

3 PATIENTENPOPULATION, MATERIAL UND METHODIK

3.1 Patientenpopulation

Zur Klärung der oben genannten Fragen wurden die Stuhlüberstände von 167 HIV-Infizierten der Abteilung für Infektionskrankheiten des Universitätsklinikum Benjamin Franklin sowie von zwölf HIV-Infizierten aus dem Auguste-Viktoria-Krankenhaus und zwei HIV-Infizierten des Rudolf-Virchow-Klinikum untersucht.

Bei 50,3 Prozent der 181 HIV-Infizierten wurden intestinale Erreger nachgewiesen und 16 Prozent litten unter Diarrhoe. Der Body Mass Index (BMI) lag bei den 166 Männern und 15 Frauen im Alter von 22 bis 65 Jahren zwischen 14,02 - 32,66 kg/m². Es wurden zwischen 1 - 1208 CD4-Zellen/µl Blut gemessen. Im Untersuchungszeitraum unterzogen sich 84 Patienten einer antiretroviralen Therapie: 45 erhielten Azidothymidin (AZT), sechs Dideoxycytidin (ddC), 32 AZT und ddC sowie ein Patient AZT+ddC+Indinavir. Bis August 1996 verstarben 19 Patienten.

Tabelle 1: Die charakteristischen Merkmale von HIV-Infizierten ohne AIDS (HIV) und AIDS-Patienten (AIDS).

charakteristische Merkmale der Gruppe:	HIV	AIDS
Anzahl	98	83
mit Diarrhoe	9 (9,2%)	20 (23,5%)
mit intestinalen Erregern	56 (57,1%)	35 (42%)
CD4-Zahl *	258 (4 - 1208)	66 (1 - 464)
CDC-Stadium	A1: 5 A2: 25 A3: 10 B1: 3 B2: 28 B3: 27	C1: 0 C2: 5 C3: 78
Body Mass Index (kg/m ²) *	22,68 (16,23 - 32,66)	20,83 (14,02 - 27,47)
Männer	89 (91%)	77 (93%)
Frauen	9 (9%)	6 (7%)
Alter *	43 (31 - 57)	41 (28 - 55)
Antiretrovirale Therapie †	45 (46%)	39 (47%)

Legende:

* Median (min - max).

† Von den 45 HIV-Infizierten mit ART erhielten 25 nur AZT, 5 nur ddC und 15 Patienten AZT und ddC. Von den 39 AIDS-Patienten mit ART erhielten 20 AZT, ein Patient ddC, 17 AZT und ddC sowie ein Patient AZT + ddC + Indinavir.

Die Patienten wurden entsprechend der Fragestellung in die Stadien HIV und AIDS (Tabelle 1) sowie nach dem Vorkommen von Diarrhoe und intestinalen Erregern (Tabellen 8 und 9) eingeteilt.

Von September 1994 bis August 1996 wurden 181 Stuhlproben aufbereitet. Die im gleichen Untersuchungszeitraum identifizierten intestinalen Erreger (n=136) sowie ihre CD4-Zahl (n=177) und p24-Konzentration im peripheren Blut (n=152) wurde den Krankenakten der jeweiligen Patienten entnommen.

3.1.1 Charakterisierung der identifizierten intestinalen Erreger

Zur Abklärung von Magen-Darm-Störungen wurden die Patienten im gleichen Untersuchungszeitraum auf das Vorhandensein von sekundären Erregern untersucht. Bei 50,3 Prozent der HIV-Infizierten (n=91) wurden 136 intestinale Erreger identifiziert. Bei 33 Patienten lag ein Mehrfachbefund vor.

Abbildung 1 und Tabelle 2 zeigen das Spektrum der im Gastrointestinaltrakt dieser HIV-Infizierten nachgewiesenen Erregergruppen. Viren stellen mit 62,5 Prozent (n=85) die größte Gruppe dar; des Weiteren wurden 28 Mal Bakterien (20,6%), 13 Mal Protozoen (9,6%) und zehn Mal Pilze (7,3%) nachgewiesen.

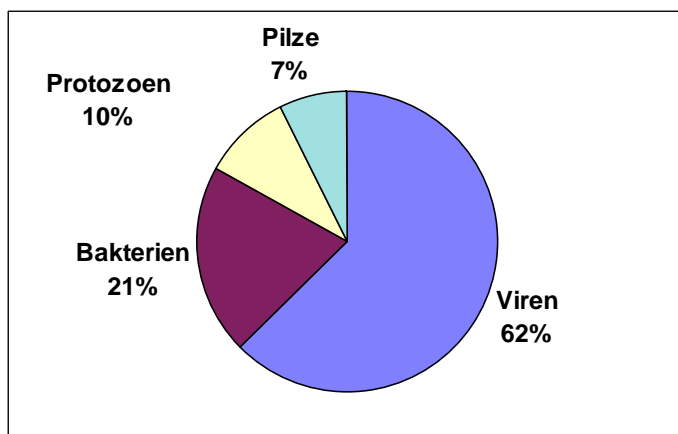


Abb. 1: Erregergruppen im Gastrointestinaltrakt HIV-Infizierter. Angaben in Prozent (n=136)

Am häufigsten ließen sich Coronaviren nachweisen: bei HIV-Infizierten ohne AIDS 52 Mal und 17 Mal bei AIDS-Patienten. Cytomegalie-Viren wurden acht Mal identifiziert, in 88 Prozent bei AIDS-Patienten. Außerdem wurden bei drei AIDS-Patienten Adenoviren, sowie im Stadium B zwei Mal Enteroviren und einmal Retroviren gefunden. Bei zwei AIDS-Patienten wurden Herpes simplex Viren nachgewiesen.

Bakterien wurden im Stadium B 16 Mal und zwölf Mal bei AIDS-Patienten identifiziert, jedoch nicht im Stadium A. Atypische Mykobakterien stellen mit 57 Prozent die größte Gruppe dar (n=16), gefolgt von *Salmonella spp.* (25%), *Shigella spp.* (7%), *Clostridium difficile* (7%) und *Campylobakter spp.* (4%).

Des Weiteren wurden 13 Mal Protozoen nachgewiesen: in frühen Stadien *Blastocystis hominis* (n=3), *Endolimax nana* (n=1), *Entamoeba histolytica* (n=1) und *Jodamoeba bütschlii* (n=1) sowie in späten Stadien vier Mal Kryptosporidien, bei zwei Patienten Mikrosporidien und einmal Isosporidien.

Außerdem wurden bei zehn AIDS-Patienten *Candida albicans* gefunden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht der nachgewiesenen gastrointestinalen Viren und Mikroorganismen

Erreger:	HIV-Stadium:	A	B	C	Summe:
Bakterien:	Atyp. Mykobakterien		9	7	16
	<i>Campylobakter spp.</i>			1	1
	<i>Clostridium difficile</i>			2	2
	<i>Salmonella spp.</i>		3	4	7
	<i>Shigella spp.</i>		2		2
Viren:	Adenoviren			3	3
	CMV		1	7	8
	HSV			2	2
	Coronaviren	19	33	17	69
	Enteroviren		2		2
	Rotaviren		1		1
Protozoen:	Isosporidien			1	1
	Kryptosporidien			4	4
	Mikrosporidien			2	2
	<i>Entamoeba histolytica</i>		1		1
	<i>Blastocystis hominis</i>	1	2		3
	<i>Endolimax nana</i>	1			1
	<i>Jodamoeba bütschlii</i>	1			1
Pilze:	<i>Candida albicans</i>			10	10
Gesamtsumme Erreger		22	54	60	136

3.1.2 Häufigkeitsverteilung der Risikogruppen

72 Prozent der im Rahmen dieser Untersuchung beobachteten HIV-Infizierten hatten homosexuelle und neun Prozent heterosexuelle Risikokontakte. Acht Prozent haben sich über den Konsum von i.v.-Drogen infiziert und 0,55 Prozent durch die Gabe von Blutprodukten. Zwei Prozent der Erkrankten gehörten zwei Risikogruppen an: drei i.v.-Drogen-abhängige gaben sexuelle Kontakte zu HIV-Infizierten beziehungsweise Risikogruppen an; bei einem Homosexuellen kann die Infektion über eine kontaminierte Transfusion nicht ausgeschlossen werden. In acht Prozent der Fälle konnte die Risikogruppe nicht erfasst werden.

3.1.3 Die CDC-Klassifikation

Die HIV-Infektion wurde bei dieser Patientenpopulation in der Zeit von Februar 1982 bis Oktober 1995 diagnostiziert. Sie beruhte auf dem Nachweis von Antikörpern gegen HIV und / oder dem direkten Nachweis von HIV oder seinen Bestandteilen im Serum. Anschließend wurden die Patienten mit Hilfe der CDC-Klassifikation [12] entsprechend der CD4-Zellzahlbereiche in die Gruppen eins bis drei und in die klinischen Kategorien A, B und C eingeteilt.

Tabelle 3: CDC-Klassifikation

Laborkategorie (CD4-Zellen/ μ l)	A (Asymptomatische HIV-Infektion)	B (Symptome oder Erkrankungen, die nicht in die AIDS-definierende Kategorie C fallen, dennoch der HIV-Infektion ursächlich zuzuordnen sind oder auf eine Störung der zellulären Immunabwehr hinweisen)	C (AIDS-definierende Erkrankungen)
1: ≥ 500	A1	B1	C1
2: 200-499	A2	B2	C2
3: ≤ 200	A3	B3	C3

In den USA ist aus vorwiegend gesundheitspolitischen Gründen die AIDS-Falldefinition seit 1993 über die klinische Kategorie C hinaus auf alle Patienten erweitert, die weniger als 200 CD4-Zellen/ μ l haben. In dieser Arbeit wird AIDS entsprechend dem europäischen Konsens nur bei Vorliegen einer Erkrankung der klinischen Kategorie C definiert (Tabelle 3).

3.1.4 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe umfasste 26 Probanden ohne Hinweis auf die Zugehörigkeit zu einer Risikogruppe beziehungsweise auf eine HIV-Infektion. Von den 12 männlichen und 14 weiblichen Kontrollpersonen im Alter von 21 bis 71 Jahren (Mittelwert: 47Jahre) litten fünf an Diarrhoe.

3.2 Materialien

3.2.1 Geräte

- ELISA Reader: automated microplate reader (Sorin Biomedica, Düsseldorf)
- Eppendorf Zentrifuge, Typ: 5402 (Heraeus Sepatech, Berlin)
- Eppendorf-Multipette Typ: 4780 (Eppendorf, Hamburg)
- Laminar Flow-Arbeitsplatz: Clean Air Woerden, Typ DLF B 956 (Heraeus, Berlin)
- Minifuge T (Heraeus Sepatech, Berlin)
- Digital-Multichannel-Pipette: Titertek (Flow Laboratories Finnland)
- Vibrofix elektronik: Typ: VF1 (IKA-Labortechnik Deutschland)
- Waschanlage: Well-Wash 4 (Denley, GB)
- Shaker Inkubator (Sorin Biomedica Deutschland)

3.2.2 Reagenzien und Testbestecke

- Coulter HIV-1 p24 Antigen Assay (Coulter-Immunotech, Krefeld)
- Coulter HIV-1 p24 Antigen Neutralization Kit (Coulter Immunotech, Krefeld)
- Cytoscreen ELISA : Human TNF- α ultrasensitiv ELISA (Laboserv, Giessen)
- DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, München)
- Immunkomplex-Dissoziationskit: Coulter ICD-Prep Kit (Coulter Immunotech, Krefeld)
- Mikrotiterplatte: 96 well; unbeschichtet mit flachem Boden (Nunc-Immuno Modules, Dänemark)
- Phosphatgepufferte Salzlösung: PBS (Gibco BRL, Karlsruhe)
- Testkit zur Bestimmung von IL-1 α : IL-1 α IEMA (Immunotech, Hamburg)

3.3 Methoden

3.3.1 Sicherheitsbestimmungen

Die wichtigsten hygienischen Richtlinien für den Umgang mit HIV-infizierten Patienten sind in der Anlage 5.1 der Richtlinie für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention "Hygienische Maßnahmen zur Verhütung der Übertragung von HIV in Krankenhaus" sowie in der Anlage 5.1 der oben genannten Richtlinie "Forderung der Hygiene an die Infektionsprävention bei übertragbaren Krankheiten" aufgeführt.

Das Tragen von Schutzkleidung ist Voraussetzung für alle Arbeiten mit infektiösen Proben. Es ist erforderlich, an Sicherheitswerkbänken zu arbeiten sowie mechanische Pipettierhilfen zu benutzen. Das Untersuchungsmaterial sollte nur in verschlossenen Gefäßen zentrifugiert werden. Jegliches Untersuchungsmaterial muss in einem geschlossenen, flüssigkeitsdichten Behältnis transportiert werden. Die Behältnisse dürfen außen nicht mit Untersuchungsmaterial verschmutzt sein.

Verschüttetes Material ist sofort zu desinfizieren und zu entfernen; die kontaminierte Stelle ist zu desinfizieren. Erregerhaltiger Abfall muss gefahrlos gesammelt und dann durch Autoklavieren unschädlich gemacht werden. Da HIV weniger resistent ist als zum Beispiel das Hepatitis-B-Virus, ist es ausreichend, Verfahren und Mittel anzuwenden, die auch gegen HBV wirksam sind.

3.3.2 Aufbereitung der Stuhlproben

- Nach Erhalt des Materials aus der HIV-Sprechstunde wurde die Masse der Stuhlprobe bestimmt; am Laminarflow-Arbeitsplatz wurden die Stuhlproben 1:4 mit PBS verdünnt und mit Hilfe eines Vibrofix homogenisiert.
- Anschließend wurden die verdünnten Stuhlproben 30 Minuten mit der Minifuge T bei 1400 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in Nethelerröhrchen überführt, um in einer Eppendorf Zentrifuge bei 14.000 U/min und 4°C 30 Minuten sedimentiert zu werden.
- Die so gewonnenen Stuhlüberstände wurden bedarfsgerecht portioniert (2 ml) eingefroren (-80°C), gegebenenfalls sofort weiterverarbeitet [3].

3.3.3 p24-Antigenbestimmung

Der zuerst beschriebene p24-Antigen-ELISA diente der Bestimmung von freiem p24 (p24-ICD). Anschließend wurden p24-Konzentrationen nach Säuredissoziation (p24+ICD) gemessen und damit sowohl freies als auch gebundenes p24 erfasst.

1) p24-Antigenbestimmung mit dem Coulter HIV-1 p24 Antigen Assay

Bei diesem Test handelt es sich um einen nichtkompetitiven Sandwich ELISA zum Nachweis des p24-Antigens des humanen Immundefektvirus Typ 1.

Ist Antigen in der Probe vorhanden, so bindet es an die mit monoklonalem Maus-Antikörper (Anti-HIV-Core-Antigen) beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterstreifen. Das gebundene Antigen wird von einem zweiten Antikörper gegen HIV erkannt, der biotinyliert ist und daher mit dem konjugierten Meerrettichperoxidase-Streptavidin reagiert. Die Reaktion der Peroxidase mit Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Tetramethylbenzidin-Substrat ruft eine Farbentwicklung hervor. Die Reaktion wird mit dem Coulter Stoppreagenz CSR-1 beendet. Die entstandene Farbinintensität ist direkt proportional zum HIV-Antigenspiegel in der Probe.

Reagenzien:

- HIV-Reaktionsplatte: mit HIV-1-p24-Antikörper (Maus monoklonal) beschichtete Mikrotiterplatte
- HIV-1-p24-Antigen-Reagenz
- NHS: Normales Humanserum (negativ für HIV-1-Antigen, HIV-1-Antikörper und HBs-Antigen)
- Lyse-Puffer (enthält Triton X-100, K₂-EDTA, Tween-20, Thimerosal)
- CH-Biotin: Anti-HIV-(human)-Biotin-Reagenz
- SA-HRPO: an Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin; (Konservierungsmittel: Gentamycin und Thimerosal)
- SA-Puffer: Puffer für SA-HRPO; (Gentamycin und Thimerosal)
- TMB-Substratlösung: Tetramethylbenzidin in Dimethylsulfoxid
- TMB-Verdünnungslsg: Citrat-Phosphat-Puffer mit 0,0045 % Wasserstoffperoxid
- CSR-1: Coulter Stopp Reagenz (2 mol/l H₂O₂)
- Waschpuffer (Kaliumphosphatpuffer, Tween 20 und 2-Chloracetamid)

p24-Antigen Eichkurve:

Das HIV-p24-Antigenreagenz wurde mit NHS und PBS im Mischungsverhältnis 1:2 verdünnt. Dabei ergaben sich folgende Endkonzentrationen: 1,95; 3,90; 7,81; 15,62; 31,25; 62,50 und 125 pg/ml.

Versuchsdurchführung:

Je 200 µl der Negativkontrolle (=NHS), der Standards, der Proben und der Positivkontrolle (=200 µl NHS + 50 µl p24-Antigenreagenz) wurden in die Antikörperbeschichtete HIV-Reaktionsplatte pipettiert (Doppelbestimmung).

- 60 Min. Inkubation mit 20 µl Lysepuffer bei 37°C.
- Sechs mal waschen mit Kaliumphosphatpuffer
- 60 Min Inkubation mit 200 µl CH-Biotin bei 37°C.
- Sechs mal waschen mit Kaliumphosphatpuffer
- 30 Min. Inkubation mit 200 µl SA-HRPO bei 37°C.
- Sechs mal waschen mit Kaliumphosphatpuffer
- 30 Min. Inkubation mit 200 µl TMB-Substrat bei Raumtemperatur (abgedunkelt)
- Stopp der Reaktion mit 50 µl CSR-1
- Messung im ELISA-Reader bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 570 nm)

Der Leerwert enthielt ausschließlich TMB-Substrat und CSR-1.

2) p24-Antigenbestimmung mit Immunkomplex-Dissoziation

Mit dem Coulter ICD-Prep Kit und dem Coulter HIV-1 p24 Antigen Assay wurde p24-Antigen nachgewiesen, welches als Antigen-Antikörperkomplex vorliegt.

Reagenzien:

- Glycin Reagenz
- Trispuffer
- p24 Immunkomplexpositivkontrolle
- HIV-1 p24 Antigen Assay (siehe 3.3.4.1)
- vNHS: NHS wurde mit PBS in Mischungsverhältnis 1:2 verdünnt.
- Mikrotiterplatte (96 well; unbeschichtet mit Flachboden) und Inkubationstüten.

p24-Antigen-Eichkurve:

Das HIV-p24-Antigenreagenz wurde mit vNHS verdünnt. Dabei entstanden folgende Endkonzentrationen: 15,6; 31,3; 62,5; 125 und 250 pg/ml.

Versuchsdurchführung:

Zunächst erfolgte die Immunkomplex-Dissoziation auf einer unbeschichteten Mikrotiterplatte (Tabelle 4). Anschließend wurde p24 mit eine p24-Antigen-ELISA bestimmt.

Tabelle 4: Durchführung der Immunkomplex-Dissoziation:

Einpipettieren der Lösungen in die Kavitäten einer unbeschichteten Mikrotiterplatte:				
Zugegebenes Reagenz:	Standard	Negativkontrolle	Probe	Immunkomplex-Positivkontrolle
Standard	100 µl			
Probe			100 µl	
Negativkontrolle (=vNHS)		100 µl		
IK-Positivkontrolle				100 µl
Lysepuffer	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
Neutralpuffer	100 µl	100 µl		
Glycinpuffer			100 µl	100 µl
	5 mal mischen mit Multichannelpipette			
	90 min. Inkubation bei 37°C (abgedeckt)			
Neutralpuffer	100 µl	100 µl		
Trispuffer			100 µl	100 µl
	5 mal mischen mit Multichannelpipette			
	Je 200 µl auf Antigenplatte überpipettieren			
	18 bis 24 Stunden Inkubation bei 37°C			

p24-Antigenbestimmung:

Sechs mal waschen mit Kaliumphosphatpuffer

- 60 Min. Inkubation mit 200 µl CH-Biotin bei 37°C.
- Sechs mal waschen mit Kaliumphosphatpuffer
- 30 Min. Inkubation mit 200 µl SA-HRPO bei 37°C.
- Sechs mal waschen mit Kaliumphosphatpuffer
- 30 Min. Inkubation mit 200 µl TMB-Substrat bei Raumtemperatur (abgedunkelt)
- Stopp der Reaktion mit 50 µl CSR-1
- Messung im ELISA-Reader bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 570 nm).

Der Leerwert enthielt ausschließlich TMB und CSR-1.

Standard, Proben und Negativkontrolle wurden in Doppelbestimmung, die Immunkomplex-Positivkontrolle als Dreifachkontrolle durchgeführt.

3.3.4 Untersuchungen zur Validität der p24-Bestimmung im Stuhl und zum Einfluss der Säuredissoziation auf die Sensitivität des p24-Antigen-ELISA

Die quantitative Bestimmung von HIV-1-p24-Antigenen im Stuhl ermöglichte Untersuchungen, die zum einen erlauben, ein auf Serum geeichtes Testverfahren zur p24-Bestimmung in Stuhlüberständen einzusetzen, und zum anderen den Einfluss der Säuredissoziation auf die Nachweisempfindlichkeit des p24-Ag-ELISA zu prüfen.

1) Untersuchungen zur Validität der p24-Bestimmung im Stuhl

1.1) Standardherstellung mit dem Stuhlüberstand HIV-negativer Probanden:

In Vorversuchen wurde zunächst rekombinant hergestelltes p24-Antigen im Stuhl HIV-negativer Kontrollpersonen gelöst und anschließend als Standard verwendet. Zur Präzision des ELISA wurden drei verschiedene Stuhlproben je fünfmal in ein- und derselben Mikrotiterplatte wiederholt (Intra-Assay-Varianz) sowie fünfmal in drei unterschiedlichen Mikrotiterplatten (Inter-Assay-Varianz) bestimmt.

1.2) Korrelation zwischen p24-Konzentrationen im Serum und Stuhlüberstand:

Mit dieser Untersuchung sollte herausgefunden werden, ob der p24-Antigen-ELISA eine in den Stuhl gegebene p24-Konzentration messen kann und wenn ja, in welcher Beziehung die im Stuhl und Serum gemessenen p24-Konzentrationen stehen. Dafür wurde Serum aus dem Testkit sowie HIV-negativer Stuhl mit den gleichen p24-Konzentrationen versetzt und nach Durchführung des p24-Antigen-ELISA wieder gemessen. Anschließend wurde die Linearität beider Verfahren bestimmt.

1.3) Wiederfindungsrate von p24-Konzentrationen in Stuhlüberständen:

Zur quantitativen Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde der Stuhl von drei HIV-negativen Probanden mit den folgenden p24-Konzentrationen versetzt: 15,6; 31,3; 62,5; 125 und 250 pg/ml. Anschließend wurde ein p24-Antigen-ELISA mit Säuredissoziation durchgeführt und die Extinktionen und p24-Konzentrationen gemessen, woraus dann der prozentuale Anteil des im Stuhl wiedergefundenen p24 berechnet wurde.

1.4) Berechnung der p24-Konzentrationen:

Unter Verwendung der Eichkurve berechnete der ELISA-Reader aus den Extinktionen der Proben die entsprechenden p24-Konzentrationen. In dieser Arbeit wurden stets diese Werte angegeben, obwohl die tatsächlichen p24-Konzentrationen im Stuhl etwa um den Faktor 12 höher liegen dürften als mit dem ELISA gemessen wurde. Denn zur Aufbereitung der Stuhlproben wurde das Untersuchungsmaterial 1:4 mit PBS verdünnt und zweitens ergab die Bestimmung der Wiederfindungsrate, dass etwa ein Drittel des im Stuhl vorhandenen p24-Antigen gemessen wurde.

2) Voruntersuchungen zum Einfluss der Immunkomplex-Dissoziation auf die Nachweisempfindlichkeit des p24-Antigen-ELISA

2.1) Vergleich der maximalen Extinktion im p24-Antigen-ELISA vor und nach Immunkomplex-Dissoziation:

Da der ELISA-Reader die Konzentrationen an p24 anhand der gemessenen Extinktion berechnet, wurde zum Vergleich der Empfindlichkeit beider Testverfahren die Höhe der Extinktionen bei gleicher p24-Konzentration vor und nach Immunkomplex-Dissoziation bestimmt.

2.2) Korrelation zwischen Extinktion und p24-Konzentration vor und nach Immunkomplex-Dissoziation:

Da der ELISA-Reader die Konzentrationen für p24 anhand der gemessenen Extinktion der Serum-p24-Eichkurve berechnet, wurde nach einer möglichst linearen Beziehung zwischen p24-Konzentration und Extinktion im Stuhlüberstand gesucht. Dafür wurde Serum aus dem Testkit (NHS) sowie Stuhlüberstand von HIV-negativen Probanden mit den gleichen p24-Konzentrationen versetzt und anschließend mit dem p24-Antigen-ELISA wieder gemessen.

2.3) Sensitivität und Spezifität des p24-Antigen-ELISA vor und nach Immunkomplex-Dissoziation:

Die Erstellung von Kreuzklassifikationen (Vierfelder-Tafeln) und ROC-Kurven zur Bewertung der Sensitivität und Spezifität des p24-Antigen-ELISA vor und nach Immunkomplex-Dissoziation wird in Kapitel 3.4.1 beschrieben.

3.3.5 Diagnostik sekundärer intestinaler Erreger

Die Patienten wurden zur Abklärung von Magen-Darm-Störungen auf das Vorhandensein von intestinalen Erregern untersucht. Neben Stuhlproben wurden dazu die mittels Oesophagogastroduodenoskopie und flexibler Koloskopie entnommenen Biopsien verwendet, die anschließend histologisch, mikrobiologisch und virologisch untersucht wurden. Zur histochemischen Untersuchung wurden die Paraffin-Schnitte der Formaldehyd-fixierten Biopsien mit Hämatoxylin-Eosin (HE), Giemsa und Perjodsäure-Schiff'sches Reagenz (PAS) gefärbt. Außerdem wurden spezifische Färbungen nach Ziehl-Nelson, Grocott und Gram vorgenommen. Anschließend wurden die so gefärbten Präparate mit dem Lichtmikroskop auf Bakterien, Protozoen und Pilze untersucht.

Ferner wurden sowohl von Biopsien als auch von Stuhlproben Kulturen zum Nachweis von atypischen Mykobakterien, *Campylobakter spp.*, *Clostridium difficile*, *Salmonella spp.* und *Shigella spp.* angelegt.

Zum Nachweis von Viren in Stuhlproben und Biopsien wurden an drei verschiedenen Zelllinien Beobachtungen hinsichtlich des charakteristischen zytopathischen Effekts vorgenommen. Die Identifikation von Adeno-, Corona- und Rotaviren in Stuhlproben erfolgte mittels Elektronenmikroskopie. Zusätzlich wurden die Biopsien von Schleimhautläsionen immunhistologisch auf das Vorhandensein von Cytomegalie-Viren (CMV) überprüft.

Des Weiteren wurden die Stuhlproben mikroskopisch auf Eier und Parasiten - einschließlich Kryptosporidien und Isosporidien - untersucht.

3.3.6 Bestimmung von Interleukin-1 α

Zur quantitativen Bestimmung von Interleukin-1 α (IL-1 α) wurde ein Sandwich ELISA der Firma IMMUNOTECH verwendet. Proben und Standard werden zu einem spezifischen anti- IL-1 α Antikörper pipettiert und inkubiert. Nach den folgenden Waschschritten wurde dann ein zweiter monoklonaler anti- IL-1 α Antikörper, welcher an Acetylcholinesterase gebunden ist, zugegeben. Nach Inkubation der wells und weiteren Waschschritten gibt man ein chromogenes Substrat dazu. Die Intensität der Farbe ist proportional zur IL-1 α -Konzentration.

Reagenzien:

- IL-1 α Mikrotiterplatte: anti-IL1 α - monoklonal antikörperbeschichtete Mikrotiterplatte mit 12x8 wells.
- IL-1 α Standard
- Substrat: enthält Acetylthiocholin in Kaliumphosphatpuffer unter Zusatz von Natrium-Dithiobenzoat
- IL-1 α Konjugat: Anti-IL-1 α monoklonale Antikörper konjugiert mit Acetylcholinesterase
- IL-1 α Diluent 1 (Verdünnungslösung)
- IL-1 α Diluent 2 (Verdünnungslösung)
- Waschlösung
- Stopplösung

IL-1 α Eichkurve:

Durch Verdünnung des Standards (1000 pg/ml) mit Diluent 2 entstanden folgende Endkonzentrationen: Null; 15,6; 62,5; 250 und 1000 pg/ml.

Versuchsdurchführung:

- In die antikörperbeschichteten Mikrotiter-Streifen wurden zu 100 μ l der Standardverdünnungen je 100 μ l Diluent 1 dazugegeben beziehungsweise zu 100 μ l Probe jeweils 100 μ l Diluent 2 pipettiert.
- Stunden Inkubation bei 2 bis 8°C
- Fünf mal waschen
- 12 - 18 Stunden Inkubation mit 200 μ l Enzym-Konjugat bei Raumtemperatur
- Fünf mal waschen
- 15 bis 30 Min. Inkubation mit 200 μ l Substrat auf einem Rotationsschüttler (350 rpm), im Dunkeln bei Raumtemperatur
- 50 μ l Stopplösung
- Messung im ELISA-Reader bei 405 bis 414 nm gegen den Substratleerwert

Der Leerwert enthielt ausschließlich Substrat und Stopplösung.

3.3.7 Bestimmung des Tumor Nekrose Faktor- α

Zur quantitativen Bestimmung von Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) wurde ein Sandwich ELISA der Firma LABOSERV verwendet. Die Mikrotiterplatte ist mit einem spezifischen anti-TNF- α Antikörper beschichtet. Proben, Standards und Kontrollen werden zu diesem capture-Antikörper pipettiert, und das TNF- α Molekül wird an der Oberfläche der wells gebunden. Nach den folgenden Wasch-schritten wurde dann ein biotinyliertes polyklonales TNF- α Antiserum, das gegen andere Epitope gerichtet ist, zugegeben. Dieses bindet an das bereits in den wells gebundene TNF- α Molekül. Nachdem der nicht gebundene Anteil an Zweitantikörper durch weitere Waschschr- itte entfernt wurde, gibt man Streptavidin-Peroxidase-Konjugat hinzu. Streptavidin bindet an Biotin. Durch die Verwendung einer Biotin-Streptavidin-Brücke wird ein Verstärkungseffekt und damit die hohe Sensitivität erzielt. Nachdem das nicht ge- bundene Konjugat durch einen weiteren Waschschrift entfernt wurde, gibt man die TMB Substratlösung dazu, die mit dem gebundenen Enzym einen Farbkomplex bil- det. Die Intensität der Farbe ist proportional zur TNF- α -Konzentration.

Reagenzien:

- Mikrotiterplatte (beschichtet mit monoklonalem anti TNF- α Antikörper)
- Humaner TNF- α -Standard
- Anti-TNF- α Biotin-Konjugat (enthält zusätzlich Natriumazid und Mausserum)
- Streptavidin-Peroxidase (stabilisiert mit Thimerosal)
- TMB Substrat
- Stopplösung
- Verdünnungspuffer
- Streptavidin-Peroxidase Verdünner (stabilisiert mit Thimerosal)
- Waschpuffer

TNF- α Eichkurve:

Das Human-TNF- α -Standard-Reagenz wurde mit dem im Testkit enthaltenen Ver- dünnungspuffer versetzt, so dass folgende Endkonzentrationen entstanden: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 und 32,0 pg/ml.

Versuchsdurchführung:

- Je 100 µl der Negativkontrolle (=Verdünnungslösung für Standardherstellung), der Standards, der Proben und der Positivkontrolle wurden in die antikörperbeschichteten Mikrotiterstreifen pipettiert (Doppelbestimmung).
- 180 Min. Inkubation bei 37°C
- Vier mal waschen
- 60 Min. Inkubation mit 100 µl anti TNF- α Biotin-Konjugat bei 37°
- Sechs mal waschen
- 45 Min. Inkubation mit 100 µl verdünntem Streptavidin-Peroxidase Konjugat bei Raumtemperatur.
- Sechs mal waschen
- 15 Min. Inkubation mit 100 µl TMB-Substrat (bei Raumtemperatur im Dunkeln)
- Stopp der Reaktion mit 100 µl Stopplösung
- Messung im ELISA-Reader bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 620 nm)

Der Leerwert enthielt ausschließlich TMB-Substrat und Stopplösung.

3.4 Statistik

3.4.1 Maßzahlen für die Validität der p24-Bestimmung im Stuhl

Die Validität des oben beschriebenen Tests bemisst sich danach, wie gut man damit den tatsächlichen Sachverhalt erkennt. Dieser wird mit den Maßzahlen Sensitivität und Spezifität beschrieben. Die Sensitivität des Tests ist seine Fähigkeit, tatsächlich Kranke als krank und die Spezifität ist die Fähigkeit, tatsächlich Gesunde als gesund zu erkennen. Als zusammenfassende Maßzahl wurde die Treffsicherheit T (accuracy) als relativer Anteil der richtigen (positiven und negativen) Befunde an allen Befunden angegeben. Da dieser von der Prävalenz der Kranken in der untersuchten Stichprobe abhängt, wurde noch der Youden-Index Y berechnet. Ist dieser größer null, besteht ein positiver Zusammenhang zwischen den Testergebnissen und dem tatsächlichen Sachverhalt.

Zur Bestimmung von Sensitivität und Spezifität des p24-Antigen-ELISA wurden Vier-Felder-Tafeln und ROC-Kurven angefertigt.

1) Vier-Felder-Test

Zur Analyse, ob die unterschiedlichen Häufigkeiten der Merkmalsausprägungen "HIV-krank" und "gesund" zufällig sind oder nicht, sollte ein Chi-Quadrat-Test verwendet werden. Da es sich hierbei um zwei Alternativmerkmale handelt, wurde der Zusammenhang mit Hilfe des Vier-Felder-Test untersucht. Anschließend wurden die Ergebnisse in Form einer Kreuzklassifikation dargestellt (Tabelle 5), in der die Häufigkeiten falscher und richtiger Befunde aufgeführt sind [36].

Tabelle 5: Vier-Felder-Tafel zur Berechnung von Sensitivität und Spezifität des p24-Antigen-ELISA

	Tatsächlicher Sachverhalt	
	krank	gesund
positiver Befund: (a+b)	a "richtig positiv"	b "falsch positiv"
negativer Befund: (c+d)	c "falsch negativ"	d "falsch negativ"

Legende:
Sensitivität = $a/(a+c)$
Spezifität = $d/(b+d)$
Trennschärfe = $(a+d)/(a+b+c+d)$
Youden-Index Y = Sens+Spez-1

2) Receiver-Operating-Kurve

Um die Trennschärfe der Messgrößen "p24-ICD" und "p24+ICD" miteinander zu vergleichen, verwendeten wir Receiver-Operating-Kurven (ROC). Sie dienen aber auch dazu, den beim Verschieben des Schwellenwertes erzielten Gewinn an zusätzlichen richtig positiven Befunden gegen die Implikationen der zugleich auftretenden falsch positiven Befunde abzuwägen, das heißt den optimalen Grenzwert zu finden.

Durchführung:

In einer Tabelle werden alle Messwerte - beginnend am "pathologischen" Ende des Messwertspektrums - sortiert. Daneben schreibt man die Verteilungen und kumulativen Verteilungen für krank und gesund. Je nachdem zwischen welche Messwerte man die Schwelle für einen positiven Befund legt, verändern sich Sensitivität und Spezifität derselben. Geschieht das in der Tabelle systematisch von oben nach unten, dann lässt sich die jeweilige Rate der richtig positiven Befunde bei den Kranken und der falsch positiven Befunde bei den Gesunden direkt anhand der kumulierten Verteilungen ablesen, die in den letzten beiden Spalten der Tabelle angegeben sind. Trägt man für jede Schwelle die zugehörigen Wertepaare (Sens, 100-Spez) der kumulierten Verteilung in einem Koordinatenkreuz auf, so erhält man die ROC-Kurve.

3.4.2 Deskriptive und induktive Statistik der Untersuchungsergebnisse

In der Annahme, dass die charakteristischen Eigenschaften weitgehend mit denen der Grundgesamtheit übereinstimmen, beschränkten wir uns auf die Untersuchung einer Stichprobe von 181 HIV-Infizierten und 26 Probanden.

1) Merkmal-Charakterisierung und Variabilität der Messwerte

Zur Charakterisierung der Merkmale HIV-1 p24, IL-1 α und TNF- α wurden Mittelwert (auch Durchschnitt genannt), Median und Quartilen berechnet. Über die Variabilität der Messwerte dieser Arbeit informieren folgende Streuungsmaße: die Standardabweichung, der Standardfehler des Mittelwerts und der Variationskoeffizient, der das Verhältnis zwischen Standardabweichung und Mittelwert quantifiziert.

2) Grafische Darstellung der Merkmale

Zur grafischen Darstellung wurden abgewandelte Balkendiagramme und "Box-and-Whisker-Plots" verwendet, da sie besonders geeignet sind um mehrere Stichproben miteinander zu vergleichen.

Mit einem "Box-and-Whisker-Plot" lassen sich mehrere Kenngrößen eines Merkmals darstellen. Die Box wird von den beiden Quartilen begrenzt; innerhalb der Box ist der Median eingezeichnet. Die Whiskers erstrecken sich von den Rändern der Box bis zum Maximum beziehungsweise Minimum. Der zusätzlich eingetragene Mittelwert muss nicht notwendigerweise in der Box liegen.

Bei den abgewandelten Balkendiagrammen entspricht die Höhe der Balken dem jeweiligen Mittelwert und die Höhe der aufgesetzten Linie der Standardabweichung.

3) t-Test für unabhängige Stichproben

Für die Schlussfolgerung, inwieweit die aus der Stichprobe gewonnenen Ergebnisse auf die dazugehörenden Grundgesamtheiten übertragbar sind, kam der parametrische t-Test für unabhängige Stichproben zur Anwendung. Erstens waren die Grundgesamtheiten normal verteilt und zweitens wurde die Stichprobe als unabhängig angesehen, da sich diese aus verschiedenen Individuen zusammensetzte.

4) Korrelations- und Regressionsanalyse

Zur Beschreibung eines möglichen Zusammenhangs zwischen den fäkalen p24-Konzentrationen und zugehöriger CD4-Zahl, zwischen den p24-Konzentrationen in Serum und Stuhl sowie zwischen den fäkalen Konzentrationen an IL-1 α und p24 bediente man sich in dieser Arbeit den Methoden der Korrelations- und Regressionsanalyse. Zeigten beide Merkmale quantitativ-stetige Eigenschaften, wurde zunächst eine Punktwolke erstellt. Dabei repräsentiert jeder Punkt (x;y) die Meßwerte der bestimmten Beobachtungseinheit. Bei einem linearen Zusammenhang ist die Punktwolke ellipsenförmig, sodass sich mittendurch die Regressionsgerade legen lässt. Quantifiziert wurde die Stärke des Zusammenhangs durch den Korrelationskoeffizienten r nach Pearson. Je näher r bei -1 oder $+1$ liegt, desto stärker ist der Zusammenhang. Ein positiver Korrelationskoeffizient kennzeichnet einen gleichsinnigen, ein negativer einen gegensinnigen Zusammenhang.