

Rita Bangert-Semb

Dr. med.

**Grundlagen zur Entwicklung eines immunologischen Nachweisverfahrens für *Helicobacter pylori* im Stuhl**

Geboren am 29.11.1961

Reifeprüfung am 2.06.1981

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1983/84 bis SS 1991

Physikum am 25.03.1986 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg, Fakultät Mannheim

Praktisches Jahr in Heidelberg, Krankenhaus Salem

Staatsexamen am 4.04.1991 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Klinische Chemie/Labormedizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Heinrich Schmidt-Gayk

Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin Prof. Dr. med. H. Schmidt-Gayk,  
Dr. med. H. J. Limbach und Kollegen Heidelberg

Keine der bisher verfügbaren Testmethoden zum Nachweis von *Helicobacter pylori* ist ideal, jedes der Verfahren hat spezifische Vor- und Nachteile. Das Ziel der vorliegenden Studie war es, Grundlagen für die Entwicklung eines nichtinvasiven Testverfahrens zu erarbeiten, das in der Lage ist, einen direkten Keimnachweis zu erbringen (und damit im Gegensatz zu den herkömmlichen serologischen Verfahren auch im Rahmen des Früh-Follow-up einzusetzen ist) und darüber hinaus mit sehr geringen Belastungen für den Patienten verbunden ist, um zusätzlich eine gute Compliance zu erreichen.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Grundlagen für einen immuno-luminometrischen Assay (ILMA) für *H. p.* im Stuhl erarbeitet werden. Die Untersuchungen erfolgten zunächst in Puffer und dann im Stuhl; eingesetzt wurden verschiedene Antikörper und eine Vielzahl unterschiedlicher Aufbereitungs- und Vorbehandlungsmethoden.

Im einzelnen sollte die Extraktion von *H. p.* aus Stuhlproben optimiert werden (Temperatur, Detergentien, Ultraschall, UV-Licht, Zentrifugation), ferner sollten die Einzelbedingungen für den ILMA optimiert werden (Auswahl der Antikörper, Puffer, Detergentien, Inkubationszeiten und -temperaturen).

Von den Vorbehandlungen der *H. p.*-Suspensionen mit Erwärmung, UV-Licht und Ultraschallbehandlung erwies sich eine 30minütige Erwärmung der Suspension auf 60 °C als vorteilhaft: Wie aus Abbildung 9 (Seite 65) hervorgeht, liegt eine 1:10.000-Verdünnung der Keimsuspension (McFarland I) in den Lichtimpulsen höher als der Leerwert.

Der Einsatz von Detergentien (Tween, Triton, N-Octyl-Glycosid) ergab einen leichten Vorteil für Triton in der Verdünnung von 1:100.000, also 10 µl Triton/l Puffer (siehe auch Abbildung 10, Seite 68).

Beim Vergleich verschiedener Inkubationszeiten ergab sich, daß der Modus der zweimaligen Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Schüttler die höchste Sensitivität ergab (siehe Abbildung 11, Seite 69).

Die steilsten Standardkurven (höchsten Impulsraten bei der höchsten Keimkonzentration [1:10-Verdünnung von McFarland I]) ergaben sich, wenn Polystyren-Kugeln (feste Phase) mit dem mAK Medix 7102 ge-coated waren, die Abblockung freier Bindungsstellen an der Kugel mit Casein 0,5% erfolgte und als Tracer der Acridiniumester-markierte mAK Medix 7101 benutzt wurde. Die mAK der Fa. Medix erkennen die *H. p.*-Epitope UreB (7101) bzw. UreA (7102). Werden dagegen für die Beschichtung der Kugeln (polyklonale) Patientenserum mit hohen Titern gegen *H. p.* eingesetzt, so erkannte das Antiserum des Patienten Nr. 4 *cagA*, *vacA*, *Hsp* und *UreA*. Die Überprüfung der Spezifität ergab bei Verwendung von mit diesem Serum beschichteten Kugeln keine Kreuzreaktion mit *Shigella sonnei*.

Nach einigen Versuchen mit Stuhlsuspensionen und erhöhten *H. p.*-Konzentrationen fanden sich diese nicht entsprechend im ILMA wieder. Somit ist es insgesamt in der vorliegenden Untersuchung nicht gelungen, einen Testansatz zu entwickeln, der im Medium Stuhl *H. pylori* sicher nachweisen kann. Es konnte zwar durch geeignete Parametermodifikationen eine Eichkurve im Puffer erarbeitet werden, die eine sichere Unterscheidung *H. p.*-positiver und -negativer Proben erlaubte; alle getesteten Modifikationen waren jedoch nicht in der Lage, im Stuhl ähnlich brauchbare Ergebnisse zu erzielen, wie dies im Puffer gelungen war. Offensichtlich stört daher das Medium Stuhl den Test; im Stuhl herrschen anscheinend grundsätzlich andere Versuchsbedingungen als im Puffer. Wie diese Störung genau abläuft und auf welcher Komponente oder welchen Komponenten des Stuhls sie beruht, kann auf der Basis der vorliegenden Untersuchungen nicht geklärt werden.

Einer der Hauptnachteile des derzeit einzigen kommerziellen Stuhltests, des HpSA-Tests, liegt in der fehlenden Unterscheidung von *cagA*- und *vacA*-positiven bzw. -negativen Stämmen, zudem ist er relativ teuer. Trotz der in der Literatur überwiegend positiven Einschätzung des HpSA-Tests besteht aber nach wie vor Bedarf an der Entwicklung eines Nachweisverfahrens für *H. p.* im Stuhl. Dieses könnte aus einer Immunextraktion von *H. p.* mit Antikörper-beschichteten ‚magnetic beads‘ aus größeren Stuhlmengen (z. B. 1 ml Stuhl in einer 10 ml Suspension) und anschließenden Detektion mit dem hier entwickelten ILMA bestehen.