch der Kombination mehrerer Proteinbanden zur Testauswertung

Die Kombination der Auswertung der 30 kDa-Bande UreA mit einzelnen anderen Proteinbanden hatte bei den meisten Proteinbanden entweder keinen Vorteil oder eine erhöhte Sensitivität bei Senkung der Spezifität (z.B. CagA, 26 kDa) zur Folge. Wurde bei negativer UreA-Bande eine der 3 Proteinbanden mit 35, 31, oder 30,5 kDa zur Beurteilung herangezogen, so konnten bis zu 2 der 114 Patientenseren zusätzlich richtig ihrem *H. pylori*-Status zugeordnet werden. Bei der Kombination von UreA mit der 31 kDa-Bande ergab sich somit ein Anteil richtiger Befunde von 96,5% (siehe Tabelle 4.6). Wurden alle 3 Proteinbanden berücksichtigt, und galt der Westernblot bei Auftreten der UreA-Bande oder einer dieser 3 Banden als positiv, konnten die Gütekriterien des Tests nicht weiter verbessert werden.

Tabelle 4.6 Gütekriterien des Tests bei Auswertung der 30 kDa-Bande in Kombination mit einzelnen anderen Proteinbanden

kombinierte Proteinbande	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Anteil richtiger Befunde (%)
120 kDa	97,2	90,5	94,7
72 kDa	94,4	92,9	93,9
35 kDa	94,4	97,6	95,6
31 kDa	95,5	97,6	96,5
30,5 kDa	94,4	97,6	95,6
27 kDa	94,4	95,2	94,7
26 kDa	94,4	85,7	90,4
23 kDa	94,4	95,2	94,7
17 kDa	94,4	95,2	94,7
15,5 kDa	95,8	88,1	93,0

4.2.4 Zusammenfassung der Evaluierungsergebnisse

Auf unserem *Helicobacter pylori* Westernblot wurden 32 immunreaktive Proteinbanden identifiziert. 5 Proteinbanden konnten mit Hilfe spezifischer Antikörper typischen *H. pylori*-Antigenen (CagA, UreB, FlaA, UreA und HpaA) zugeordnet werden. Mit Ausnahme zweier Banden (54 und 56 kDa) wurde auf dem Westernblot bereits eine schwach sichtbare Proteinbande als positiv bewertet. Die Mehrzahl der Proteinbanden stellte sich als hochspezifisch für eine Besiedelung mit *H. pylori* heraus, jedoch traten viele nur auf einer geringen Zahl von Westernblots auf, so dass die Sensitivität gering war. 3 Proteinbanden (54 kDa (FlaA), 45 und 13 kDa) zeigten eine Spezifität unter 85%.

Die 30 kDa-Proteinbande (UreA) hatte von allen Banden die höchste Sensitivität und die zweithöchste Spezifität. Daraus resultierte für UreA der größte Anteil richtiger Befunde von 94,7%. Die alleinige Auswertung dieser einzelnen Proteinbande zur Beurteilung des *H. pylori*-Status erzielte ausreichend gute Ergebnisse in unserem *Helicobacter pylori* Westernblot. Die richtigen Befunde des Tests konnten maximal um 2 von 114 durch zusätzliche Berücksichtigung der 31 kDa-Banden verbessert werden. Über Art oder Funktion oder Herkunft dieses Proteins, das auf 45,8% der Westernblots *H. pylori*-positiver, jedoch auf keinem der *H. pylori*-negativen Patienten auftrat, lagen uns keine Daten vor.

Als Schlussfolgerung aus diesen Daten wurde die 30 kDa-Bande UreA als bester Marker auf dem Westernblot für das Vorliegen von IgG-Serumantikörpern gegen *Helicobacter pylori* als Ausdruck einer Besiedelung des Magens mit dem Bakterium identifiziert. Auf diese Weise erzielte unser Test eine Spezifität von 97,6% (95%-Konfidenzintervall 0,874-0,999) und eine Sensitivität von 93,1% (95%-Konfidenzintervall 0,845-0,977). Der Likelihood Quotient eines positiven Befundes betrug 39,1 (95%-Konfidenzintervall 5,63-271,31) und der Likelihood Quotient eines negativen Befundes 0,07 (95%-Konfidenzintervall 0,031-0,166).

4.3 Vergleich des Westernblots mit einem kommerziellen ELISA

Von jedem der 114 Patientenseren wurde als serologische Vergleichsdiagnostik zusätzlich ein kommerzieller, in der Routinediagnostik etablierter ELISA durchgeführt.

In der Gruppe der 72 *H. pylori*-positiven Patienten wurden 65 Patientenseren richtig als positiv beurteilt, während sich 6 Seren im ELISA negativ darstellten. Ein Serum entzog sich mit dem Befund „fraglich“ der Diagnosestellung. Von den 42 *H. pylori*-negativen Patienten bestätigte sich die Diagnose im ELISA bei 31 Seren. In 2 Fällen wurden die Seren als positiv bewertet, und bei 9 Patientenseren blieb der serologische Status fraglich (siehe Tabelle 4.7).

Der durch den Westernblot diagnostizierte *H. pylori*-Status stimmte insgesamt in 108 von 114 Fällen mit der Einteilung der Patienten in die beiden Referenzgruppen überein. Im ELISA dagegen konnten nur 96 Patientenseren richtig beurteilt werden (siehe Tabelle 4.8).

Tabelle 4.7 Ergebnisse von ELISA und Westernblots im Vergleich

Patientengruppe	ELISA			Westernblot	
	negativ	positiv	fraglich	negativ	positiv
<i>H. pylori</i> -positive Patienten (n=72)	6	65	1	5	67
<i>H. pylori</i> -negative Patienten (n=42)	31	2	9	41	1

Tabelle 4.8 Gütekriterien von ELISA und Westernblot im Vergleich

Gütekriterium	ELISA	Westernblot
Spezifität	73,8%	97,6%
Sensitivität	90,3%	93,1%
Anteil richtiger Befunde	84,2%	94,7%

4.4 Bestätigung der Proteinbande CagA als Pathogenitätsfaktor

Mit Hilfe des spezifischen Kaninchen-Antikörpers gegen CagA konnte neben drei zusätzlich aufgetretenen Proteinbanden die 120 kDa-Bande auf dem Westernblot als CagA identifiziert werden. Die CagA-Bande trat bei 77,8% der *H. pylori*-positiven und bei 9,5% der *H. pylori*-negativen Patienten auf.

Bei der Untersuchung der CagA-Bande in Gruppen verschiedener Gastroskopie-diagnosen fiel auf, dass die Proteinbande häufiger auf Westernblots von Patienten mit einem Ulcusleiden (91%) auftrat, als bei solchen von Patienten mit anderen Diagnosen (71%). In der Gruppe der Patienten mit einem Ulcus duodeni war die CagA-Bande in 100% auf dem Westernblot nachweisbar, bei Patienten mit Ulcera ventriculi waren es 75%. Ein Ulcus ventriculi stellte sich histologisch als Magen-karzinom heraus. Ein Patient mit positiver CagA-Bande bot gastroskopisch gleich-zeitig je ein Ulcus ventriculi und duodeni. In dem Patientenkollektiv mit anderen pathologischen ösophagogastrroduodenalen Befunden betrug der Anteil CagA-positiver Westernblots 75%. Bei gesonderter Betrachtung der Patienten mit gastro-skopischen Normalbefunde sank die Häufigkeit der CagA-Bande auf 40% (siehe Tabelle 4.9).

Tabelle 4.9 Häufigkeit der CagA-Bande auf Westernblots
***H. pylori*-positiver Patienten nach gastrokopischen Diagnosen**

Diagnose	CagA-positive Westernblots
Ulcus ventriculi ¹ (n=8)	6 (75%) ¹
Ulcus duodeni (n=13)	13 (100%)
Ulcera ventriculi et duodeni (n=1)	1 (100%)
Gastritis, Duodenitis, Gallereflux oder Refluxösophagitis ² (n=44)	33 (75%) ²
Normalbefund (n=5)	2 (40%)

¹ davon histologisch 1 Magenkarzinom

² davon 1 Ösophaguskarzinom

Hinsichtlich des Schweregrades der B-Gastritis ergab sich eine größere Zahl stärkerer Entzündungen bei den Patienten mit CagA-positiven Westernblots. Knapp 20% wiesen eine mäßige bis starke oder starke aktive chronische Antrumgastritis auf, wohingegen diese Schweregrade bei den CagA-negativen Patienten nicht auftraten. Während also 100% der Patienten mit diesen starken Antrumgastritiden Anti-CagA-Antikörper bildeten, lag der Prozentsatz bei Patienten mit geringem (60%) oder gering bis mäßigem (46%) Schweregrad der Gastritis zusammen nur noch bei 52%. Bei Patienten mit mäßiger aktiver chronischer Antrumgastritis wurde zu 85% die CagA-Bande im Westernblot nachgewiesen.

Eine ähnliche Tendenz ließ sich bezüglich des Aktivitätsgrades verzeichnen. Die Grade 2 bis 3 oder 3 wurden bei 17,8% der Anti-CagA-Antikörper-positiven, jedoch bei 0% der -negativen Patienten diagnostiziert. Einer 100%igen Nachweisrate von Anti-CagA bei Patienten mit hohem Aktivitätsgrad der B-Gastritis standen 71% CagA-positive Westernblots bei den leichten Aktivitätsgraden 0 (100%), 1 (72%) und 1 bis 2 (60%) gegenüber. Eine Gastritis des Aktivitätsgrades 2 war zu 85 % mit positiven Anti-CagA-Antikörpern verbunden.

Die Betrachtung der histologischen Zusatzbefunde bei B-Gastritis zeigte, dass die intestinale Metaplasie in 83% und die Schleimhautatrophie in 80% der Fälle mit einer Immunantwort gegen CagA auf dem Westernblot verbunden waren (siehe Tabelle 4.10).

Tabelle 4.10 Häufigkeit der CagA-Bande auf Westernblots
***H. pylori*-positiver Patienten nach histologischen Diagnosen**

Schweregrad der B-Gastritis		CagA-positive Westernblots	
gering	(n=10)	6	(60%)
gering bis mäßig	(n=11)	5	(46%)
mäßig	(n=40)	34	(85%)
mäßig bis stark	(n=3)	3	(100%)
stark	(n=8)	8	(100%)

Aktivitätsgrad der B-Gastritis		CagA-positive Westernblots	
0	(n=1)	1	(100%)
1	(n=32)	23	(72%)
1 bis 2	(n=5)	3	(60%)
2	(n=21)	18	(85%)
2 bis 3	(n=4)	4	(100%)
3	(n=6)	6	(100%)
nicht spezifiziert	(n=3)	1	(33%)

Zusatzbefunde	CagA-positive Westernblots	
intestinale Metaplasie (n=18)	15	(83%)
Schleimhautatrophie (n=10)	8	(80%)

5 DISKUSSION

5.1 Diskussion der Evaluierungsergebnisse

In dieser Arbeit wird ein neuer Westernblot zur Erkennung von IgG-Serumantikörpern gegen *Helicobacter pylori* vorgestellt und evaluiert.

Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurden 5 Antigene auf dem Westernblot als typische *H. pylori*-Proteine identifiziert (120 kDa =CagA, 61 kDa =UreB, 54 kDa =FlaA, 30 kDa =UreA und 29 kDa =HpaA). Dies erlaubt eine Übertragung der wissenschaftlichen Erkenntnisse über diese Proteine auf die entsprechenden Westernblot-Antigene. So ist eine bessere Beurteilung der Relevanz der vorliegenden Daten möglich. Weiterhin konnte eine erfolgreiche Herstellung des Westernblots mit wichtigen *H. pylori*-Proteinen und eine korrekte Molekulargewichtsbestimmung angezeigt werden.

Der Antikörper gegen CagA reagierte zwar mit mehreren Antigenen schwach auf unserem Westernblot, was auf Unreinheiten zurückzuführen sein kann, jedoch ist unter Berücksichtigung der Herstellerangaben und der Literatur eine eindeutige Zuordnung zur 120 kDa-Bande möglich.

Es wurde ein Interpretationsschema für den Test entwickelt, bei dem die Beurteilung einer einzigen Proteinbande ausreichte. Die 30 kDa-Bande, die mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers als Urease-Untereinheit A identifiziert wurde, stellte sich als bester Marker für eine Infektion des Patienten mit *H. pylori* heraus, und der Westernblot erzielte somit eine Spezifität von 97,6%, eine Sensitivität von 93,1% und einen Anteil richtiger Befunde (Resultatvalidität) von 94,7%. Er kann also als zuverlässiger Test in der serologischen *H. pylori*-Diagnostik angesehen werden, und seine Ergebnisse sind im Vergleich zu denen bereits beschriebener Westernblots durchaus als gut einzustufen. Hinsichtlich der Spezifität scheint er sogar einen Vorteil zu bieten.

In der einfachen Interpretation ist dieser Westernblot anderen Tests mit zum Teil komplizierten Auswertungsschemata überlegen. Aucher et al. [6] beschrieben einen Immunoblot mit 12 immunreaktiven Proteinbanden. Das Vorhandensein von mindestens einer der drei Banden von 54, 35 oder 42 kDa galt als bester Marker für eine *H. pylori*-Infektion (Sensitivität 95%, Spezifität 82%). Der Immunoblot von Nilsson et al. [40] erreichte bei einer Spezifität von 92,5% eine Korrelation mit *H. pylori*-Kultur-positiven Patienten von 97,5%, wenn Banden von 110/120 kDa und/oder zwei von fünf Proteinen niedrigen Molekulargewichts (26, 29, 30, 31 und 33 kDa) auftraten. Eine IgG-

Antikörperantwort auf Proteine mittleren Molekulargewichts (43 bis 66 kDa) wurde als unspezifisch eingeschätzt. Andersen und Espersen [1] entdeckten bei 97% der *H. pylori*-positiven Patienten IgG-Antikörper gegen ein oder mehrere Polypeptide mit 36, 30, 27, 25 oder 19 kDa, jedoch reagierten auch 18% der Seren der *H. pylori*-negativen Patienten in gleicher Weise. Karvar et al. [23] bewerteten ihren Immunoblot als positiv, wenn IgG-Antikörper gegen mindestens ein Protein hohen Molekulargewichts (87 bis 128 kDa) oder gegen mindestens zwei Proteine niedrigen Molekulargewichts (22 bis 33 kDa) nachgewiesen werden konnten (Sensitivität 98%, Spezifität 71%).

Die Ergebnisse dieser Arbeiten, dass Proteinbanden aus dem hochmolekulargewichtigen Bereich, insbesondere die 120 (128) kDa-Bande CagA, sowie Proteinbanden mit niedrigen Molekulargewichten besonders gut zur *H. pylori*-Diagnostik geeignet sind, lassen sich in der vorliegenden Arbeit bestätigen. Nach UreA wiesen die 26 kDa-Bande und CagA den höchsten Anteil richtiger Befunde auf. Ein 26 kDa-Protein wurde in einer Studie als speziesspezifisches Antigen von *H. pylori* identifiziert [41]. Ob dieses Protein mit unserem Antigen gleichen berechneten Molekulargewichts übereinstimmt, lässt sich derzeit nicht beantworten. Es erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da unser Protein nur eine Spezifität von 85,7% aufweist. Dieses Beispiel verdeutlicht die schlechte Vergleichbarkeit der Proteinbanden auf verschiedenen Westernblots, die in unterschiedlichen Herstellungsweisen und Ungenauigkeiten bei der Molekulargewichtsbestimmung begründet ist. So könnte auch unser 27 kDa-Protein mit einer Spezifität von 100% dem beschriebenen Protein entsprechen.

Weitere 6 Antigene (95, 90, 46, 42, 35 und 31 kDa) zeigten auf dem neuen Westernblot eine 100%-ige Spezifität. Genauere Informationen zu diesen Proteinen liegen nicht vor. Da sie nur auf einer geringen Zahl der Westernblots der *H. pylori*-positiven Patienten auftraten, stellten sie sich nicht als geeignete Marker einer *H. pylori*-Infektion heraus.

Eine Kombination der UreA-Bande mit der 31 kDa-Bande konnte bei der Interpretation der Westernblots zwar 2 weitere Patientenserum richtig als positiv erkennen, jedoch erscheint uns diese Kombination angesichts des geringen Vorteils nicht sinnvoll. Die leichte Verbesserung der Sensitivität kann ebenso nur zufällig bedingt und bei der Testung eines größeren Patientenkollektives nicht mehr nachweisbar sein. In Zweifelsfällen könnten allerdings zusätzliche Proteinbanden bei der Interpretation des Westernblots sinnvoll sein.

Ebenso wie bei Nilsson et al. [40] stellten sich die Proteinbande mit 54 kDa (Flagellin) und die 45 kDa-Bande als relativ unspezifisch heraus. Dies ist für das Flagellin nicht verwunderlich, da auch andere Krankheitserreger wie z.B. *Campylobacter jejuni*,

Treponema pallidum und *Borrelia burgdorferi* mit Flagellen ausgestattet sind, und somit Kreuzreaktionen bei Seren von Patienten mit entsprechenden anderen Infektionen auftreten können [1, 22, 40, 41]. Auch von anderen *H. pylori*-Proteinen ist über Kreuzreaktionen berichtet worden [1, 21], wie z.B. das 60 kDa Heat-shock-Protein, das auch in anderen gram-negativen Bakterien vorkommt. Ein 14 kDa-Antigen zeigte eine hohe Kreuzreaktivität mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Campylobacter jejuni* [21]. Diese Antigene sind nicht mit Sicherheit Proteinen auf dem hier beschriebenen Westernblot zuzuordnen, jedoch fand sich in Übereinstimmung mit diesen Daten die Proteinbande mit der niedrigsten Spezifität (69%) bei 13 kDa. Weitere Untersuchungen des Westernblots hinsichtlich möglicher Kreuzreaktionen sollten zur Testsicherheit an diese Evaluierung angeschlossen werden.

Urease ist als für die Kolonisation von *H. pylori* essentielles Enzym mit weiteren, noch nicht vollständig geklärten Funktionen vielfach beschrieben worden, und die Struktur des Proteins mit den zwei Untereinheiten UreA und UreB ist gut bekannt [15, 35, 50, 52]. Da Urease grundsätzlich in jedem *H. pylori*-Bakterium enthalten ist, und stammesspezifische Unterschiede in der Proteinstruktur von UreA nicht beschrieben sind, erfüllt UreA wichtige Kriterien für den zuverlässigen Einsatz als Antigen in der serologischen *H. pylori*-Diagnostik. Es hat sich auch in anderen Studien bereits als sehr spezifisches 30 kDa-Antigen erwiesen [1, 23, 40], obwohl es noch weitere Bakterien mit Ureaseaktivität gibt, deren Proteinstrukturen der Urease von *H. pylori* ähneln [35, 52].

Es ist allerdings keine Publikation bekannt, in der UreA zur alleinigen Auswertung eines Westernblots vorgeschlagen wird. Eine Studie, die die IgG-Antikörperantwort auf Urease in der *H. pylori*-infizierten mexikanischen Bevölkerung mittels ELISA-Technik untersuchte, fand lediglich bei einem Anteil von 38% Anti-Urease-Antikörper [28]. Karvar et al. [23] identifizierte auf 69% der Westernblots seiner *H. pylori*-positiven Patienten IgG-Antikörper gegen UreA. Diese deutlich niedrigeren Zahlen im Vergleich zu unserem Ergebnis könnten beispielsweise durch eine geringere Empfindlichkeit der verwendeten Tests oder einen höher gewählten Cutpoint der 30 kDa-Bande bedingt sein, so dass niedrige Antikörpertiter nicht als positiv erkannt werden. Außerdem wird ein Vergleich verschiedener Bevölkerungen und Rassen dadurch erschwert, dass möglicherweise Unterschiede in der Immunantwort bestehen.

5 Seren der 72 *H. pylori*-positiven Patienten zeigten auf dem Westernblot keine IgG-Antikörperantwort auf das 30 kDa-Protein UreA. Weiterführende Untersuchungen

wären erforderlich, um die Frage zu klären, ob diese Seren mit Hilfe eines anders konzipierten Interpretationsschemas korrekt identifiziert werden könnten. Beispielsweise reagierten 3 der 5 Seren mit CagA, das mit einer Spezifität von 90,5% und einer Sensitivität von 77,8% ebenfalls für die Berücksichtigung bei der Auswertung in Frage käme. 2 dieser 3 anti-CagA-positiven, anti-UreA-negativen Patientenseren reagierten auch im ELISA positiv. Diese Ergebnisse stützen die Theorie, dass die Antikörperantwort auf *H. pylori* deutlich zwischen Individuen variiert, und dass kein einzelnes Antigen von allen positiven Seren erkannt wird [1, 36]. Der Grund dafür scheint in der Antigenvariabilität verschiedener *H. pylori*-Stämme liegen, deren Relevanz für die serologische Diagnostik sehr unterschiedlich eingeschätzt wird [16, 54].

2 der 5 auf dem Westernblot anti-UreA-negativen Patientenseren waren im ELISA ebenfalls negativ, ein Befund blieb fraglich. Der Grund für die Diskrepanz zwischen serologischen Ergebnissen und Antigennachweis könnte in einer fehlenden Sero-konversion trotz Infektion der Patienten, z.B. aufgrund einer Immunsuppression liegen.

Bei dem Vergleich unseres Tests mit dem kommerziellen ELISA erzielte der Westernblot sowohl eine höhere Sensitivität (93,1% vs. 90,3%) als auch eine deutlich bessere Spezifität (97,6% vs. 73,8%). Verantwortlich sind dafür insbesondere die 10 ELISA-Befunde, die als fraglich beurteilt werden mussten. Diese Seren wiesen einen isoliert erhöhten IgA-Titer auf, der sowohl für die Frühphase einer *H. pylori*-Infektion sprechen, als auch im Sinne einer unspezifischen Reaktion auftreten kann. Nachträglich musste der positive IgA-Titer bei 9 Seren aus der *H. pylori*-negativen Gruppe als unspezifische Reaktion gedeutet werden (vgl. S. 14). Der Vorteil des Westernblots liegt in der Erkennung einzelner Proteinbanden und somit der besseren Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Antikörperreaktionen, während der verwendete ELISA aus wenig oder ungereinigtem Antigen besonders der Gefahr unerkannter Kreuzreaktionen ausgesetzt ist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Erkenntnissen zahlreicher Studien [3, 40, 57]. Weiss et al. [56] fanden beim Vergleich zweier Tests mit dem gleichen Antigenmaterial bessere Ergebnisse im ELISA als im Westernblot. Mögliche Erklärungen seien Unterschiede bei der Bindung der Proteine auf Plastik oder Nitrocellulose und Strukturveränderungen der Proteine während der Elektrophorese oder des Blottings. Die Daten sind hier aufgrund unterschiedlicher Antigenzusammensetzungen nicht direkt vergleichbar. Weiterhin wurde im ELISA von Weiss et al. lediglich IgG, nicht aber das bei uns unspezifisch reagierende IgA

nachgewiesen. Die Studie zeigt jedoch, dass die ELISA-Technik nicht prinzipiell als ungenauer zu bewerten ist als die Westernblot-Methode.

5.2 Einfluss der Methodik auf die Ergebnisse

Aus dem oben genannten Grund der Variabilität in Antigenen und Immunantwort basieren die Mehrzahl der serologischen Tests nicht auf dem Nachweis eines einzelnen Antigens, sondern auf der Kombination mehrerer spezifischer Proteine. Es sind unterschiedliche Herstellungsmethoden für das Antigenmaterial beschrieben worden. Zu den geläufigsten gehören Gesamtzelllysate und saure Glycinextrakte, wobei kein eindeutiger Vorteil eines der Verfahren erkannt wurde [1, 6, 23, 40, 54]. Unser Westernblot aus einem Gesamtzelllysat von *H. pylori* entspricht somit einem der Standardverfahren.

Wir beschränkten uns auf den Nachweis von Antikörpern des Typs IgG, da dieser in mehreren Studien als zuverlässigster serologischer Marker einer *H. pylori*-Infektion identifiziert wurde [23, 26, 54]. Der Nutzen des IgA-Nachweises dagegen wird kontrovers diskutiert, während IgM-Antikörper nur sehr unregelmäßig auftreten [23, 26, 43, 53, 54]. Eventuell könnte die Sensitivität unseres Tests durch den kombinierten Nachweis von IgG und IgA noch verbessert werden. Da Hinweise darauf bestehen, dass gelegentlich Patienten ohne Nachweis von IgG eine reine IgA-Immunantwort auf *H. pylori* ausbilden [26, 53], wäre es interessant, die 5 auf unserem Westernblot falsch-negativ diagnostizierten Patienten zusätzlich auf IgA-Antikörper zu überprüfen. Allerdings gab unsere Studie beim Vergleich des Westernblots mit dem ELISA Hinweise darauf, dass gerade die IgA-Antikörper im Sinne von unspezifischen Reaktionen für einen Teil der falsch-positiven ELISA-Befunde verantwortlich sind.

Ein weiterer wichtiger methodischer Faktor, der einen Einfluss auf unsere Ergebnisse hatte, war die Wahl der Referenzmethoden. In dieser Arbeit wurde der *H. pylori*-Status bei der Mehrzahl der Patienten durch eine Kombination aus Urease-Schnelltest und Histologie nachgewiesen. Wegen einer felderförmigen Verteilung der Bakterien auf der Magenschleimhaut kann die Biopsie zu falsch-negativen Befunden führen, so dass die Spezifität unseres Westernblots in Wirklichkeit eventuell noch höher liegen könnte [14, 33]. Einer von 42 als *H. pylori*-negativ eingruppierten Patienten wurde im Westernblot ebenso wie im ELISA positiv beurteilt. Dies kann entweder an einem Biopsiefehler, Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen einen anderen Erreger oder persistierenden Antikörpern nach ausgeheilter *H. pylori*-Infektion (26, 51) liegen.

Auf dem Nachweis der Ureaseaktivität von *H. pylori* basierende Tests, wie auch der hier verwendete ¹³C-Atemtest und der Urease-Schnelltest, sind störanfällig in Bezug auf eine Therapie mit Protonenpumpenhemmern, Wismuthsalzen und insuffizienten Antibiotika [14]. Zwar wurden Patienten der *H. pylori*-negativen Gruppe mit bekannter

bereits erfolgter Eradikationstherapie von der Studie ausgeschlossen, jedoch galt dies nicht für andere Magentherapeutika oder für Antibiotikatherapien aus sonstigen Indikationen, über die uns keine Informationen vorlagen.

Die variierenden Referenzmethoden in der *H. pylori*-negativen Gruppe stellen einen weiteren potentiellen Störfaktor dar. Da der ^{13}C -Atemtest als zuverlässiger Tests in der *H. pylori*-Diagnostik allgemein anerkannt ist [3, 14, 53], dürfte allerdings die Korrektheit der Gruppeneinteilung insgesamt nicht beeinträchtigt sein. Lediglich die 3 beschwerdefreien, im ELISA als negativ identifizierten Blutspender bergen wegen des fehlenden Antigennachweises ein höheres Risiko der falsch-negativen Einteilung, da sich nachträglich ein leichter Mangel an Spezifität des ELISA (73,8%) herausstellte.

Die Zusammensetzung des Patientenkollektivs kann grundsätzlich einen Einfluss auf die Ergebnisse einer Testevaluation ausüben. Unser Patientenkollektiv kann als repräsentativ angesehen werden. Die Auswahl der Patienten erfolgte zufällig und ohne Berücksichtigung weiterer Kriterien, abgesehen von einheitlichen Test-ergebnissen zur Definierung des *H. pylori*-Status. Die Patienten unterschieden sich nicht auffällig hinsichtlich des Alters und der Beschwerdesymptomatik, die Veranlassung der *H. pylori*-Diagnostik war. Dies bestätigt die Theorie, dass *H. pylori* keine spezifischen Beschwerden verursacht, die sich von einer Oberbauch-symptomatik anderer Ursache unterscheiden ließen [1]. Erst durch die Befunde der Gastroskopie und der anschließenden Histologie waren deutliche Unterschiede hinsichtlich der Pathologien in den beiden Vergleichsgruppen erkennbar. Die *H. pylori*-positiven Patienten hatten insgesamt häufiger schwere pathologische Befunde wie Ulcera duodeni et ventriculi und aktive chronische Gastritiden mit histologischen Zusatzbefunden wie intestinalen Metaplasien und Schleimhautatrophien. In der Gruppe der *H. pylori*-negativen Patienten wurden hingegen seltener ein gastro-skopisches oder histopathologisches Korrelat für die angegebenen Beschwerden festgestellt. Normalbefunde traten häufiger, peptische Ulzera oder schwere Gastritiden nicht auf. Diese Ergebnisse bestätigen unser repräsentatives Patienten-kollektiv, da die Korrelation von *H. pylori* mit den genannten Erkrankungen bereits weitreichend beschrieben wurde [7, 33, 42, 54, 55, 58]. Aus unseren Befunden lässt sich schließen, dass unser Westernblot durch seine hohe Spezifität bei einem negativen *H. pylori*-Befund bereits mit hoher Wahrscheinlichkeit einen schweren pathologischen ösophagogastroduodenalen Befund bei Patienten mit unspezifischen dyspeptischen Beschwerden ausschließt.

Zur Untersuchung, ob in der *H. pylori*-negativen Gruppe andere Ursachen für die Beschwerden erkennbar waren, wurden die auf dem Patientenfragebogen erhobenen

Daten über allgemeine Risikofaktoren ausgewertet. Die *H. pylori*-negativen Patienten beinhalteten einen höheren Prozentsatz an Zigarettenrauchern (48% vs. 28%) und stressbelasteten Menschen (63% vs. 41%) im Vergleich zu *H. pylori*-positiven Patienten. Diese Faktoren könnten für die dyspeptischen Beschwerden mitverantwortlich sein. Die regelmäßige Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) könnte bei 10 % der Patienten, und Übergewicht bei 20% eine ursächlich Rolle spielen. Allerdings ist die Zahl der adipösen *H. pylori*-positiven Patienten deutlich höher (50%), und eine NSAR-Einnahme kam in beiden Gruppen gleich häufig vor. Selbstverständlich können auch andere Pathologien unterschiedlichsten Ursprungs die unspezifische Beschwerdesymptomatik der *H. pylori*-negativen Patienten verursachen. Zu nennen sind hier beispielsweise Herzerkrankungen, Störungen der Organfunktionen von Gallenblase und Pankreas, Motilitätsstörungen sowie Ernährungsgewohnheiten und seelische Faktoren. Operationen am Gastrointestinal-trakt spielten in unserem Patientenkollektiv keine wesentliche Rolle.

Zu der Auswertung des Patientenkollektives ist allgemein anzumerken, dass sich aufgrund der relativ kleinen Fallzahlen aus den Daten lediglich Hinweise auf mögliche Zusammenhänge oder Unterschiede gewinnen lassen, die für signifikante Aussagen durch größere Studien bestätigt werden müssten.

5.3 Eignung des Westernblots zur Erkennung von Pathogenitätsfaktoren

Das Protein CagA stellte sich auf unserem Westernblot als 120 kDa-Antigen dar, und Anti-CagA-Antikörper wurden in 77,8% der Seren der *H. pylori*-positiven Patienten nachgewiesen. Diese Daten stimmen mit den Literaturangaben überein [9, 44, 45]. Lediglich das Molekulargewicht von CagA wird unterschiedlich zwischen 120 und 140 kDa angegeben, wobei Xiang et al. [59] die Größenvariabilität dieses Antigens auf dem Westernblot auch nachwies. Wir können schlussfolgern, dass unser Westernblot gut zur Identifizierung von Anti-CagA-Antikörpern geeignet ist. Serumantikörper gegen CagA korrelieren gut mit dem Vorhandensein der Pathogenitätsinsel von *H. pylori*, einer Gensequenz, die für die Codierung von CagA und weiteren potentiellen Pathogenitätsfaktoren verantwortlich gemacht wird [4, 50]. Die Mehrzahl der neueren Studien postuliert eine Korrelation der Infektion mit CagA-positiven *H. pylori*-Stämmen mit dem Auftreten von Ulzera und schweren Gastritiden [4, 12, 38, 44, 59]. Diese Daten werden in unserer Studie bestätigt. 100% unserer Patienten mit Ulcera duodeni sowie 100% der Patienten mit Antrumgastritiden der Schweregrade mäßig bis schwer und schwer und der Aktivitätsgrade 2 bis 3 und 3 wiesen Serumantikörper gegen CagA auf, während die Rate bei leichteren Pathologien deutlich niedriger war (siehe Tabelle 4.9 und 4.10). Kirchner et al. [24] beschrieb die intestinale Metaplasie und die Schleimhautatrophie im Rahmen einer Gastritis als Vorstufe zum Adenokarzinom des Magens. Als Cofaktor wirke bei der Karzinomentstehung eine Autoimmunreaktion. In unserer Studie wiesen 15 der 18 Patienten (83%) mit intestinaler Metaplasie und 8 von 10 Patienten (80%) mit Schleimhautatrophie Anti-CagA-Antikörper im Westernblot auf. Signifikante Aussagen sind bei den relativ kleinen Fallzahlen nicht sicher möglich, jedoch geben all diese Daten einen Hinweis darauf, dass mittels unseres Westernblots Hochrisikopatienten mit hoher Wahrscheinlichkeit anhand der Serumantikörper gegen CagA erkannt werden können. Dies könnte in Zukunft Konsequenzen für die weitere Diagnostik und eine differenziertere Therapie haben.

Ähnlich wie bei CagA wird auch dem Zytotoxin VacA eine Bedeutung als Pathogenitätsfaktor beigemessen, und eine Assoziation des vacA-Genotyps s1 insbesondere mit dem Auftreten von Ulcera duodeni beschrieben [2, 5, 45]. Allerdings besteht eine schlechte Korrelation der Anti-VacA-Antikörper mit der in vitro toxinbildenden Aktivität eines *H. pylori*-Stammes, und ihre Beziehung zum vacA-Genotyp ist unklar [4]. Nach diesen Quellen sind die Anti-VacA-Antikörper nicht zur Diagnostik geeignet. Auf unserem Westernblot konnte das Antigen VacA nicht sicher mittels eines monoklonalen Antikörpers identifiziert werden. Neben eventuellen technischen

Ursachen besteht auch die Möglichkeit, dass unser Antigenmaterial aufgrund von Antigenvariationen unterschiedlicher *H. pylori*-Stämme [2, 11, 45, 59] beispielsweise kein VacA enthält. Vor oben genanntem Hintergrund ist dies nicht unbedingt als klinisch relevantes Defizit zu werten.

Eine Reihe von Störfaktoren kann die Untersuchung der Pathogenitätsfaktoren erschweren. An erster Stelle stehen Faktoren, die eigenständig, also unabhängig vom *H. pylori*-Status, gastroscopische Befunde oder die Histomorphologie verändern. In diesem Zusammenhang sind vor allem die häufig verordneten Protonenpumpenhemmer zu nennen. Einerseits verschleiern sie die Beschwerdesymptomatik und stören den *H. pylori*-Nachweis, insbesondere bei Tests, die auf dem Ureasenachweis basieren. Ein durch *H. pylori* verursachtes Ulkus kann unter Omeprazol-Therapie ggf. nicht mehr gastroscopisch nachgewiesen werden. Andererseits können Protonenpumpenhemmer bei Langzeiteinnahme beispielsweise selbst eine Schleimhautatrophie verursachen.

Als weiterer Störfaktor ist die weit verbreitete Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika zu sehen, von der in unserem Kollektiv immerhin 10% der Patienten betroffen sind. NSAR wirken selbst ulzerogen, und können so eine erhöhte Ulkushäufigkeit bei primär wenig pathogenen *H. pylori*-Stämmen vortäuschen. Weiterhin beschreibt Atherton [4] eine erhöhte Ulkusgefahr bei *H. pylori*-positiven Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern.

Inwieweit unsere Ulkus-Patienten im einzelnen von den jeweiligen Störfaktoren beeinflusst wurden, müsste in genaueren Untersuchungen geklärt werden.

5.4 Indikationen und Grenzen unseres *H. pylori* Westernblots

Mit dem neu entwickelten Westernblot ist es möglich, Patienten auf nicht invasivem Wege mit hoher Spezifität und Sensitivität auf ihren *H. pylori*-Status hin zu testen. Als serologisches Verfahren ist der Westernblot im Vergleich zu anderen Methoden verhältnismäßig unempfindlich gegenüber Störfaktoren wie Protonenpumpenhemmern, Wismuthsalzen oder insuffizienten Antibiotika [14].

Sein einfaches Auswertungsschema ermöglicht den Einsatz des Westernblots in der Routinediagnostik, ohne dass mit großen untersucherabhängigen Schwankungen gerechnet werden muss.

Wegen seiner hohen Spezifität und Sensitivität kann der Westernblot zur Bestätigung positiver oder Klärung fraglicher Befunde im ELISA herangezogen werden.

Die Antikörpervläufe bei einer *H. pylori*-Infektion sind umfangreich untersucht worden. Demnach kommt es 6 Monate nach erfolgreicher Eradikationstherapie zu einem Abfall des IgG-Titers um mindestens 50% [26]. Insofern ist der Westernblot prinzipiell auch zur Therapiekontrolle geeignet. Da wir die Patienten nach bereits erfolgter Eradikationstherapie von der Studie ausgeschlossen haben, liegen für den neuen Westernblot hierzu allerdings bisher keine Daten vor. Das Thema sollte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

Die hohe Durchseuchung mit *H. pylori* in Kombination mit einer extrem großen Variabilität der klinischen und pathologischen Befunde bei einer *H. pylori*-Infektion fordert die Entwicklung differenzierter diagnostischer Tests. Mit Hilfe des Nachweises von Anti-CagA-Antikörpern lassen sich Patienten mit einem hohen Risiko für schwere *H. pylori*-Infektionen von Patienten mit einem geringeren Risiko unterscheiden. Ein schwerer pathologischer Befund, wie z.B. ein Ulkus, bei einer Infektion mit einem niedrig pathogenen *H. pylori*-Stamm sollte in Zukunft Anlass für die Suche nach anderen möglichen Ursachen sein.

Bei Patienten mit unspezifischen Oberbauchbeschwerden und negativem Westernblot-Ergebnis lässt sich ein schwerer pathologischer Befund des Magens mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen. Aus diesen Gründen könnte der Westernblot als Screeningmethode in der *H. pylori*-Diagnostik eingesetzt werden, bevor invasive und kostenintensivere Maßnahmen durchgeführt werden. Bei Patienten unter 45 Jahren ohne Alarmsymptome mit positivem *H. pylori*-Nachweis kann die Therapie laut Maastricht Konsensus Report ohne Gastroskopie erfolgen [13, 32].

Davon auszuschließen sind wahrscheinlich ältere Patienten, bei denen das Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms zunimmt. Es scheint in den Expertenrunden [32] Konsens darüber zu herrschen, dass bei Patienten ab 45 Jahren eine Gastroskopie zur Sicherheit auch heute notwendig ist. Im längeren Verlauf eines Magenkarzinomleidens lässt sich *H. pylori* häufig nicht mehr nachweisen. Ob es sich dabei um falsch-negative Befunde handelt, oder ob *H. pylori* wegen veränderter Milieubedingungen im Verlauf verschwindet, ist nicht erwiesen. Nach Hirai et al. [20] sind allerdings auch bei negativer Kultur noch häufig Antikörper (insbesondere Anti-VacA-Antikörper) im Serum nachweisbar. In diesen Fällen ist also die Serologie sensitiver als der Antigennachweis.

5.5 Perspektiven

Diese Studie zeigt, dass der beschriebene Westernblot zuverlässig und einfach in der Routinediagnostik angewendet werden kann. Sie leistet somit einen Beitrag zur Etablierung und zur Erweiterung der Indikationen der serologischen *H. pylori*-Diagnostik, die bisher noch nicht zu den Standardverfahren gehört.

Ziel in der zukünftigen *H. pylori*-Diagnostik sollte sein, eine zuverlässige Aussage über den *H. pylori*-Status zu treffen und dem Patienten gleichzeitig unnötig invasive und kostenintensive Verfahren zu ersparen. Andererseits gilt es natürlich, schwere Erkrankungen wie Ulzera und Magenkarzinome rechtzeitig und sicher zu diagnostizieren. Das bedeutet, dass eine Selektion zwischen lediglich *H. pylori*-besiedelten Personen und ernsthaft erkrankten Patienten getroffen werden sollte. Dies könnte durch die genaue Differenzierung von unterschiedlich pathogenen *H. pylori*-Stämmen möglich werden. Auf dem Gebiet der Pathogenitätsfaktoren ist noch intensive molekulare Forschung erforderlich, um weitere Faktoren und ihre klinische Bedeutung (z.B. *iceA* [4]) zu identifizieren, und die Diagnostik entsprechend zu optimieren. Erst dann wird eine individuell dem Risikoprofil angepasste Therapie jedes einzelnen Patienten möglich. Im Optimalfall könnten die herausgefilterten Hochrisikopatienten gegebenenfalls bereits vor dem Auftreten schwerer Erkrankungen präventiv behandelt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wird ein neu entwickelter Westernblot zum Nachweis von IgG-Serumantikörpern gegen *H. pylori* evaluiert. Bei 114 Patienten mit Oberbauchbeschwerden wurde mittels Histologie, Urease-Schnelltest und ¹³C-Atemtest der *H. pylori*-Status festgestellt. 72 Seren von *H. pylori*-positiven und 42 Seren von *H. pylori*-negativen Patienten wurden anschließend auf dem Westernblot getestet. Es wurden 32 immunreaktive Proteinbanden mit Molekulargewichten von 13 bis 120 kDa identifiziert. 5 dieser Proteine konnten mittels monoklonaler Antikörper als die typischen *H. pylori*-eigenen Proteine CagA, UreB, UreA, FlaA und HpaA identifiziert werden. Die 30 kDa-Bande UreA zeigte den *H. pylori*-Status mit dem höchsten Anteil richtiger Befunde von 94,7% an. Mit einer Spezifität von 97,6% und einer Sensitivität von 93,1% ist die alleinige Auswertung der UreA-Bande auf dem Westernblot ausreichend und kann durch die Kombination mit weiteren Proteinbanden nicht sicher verbessert werden. Im Vergleich zu dem kommerziellen ELISA, der in dieser Studie lediglich eine Spezifität von 73,8% und eine Sensitivität von 90,3% aufwies, bietet der Westernblot Vorteile, da unspezifische Reaktionen besser erkannt werden können. Die 120 kDa-Bande CagA bestätigte sich auf dem Westernblot als Pathogenitätsfaktor. Sie war auf 100% der Westernblots von Patienten mit Ulcus duodeni, starker B-Gastritis oder mit B-Gastritis hoher Aktivitätsgrade (2 bis 3 und 3) nachweisbar. Die Häufigkeit bei gastrokopischen Normalbefunden lag dagegen nur bei 40%. Aufgrund sehr kleiner Fallzahlen lässt sich diesbezüglich allerdings keine signifikante Aussage treffen.

Der beschriebene Westernblot ist als zuverlässiger nichtinvasiver Test in der *H. pylori*-Routinediagnostik und als Screeningverfahren anwendbar. Er wurde allerdings noch nicht entsprechend eingesetzt, da die serologische *H. pylori*-Diagnostik bisher nicht als Standardverfahren im klinischen Alltag etabliert ist. Weitere Studien sollten klären, ob er auch zur Therapiekontrolle geeignet ist. Die Erweiterung der Indikationen der serologischen *H. pylori*-Diagnostik kann den Patienten invasive Maßnahmen ersparen. Mit der weiteren Erforschung der Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* könnte die Serologie in Zukunft eine risikoadaptierte Behandlung ermöglichen.

Ein Teil der Daten dieser Arbeit wurde bereits auf dem 3rd International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Pylori Infections, 1.–4.7.1998 in Helsingør, Denmark in Form eines Posters veröffentlicht.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Andersen LP, Espersen F (1992) Immunoglobulin G antibodies to *Helicobacter pylori* in patients with dyspeptic symptoms investigated by the Western immunoblot technique. J Clin Microbiol 30:1743-1751
2. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. J Biol Chem 270:17771-17777
3. Atherton JC (1997a) Non-endoscopic tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther 11 (Suppl. 1):11-20
4. Atherton JC (1997b) The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. Gut 40:701-703
5. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ (1997c) Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 112:92-99
6. Aucher P, Petit ML, Mannant PR, Pezenne L, Babin P, Fauchere JL (1998) Use of immunoblot assay to define serum antibody patterns associated with *Helicobacter pylori* infection and with *H. pylori*-related ulcers. J Clin Microbiol 36:931-936
7. Blaser MJ (1987) Gastric campylobacter-like organisms, gastric and peptic ulcer disease. Gastroenterology 93:371-383
8. Blaser MJ (1990) *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. J Infect Dis 161:626-633
9. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N, Rappuoli R (1993) Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc Natl Acad Sci USA 90:5791-5795
10. Cover TL, Blaser MJ (1992a) Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. J Biol Chem 267:10570-10575
11. Cover TL, Cao P, Murthy UK, Sipple MS, Blaser MJ (1992b) Serum neutralizing antibody response to the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. J Clin Invest 90:913-918
12. Crabtree JE, Taylor JD, Wyatt JI, Heatley RV, Shallcross TM, Tompkins DS, Rathbone BJ (1991) Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. Lancet 338:332-335

13. Domschke W, Dettmer A, Fenner T, Gregor M, Hesse P, Holtmann G, van Husen N, Miederer SE, Schentke KU, Schütz E, Stölzle L, Wöstenberg D (1995) *Helicobacter pylori* und peptisches Ulkus - Therapeutische Indikationen und Empfehlungen 1995 einer Expertenrunde in Münster. Z Gastroenterol 33:589-601
14. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ (1997) *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 10:720-741
15. Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S (1991) Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. Infect Immun 59:2470-2475
16. Faulde M, Cremer J, Zoller L (1993) Humoral immune response against *Helicobacter pylori* as determined by immunoblot. Electrophoresis 14:945-951
17. Fujiki Y, Hubbard AL, Fowler S, Lazarow PB (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: Application to endoplasmic reticulum. J Cell Biol 93:97-102
18. Graham DY, Klein PD, Evans Jr DJ, Evans DG, Alpert LC, Opekun AR, Boutton TW (1987) *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the ¹³C-urea breath test. Lancet i:1174-1177
19. Heilmann KL, Stolte M, Borchard F, Heine M, Löning Th, Ottenjann R, Remmele W, Rühl G, Schaefer HE, Schlake W, Seib HJ, Stamm B, Steininger H, Wiebecke B (1989) Gastritis-Graduierung und Klassifikation. Pathologie 10:194-196
20. Hirai M, Azuma T, Ito S, Kato T, Kohli Y, Fujiki N (1994) High prevalence of neutralizing activity to *Helicobacter pylori* cytotoxin in serum of gastric-carcinoma patients. Int J Cancer 56:56-60
21. Johansen HK, Nørgaard A, Andersen LP, Jensen P, Nielsen H, Høiby N (1995) Cross-reactive antigens shared by *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, and *Haemophilus influenzae* may cause false-positive titers of antibody to *H. pylori*. Clin Diagn Lab Immunol 2:149-155
22. Jones AC, Logan RP, Foyne S, Cockayne A, Wren BW, Penn CW (1997) A flagellar sheath protein of *Helicobacter pylori* is identical to HpaA, a putative N-acetylneuraminyllactose-binding hemagglutinin, but is not an adhesin for AGS cells. J Bacteriol 179:5643-5647
23. Karvar S, Karch H, Frosch M, Burghardt W, Gross U (1997) Use of serum-specific immunoglobulins A and G for detection of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic gastritis by immunoblot analysis. J Clin Microbiol 35:3058-3061
24. Kirchner T, Faller G, Price A (1998) Pathology and autoimmunity. Curr Opin Gastroenterol 14(suppl 1):S35-S39

25. Kist M, Bereswill S (1997) *Helicobacter pylori* Teil 2: Epidemiologie, Diagnose und Therapie. Mikrobiologie 7.Jg.:209-212
26. Kosunen TU, Seppälä K, Sarna S, Sipponen P (1992). Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 339:893-895
27. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227:680-685
28. Leal Herrera Y, Torres J, Perez Perez G, Gomez A, Monath T, Tapia Conyer R, Muñoz O (1999) Serologic IgG response to urease in *Helicobacter pylori*-infected persons from Mexico. Am J Trop Med Hyg 60:587-592
29. Lotterer E, Ramaker J, Lüdtker FE, Tegeler R, Geletneky JV, Bauer FE (1991) The simplified ¹³C-urea breath test - One point analysis for detection of *Helicobacter pylori* infection. Z Gastroenterol 29:590-594
30. Luke CJ, Kubiak E, Cockayne A, Elliott TSJ, Penn CW (1990) Identification of flagellar and associated polypeptides of *Helicobacter* (formerly *Campylobacter*) *pylori*. FEMS Microbiol Lett 71:225-230
31. Luke CJ, Penn CW (1995) Identification of a 29 kDa flagellar sheath protein in *Helicobacter pylori* using a murine monoclonal antibody. Microbiology 141:597-604
32. Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Bell D, Bianchi Porro G, Deltenre M, Forman D, Gasbarrini G, Jaup B, Misiewicz JJ, Pajares J, Quina M, Rauws E (1997) Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht Consensus Report. The European Helicobacter Pylori Study Group (EHPSG). Eur J Gastroenterol Hepatol 9(1):1-2
33. Marshall BJ, Warren JR (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet i:1311-1314
34. Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ (1985) Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. Med J Aust 142:436-439
35. Marshall BJ, Barrett LJ, Prakash C, McCallum RW, Guerrant RL (1990) Urea protects *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori* from the bactericidal effect of acid. Gastroenterology 99:697-702

36. Mayo K, Pretolani S, Gasbarrini G, Ghironzi G, Mégraud F (1998) Heterogeneity of immunoglobulin G response to *Helicobacter pylori* measured by the unweighted pair group method with averages. *Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology* 5:70-73
37. Misiewicz JJ, Tygat NJ, Goodwin CS, Price AB, Sipponen P, Strickland R, Cheli R (1990) The Sydney System: a new classification of gastritis. *Working Party Reports*:1-10
38. Moran AP, Wadström T (1998) Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Gastroenterol* 14 (suppl 1):S9-S14
39. Newell DG (1987) Identification of the outer membrane proteins of *Campylobacter pyloridis* and antigenic cross-reactivity between *C. pyloridis* and *C. jejuni*. *J Gen Microbiol* 133:163-70
40. Nilsson I, Ljungh Å, Aleljung P, Wadström T (1997) Immunoblot assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections. *J Clin Microbiol* 35:427-432
41. O'Toole PW, Logan SM, Kostrzynska M, Wadström T, Trust TJ (1991) Isolation and biochemical and molecular analyses of a species-specific protein antigen from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 173:505-513
42. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelmann JH, Orentreich N, Sibley RK (1991) *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 325:1127-1131
43. Perez-Perez GI, Dworkin BM, Chodos JE, Blaser MJ (1988) *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Ann Intern Med* 109:11-17
44. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Zuna I, von Herbay A, Galle PR, Stremmel W (1997) Serum antibodies against *Helicobacter pylori* proteins VacA and CagA are associated with increased risk for gastric adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 42:1652-1659
45. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle PR, Stremmel W (1998) Diversity of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol* 36:944-948
46. Sachs L (1997) *Angewandte Statistik*. 8., völlig neu bearb. und erw. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New York
47. Stolte M (1991) Das „Sydney-System“. *Fortschr Med* 20:407-409
48. Stryer L (1996) *Biochemie*. Spektrum Akad. Vlg., Hdg. (4. Auflage, S 46-47, S65-66)

-
49. Suerbaum S, Josenhans C, Labigne A (1993) Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flaB* flagellin genes and construction of *H. pylori* *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. J Bacteriol 175:3278-3288
 50. Suerbaum S (1996) Bakterielle Physiologie und Virulenzfaktoren. In: Malfertheiner P (Hrsg) *Helicobacter pylori* - Von der Grundlage zur Therapie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York (2. Auflage, S 14-23)
 51. Tegeler R, Lüdtke FE, Bauer FE, Schauer A, Scriba M (1993) Antikörperantwort auf nicht therapierte und therapierte *Helicobacter pylori*-Infektionen. Lab med 17:65-68
 52. Turbett GR, Høj PB, Horne R, Mee BJ (1992) Purification and characterization of the urease enzymes of *Helicobacter* species from humans and animals. Infect Immun 60:5259-5266
 53. van Zwet AA, Mégraud F (1998) Diagnosis. Curr Opin Gastroenterol 14 (suppl 1): S27-S33
 54. von Wulffen H, Heesemann J, Bützow GH, Löning T, Laufs R (1986) Detection of *Campylobacter pyloridis* in patients with antrum gastritis and peptic ulcers by culture, complement fixation test, and immunoblot. J Clin Microbiol 24:716-720
 55. Warren JR, Marshall BJ (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet i:1273-1275
 56. Weiss J, Mecca J, da Silva E, Gassner D (1994) Comparison of PCR and other diagnostic techniques for detection of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients. J Clin Microbiol 32:1663-1668
 57. Williams CL (1998) *Helicobacter pylori*: bacteriology and laboratory diagnosis. J Infect 34:1-5
 58. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG (1991) *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet 338:1175-1176
 59. Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, Covacci A (1995) Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. Infect Immun 63:94-98

8 ANHANG

Diagnostik und Befunde der *Helicobacter pylori*-Evaluation

Patientenname:
 Vorname:
 Pat.nr.:

Arzt:

☐ Erstsymptomatik ☐ Rezidiv Beschwerden seit:

☐ **Gastroskopie:** ☐ Ulkus ventriculi ☐ Ulkus duodeni ☐ Gastritis:
☐ Magenkarzinom ☐ MALT-Lymphom ☐ Refluxösophagitis
 Sonstiges:
 Lokalisation:
Komplikationen:
☐ Magenblutung ☐ Perforation ☐ karzinomatöse Entartung
☐ Penetration ☐ Magenausgangsstenose
 Sonstiges:

☐ **CLO-Test:** ☐ positiv ☐ negativ ☐ grenzwertig

Angeforderte Untersuchungen:

☐ Histologie

☐ Atemtest

☐ Serologie (bitte 1 Röhrchen Vollblut oder Serum einsenden)

Ist der Patient schon vor der Diagnostik therapiert worden? ☐ Ja ☐ Nein

Medikamente:

Ist bereits einmal eine Eradikation durchgeführt worden? ☐ Ja ☐ Nein

Bemerkungen:

Fragebogen an Patienten vor einer Magenspiegelung

Pat.nr: Initialen: männlich ☐ weiblich ☐
 Datum: Größe:cm
 Alter:Jahre Gewicht:kg

Hatten Sie in der letzten Zeit	Häufig	Manchmal	Nein
- Schmerzen, Brennen oder Druck im Oberbauch?	☐	☐	☐
- Schmerzen hinter dem Brustbein?	☐	☐	☐
- Sodbrennen?	☐	☐	☐
- Völlegefühl?	☐	☐	☐
- Schluckbeschwerden?	☐	☐	☐
- Übelkeit / Erbrechen?	☐	☐	☐
- Gewichtsabnahme?	☐	☐	☐
- Blähungen?	☐	☐	☐
- Luftaufstoßen?	☐	☐	☐

- Seit wann haben Sie diese Beschwerden? Seit
 - Waren Sie früher schon einmal wegen ähnlicher Beschwerden in Behandlung? (*bitte Arzt angeben*)
 bei Dr. ☐ Ja ☐ Nein
 - Haben Sie innerhalb der letzten 4-6 Wochen Medikamente gegen Magenbeschwerden
 genommen? Wenn ja, welche? ☐ Nein

- Sind Sie Vegetarier? ☐ Ja ☐ Nein
 - Sind Sie schon einmal operiert worden an
 ☐ Magen, ☐ Darm oder ☐ Speiseröhre? ☐ Nein
 - Nehmen Sie Schmerzmittel, z.B. Aspirin, ASS, Diclofenac, Voltaren, etc. ein? ☐ Nein
 Wenn ja, welche? Wie oft?
 - Wie viele Zigaretten rauchen Sie? ca. pro Tag ☐ Keine
 - Glauben Sie, oft stark belastenden Stress zu haben? ☐ Ja ☐ Nein
 - Gibt/gab es Familienangehörige mit
 ☐ Magenerkrankungen oder ☐ Magenkrebs? ☐ Nein

Proteinbandenintensitäten auf Westernblots *H. pylori*-positiver Patienten

Patient	Molekulargewicht (kDa)																																
	120	95	90	72	64	61	57	56	54	50	49	47	46	45	42	41	39	35	33	31	30,5	30	29	27	26	25,5	23	21	19	17	15,5	13	
3	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	2	0	1	3	0	0	0	0	0	0	2	
6	2	1	0	1	1	1	1	3	3	0	1	0	0	2	0	2	1	1	2	1	0	3	1	1	3	1	1	0	3	0	2	2	
8	2	1	0	1	1	1	1	3	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	
9	2	1	0	1	1	1	1	3	2	1	2	0	0	3	1	0	0	1	3	1	0	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	2	
10	1	0	2	2	2	2	2	3	2	1	2	1	1	2	2	0	1	1	0	0	0	1	0	1	2	0	1	0	1	0	2	2	
11	1	0	0	1	0	2	0	3	2	0	3	0	0	2	2	0	0	1	0	0	0	1	1	0	3	0	1	0	1	0	0	3	
12	3	0	1	1	0	0	0	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	
13	1	0	0	1	1	0	0	3	1	0	2	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0	2	0	0	2	
15	0	0	0	0	0	1	0	3	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	
16	2	1	1	1	2	2	0	3	2	1	2	1	1	2	2	2	0	0	2	1	0	1	1	0	3	0	1	0	2	0	0	2	
17	2	0	1	2	1	0	0	3	2	1	3	1	1	2	2	2	2	1	3	3	0	3	1	1	1	0	1	0	1	0	1	2	
18	0	0	1	2	0	0	0	1	1	0	0	0	2	1	0	0	0	0	2	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
19	3	1	1	1	1	0	0	0	2	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
20	3	1	1	1	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	1	
21	1	0	0	1	1	1	0	2	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
23	2	0	0	2	1	1	0	3	1	1	2	1	1	3	0	0	0	0	2	3	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	
24	0	1	1	2	2	0	0	3	2	0	2	0	0	3	0	2	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	
25	1	0	0	2	2	2	0	3	3	0	2	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	3	0	0	0	1	0	0	1	
26	1	1	0	1	1	2	0	2	2	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	2	2	0	2	0	2	0	1	0	2	2	
27	1	0	0	0	1	2	1	3	2	1	1	1	1	1	0	1	0	1	2	2	0	2	0	1	3	1	2	0	1	0	0	1	
28	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	2	2	0	2	1	0	2	0	0	0	1	0	1	1	
29	1	0	0	1	1	0	0	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	2	0	2	0	0	2	0	1	0	2	0	0	0	
30	0	0	0	1	0	1	2	3	2	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	2	0	0	2	0	2	0	2	1	0	1	
31	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
32	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	2	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	
33	2	1	2	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	3	0	1	3	0	1	0	1	0	1	1	
34	2	0	0	1	1	1	0	2	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	2	0	2	2	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	
37	2	0	1	1	0	1	0	3	0	2	1	2	1	3	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
38	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	
39	0	0	0	1	0	1	0	3	2	0	1	0	0	1	1	0	0	0	2	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	
41	2	0	0	1	0	0	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	0	2	2	0	0	2	0	0	1	1	0	0	2	
43	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	
44	1	0	1	1	3	3	0	3	2	0	0	0	1	3	1	1	0	2	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	
45	2	1	0	1	1	1	1	2	1	0	1	0	0	0	2	0	0	1	2	0	3	3	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	
50	2	1	0	1	1	0	0	2	2	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	2	0	0	1	0	1	0	1	0	0	2	
51	1	0	1	2	0	1	1	3	2	1	0	1	0	2	0	1	1	1	2	1	0	1	1	0	2	0	1	0	1	0	1	2	
54	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
56	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
58	2	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	3	0	1	0	0	0	2	0	
61	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	
62	2	1	0	0	1	1	0	2	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	2	0	2	0	0	2	0	0	0	1	0	1	0
63	2	1	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
64	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
65	3	1	1	1	1	1	0	3	2	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	3	0	0	0	2	0	0	1	
66	1	1	0	1	1	1	0	2	1	0	1	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
67	1	0	1	1	2	0	0	1	2	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	
68	3	1	1	1	2	1	0	3	2	1	2	1	1	2	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	2	0	2	0	1	0	0	3	
69	2	1	1	1	1	0	1	3	1	1	1	0	1	3	1	1	0	2	1	1	0	3	2	0	1	0	0	0	1	0	0	1	
70	2	0	0	1	2	2	0	3	2	1	1	1	2	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	2	1	
75	2	0	0	0	1	0	0	3	2	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	1	0	1	0	0		

Proteinbandenintensitäten auf Westernblots *H. pylori*-negativer Patienten

Patient	Molekulargewicht (kDa)																															
	120	95	90	72	64	61	57	56	54	50	49	47	46	45	42	41	39	35	33	31	30,5	30	29	27	26	25,5	23	21	19	17	15,5	13
14	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
40	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
46	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
59	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
73	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
79	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
84	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
87	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
92	0	0	0	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
106	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
107	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
110	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
116	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
N1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
N6	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N8	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N11	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
N12	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N14	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N16	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N17	1	0	0	2	1	1	0	3	0	2	0	1	0	1	0	1	0	0	2	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
N18	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N19	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
N20	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
119	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all denen meinen Dank ausdrücken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, und ohne die meine Dissertation in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. R. Klapdor danke ich sehr für die Überlassung des Themas, für die freundliche Unterstützung und die reibungslose Zusammenarbeit. Von seinen Erfahrungen konnte ich sehr profitieren.

Herrn Dr. Thomas Fenner gilt mein ganz besonderer Dank und große Anerkennung für die kontinuierliche, kompetente und äußerst engagierte Betreuung in allen Phasen der Arbeit. Seine Hilfsbereitschaft in fachlichen und organisatorischen Fragen und seine menschliche Unterstützung haben entschieden zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Kathrin Günther möchte ich besonders danken für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Thematik sowie für die qualifizierte Betreuung des praktischen Teils meiner Arbeit.

Ebenso danke ich den Praxen Prof. Dr. Klapdor, Dr. Kirchhof, Dr. Mischke, Dr. Haack und Dr. Schlecht sehr für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials.

Ich bedanke mich auch bei allen Mitarbeitern des Labors Dres. Fenner und Partner, die auf verschiedenste Weise wichtige Beiträge für diese Arbeit geleistet haben, insbesondere Dr. Eva Otzipka, die mit ihrer freundlichen und fachkompetenten Beratung immer hinter mir stand.

Herrn Prof. Dr. J. Berger gilt mein Dank für die große Unterstützung bei der statistischen Datenauswertung, sowie Sten Flehmig und Hauke Bendt für die unermüdliche Hilfe in Computerfragen.

Meinen Eltern Heike und Klaus Lippmann bin ich zutiefst dankbar für die zuverlässige moralische und praktische Unterstützung nicht nur bei meiner Dissertation, sondern in allen Abschnitten meiner Ausbildung. Nicht zuletzt durch die großzügige Bereitstellung notwendiger Arbeitsmittel haben sie mir wesentliche Hilfe beim Verfassen der Arbeit geleistet.

Schließlich gilt mein besonders herzlicher Dank meinem Lebenspartner Oliver Koch für seine liebevolle, motivierende Begleitung und für sein sagenhaftes Verständnis.

10 LEBENS LAUF

Name	Katja Lippmann
Geburtsdatum	6. Januar 1972
Geburtsort	Reutlingen
Anschrift	Lohmannsweg 15, 21075 Hamburg
Familie	Mutter: Heike Lippmann, geb. Grimme, Buchhalterin (i.R.) Vater: Klaus Lippmann Textilingenieur und Seiler, Geschäftsführer der Fa. Lippmann Tauwerk GmbH Schwester: Stefanie Lippmann, Seilermeisterin
Schulbildung	
1978 – 1982	Grundschule Moorbург
1982 – 1988	Gymnasium Neuwiedenthal
1988 – 1991	Oberstufenzentrum Süderelbe, Abitur
Auslandsaufenthalt	
1991 – 1992	Au-Pair und Sprachkurse in Valence, Frankreich
Hochschulbildung	
1992 – 1999	Universität Hamburg, Fachbereich Medizin, Teilapprobation
Ärztin im Praktikum	
1999 - 2000	Chirurgie, Kreiskrankenhaus Buxtehude
2000 – 2001	Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum Kaltenkirchen und Paracelsusklinik Henstedt-Ulzburg
1.5.2001	Erlangung der ärztlichen Approbation
Facharztausbildung	
1.5 – 31.7.2001	Gynäkologie u. Geburtshilfe, Johanniterkrankenhaus Geesthacht
seit 1.8.2001	Gynäkologie und Geburtshilfe, Elbeklinikum Buxtehude
Interessen / Freizeit	Jazztanz, Natur- u. Bergwandern, französischer Film, Ballett

11 ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich diese Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung der Promotion beworben habe.