

4. Methoden

4.1. Anamneseerhebung und Biopsiegewinnung in der Praxis

Nahezu alle Biopsien wurden in der gastroenterologischen Praxis von Dr. Strötter, Brandenburgische Str. 42, 10707 Berlin, entnommen.

Der folgende Untersuchungsgang wurde strikt eingehalten: Vor der Untersuchung wird eine standardisierte Anamnese durch den Untersucher erhoben:

Allgemeine Daten: Name

Geburtsdatum

Geschlecht

Die Gastroskopie wird vom Arzt durchgeführt: Nach dem Einführen des Gastroskops wird der Ösophagus, der Magen und das Duodenum untersucht. Aus der Magenschleimhaut werden vier Biopsien entnommen: Zwei für den Urease-Schnelltest und zwei für die Kultur (jeweils aus Antrum und Corpus).

Die Gewebeproben für die Kultur werden direkt in eine Thioglykolat-Lösung gegeben und gelangen innerhalb von 2 Stunden (maximale Zeit) in das mikrobiologische Labor.

Nach der Gastroskopie werden folgende Punkte auf dem Anamnesebogen notiert:

Gastroskopischer Befund

Ergebnis des Urease-Schnelltests

Histologie (je nach Anforderung)

4.2. Anzucht und Subkultivierung im Labor

Im Labor wird je eine Campylobacter-Platte mit einer Gewebeprobe beimpft und 5-7 Tage lang bei 37°C in mikroaerober Atmosphäre (10% CO₂ mit Anaerocult C, Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert.

Danach wird mit Oxidase, Katalase, Urease und Grampräparat überprüft, ob es sich bei dem kultivierten Erreger um *H. pylori* handelt. Ist dies der Fall, wird eine Subkultur für 3-5 Tage unter gleichen Bedingungen angelegt. Danach wird die Reinkultur auf einen Holzkohle-Tupfer überimpft (Transwab, Mast Diagnostica, Reinfeld, Deutschland) und bei -70 °C eingefroren.

4.3. Bestimmung der Ureaseaktivität

4.3.1. Subkultur der Isolate und Verdünnungsreihe

Die fünf Reagenzgläser werden zunächst nach folgendem Schema mit der Brucella-Bouillon gefüllt: Das erste mit 2 ml, die anderen mit 1,8 ml.

Mit einem Wattestäbchen werden nun alle *H.-pylori*-Kolonien einer rekultivierten Subkultur in das erste Reagenzglas übertragen. Mit dem gleichen Wattestäbchen wird danach eine Campylobacter-Platte beimpft. Diese dient zur Reinheitskontrolle und Subkultur für den Wiederholungsversuch und wird für 3-5 Tage in mikroaerober Atmosphäre und 37 °C kultiviert.

Für die Verdünnungsreihe werden nun aus dem ersten Reagenzglas 200 µl in das zweite Reagenzglas pipettiert, so daß von Röhrchen 1-3 eine dezimale 1:10er Verdünnungsreihe entsteht (siehe Abbildung 2).

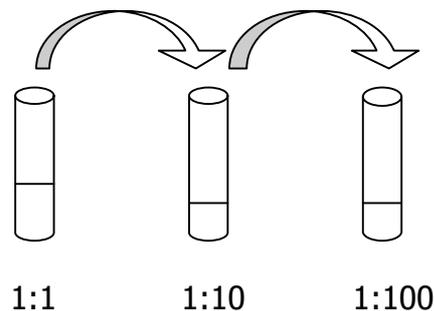


Abbildung 2: Herstellung der Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Ureaseaktivität

4.3.2. Ureaseaktivitätsbestimmung

Die Photometerröhrchen werden nun alle mit 900 µl Harnstofflösung gefüllt. Dann werden jeweils 100 µl aus den Reagenzgläsern der Verdünnungsreihe in die Photometerröhrchen pipettiert. Unmittelbar danach wird die erste Messung mit dem Photometer (LKB, Bromma, Schweden) bei 546 nm durchgeführt. Insgesamt wird in der ersten Stunde alle 10 Minuten, und in der zweiten Stunde alle 15 Minuten gemessen.

Damit alle untersuchten H.-pylori-Stämme denselben Umweltbedingungen ausgesetzt werden, erfolgt die Messung aller zu testenden Stämme ebenfalls an demselben Tag.

4.3.3. Keimzahlbestimmung

Für die Keimzahlbestimmung werden alle Reagenzgläser mit 900 µl isotoner Kochsalzlösung gefüllt. In das erste Reagenzglas werden 100 µl der unverdünnten H.-pylori-Lösung pipettiert und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Eine Campylobacter-Platte wird daraufhin folgendermaßen beimpft: Aus Röhrchen 1-5 der Verdünnungsreihe werden jeweils 25 µl entnommen und vorsichtig auf die Campylobacter-Platte pipettiert, wie Abbildung 3 zeigt.

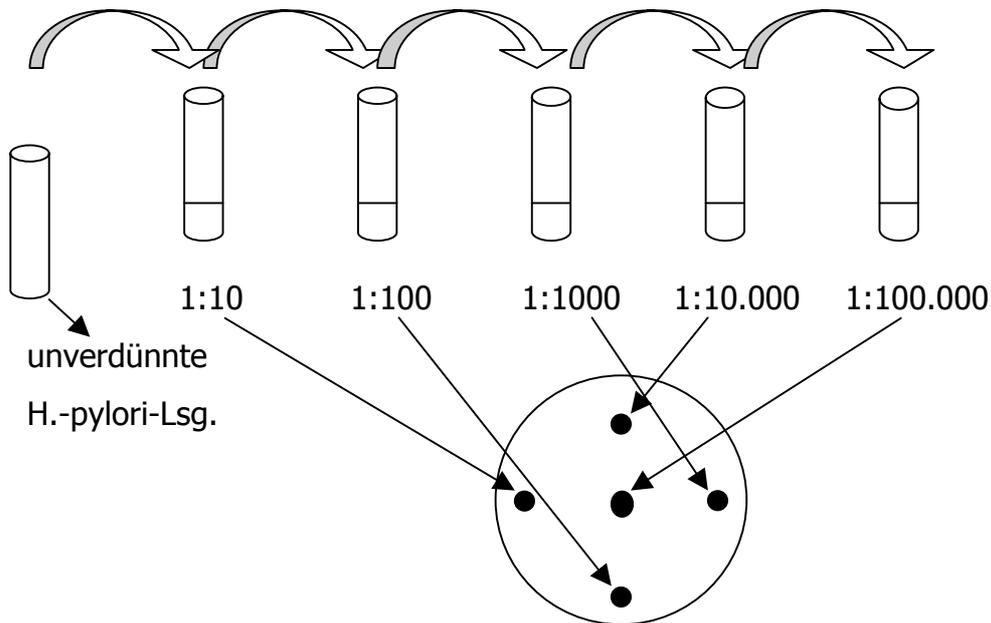


Abbildung 3: Herstellung der Verdünnungsreihe zur Keimzahlbestimmung

Diese Agarplatte wird ebenfalls für 3-5 Tage bei 37°C und mikroaerober Atmosphäre bebrütet. Nach dieser Zeit erfolgt die Auszählung der Erreger: Bei derjenigen Verdünnung, bei der die angewachsenen Kolonien einzeln gut zu sehen sind und nicht miteinander verfließen, werden diese gezählt und mit dem Verdünnungstiter (Divisor) und dem Faktor 4 multipliziert. Die Reihenfolge der Ausimpfung wird immer gleichgehalten, damit auch die niedrigsten Keimzahlen noch erfaßt werden.

4.4. Auswahl der Helicobacter-pylori-Stämme

Für die Versuche wurden 8 H.-pylori-Stämme randomisiert aus den unter 4.1. gewonnenen Isolaten und 3 aus dem vorhandenen Pool des Labors ausgewählt. Alle sind nach demselben Schema (wie unter 4.1. beschrieben) angezüchtet worden. Außerdem existierte zu jedem Isolat eine vollständige Anamnese, endoskopische und histologische Diagnose sowie das Ergebnis des Urease-Schnelltests.