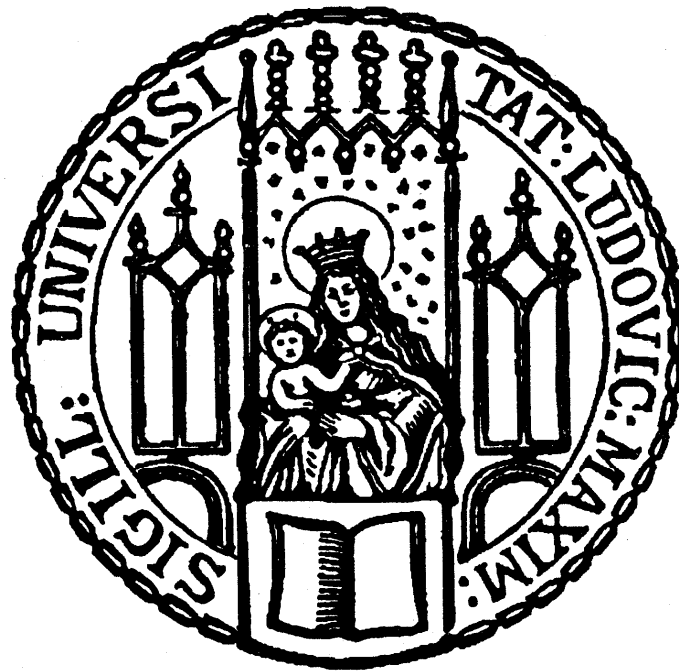


**Evaluation eines Enzymimmunoassays und
einer Real-Time PCR für den Nachweis von
Helicobacter pylori in Stuhlmaterial von Kindern**



Christian Lottspeich

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische
Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann

**Evaluation eines Enzymimmunoassays und
einer Real-Time PCR für den Nachweis von
Helicobacter pylori in Stuhlmaterial von Kindern**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christian Lottspeich

aus

München

Jahr

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Holger Rüssmann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Jörg Schirra Priv.-Doz. Dr. med. Philip Bufler
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Klaus Panthel
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	20.01.2011

Teile dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

LOTTSPREICH, C., A. SCHWARZER, K. PANTHEL, S. KOLETZKO AND H. RÜSSMANN (2007). Evaluation of the novel *Helicobacter pylori* ClariRes real-time PCR Assay for detection and clarithromycin susceptibility testing of *H. pylori* in stool specimens from symptomatic children. *Journal of Clinical Microbiology* **45**(6): 1718-1722.

SCHWARZER, A., C. LOTTSPREICH, H. RÜSSMANN, G. OSSIANDER AND S. KOLETZKO (2007). Evaluation of a novel rapid one-step monoclonal chromatographic immunoassay for detection of *Helicobacter pylori* in stool from children. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **26**(7): 475-480.

C. PRELL, S. OSTERRIEDER, C. LOTTSPREICH, A. SCHWARZER, H. RÜSSMANN, G. OSSIANDER AND S. KOLETZKO (2009). Improved performance of a rapid office-based stool test for detection of *Helicobacter pylori* in children before and after therapy. *Journal of Clinical Microbiology* **47**(12): 3980-3984.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Entdeckung von <i>Helicobacter pylori</i>	1
2	Epidemiologie	2
2.1	Prävalenz und Risikofaktoren	2
2.2	Übertragungswege	3
3	Eigenschaften von <i>Helicobacter pylori</i>	3
3.1	Morphologie und Bakteriologie	3
3.2	Virulenzfaktoren	4
3.3	Antibiotika-Resistenzen	6
3.3.1	Metronidazol	7
3.3.2	Clarithromycin	7
3.3.3	Amoxicillin	8
3.3.4	Weitere Antibiotika	9
4	<i>Helicobacter pylori</i> -assoziierte Erkrankungen	9
4.1	Akute Gastritis	10
4.2	Chronische Gastritis	10
4.3	Magen- und Duodenalulkus	11
4.4	Magenkarzinom und MALT-Lymphom	11
5	Diagnostik	12
5.1	Invasive Diagnostik	13
5.1.1	Histologie	13
5.1.2	Kultur und E-Test	13
5.1.3	Urease-Schnelltest	14
5.1.4	Molekularbiologische Verfahren	14
5.2	Nicht-invasive Diagnostik	15
5.2.1	¹³ C-Harnstoff-Atemtest	15
5.2.2	Serologie	16
5.2.3	Enzymimmunoassays (Stuhl)	16
5.2.4	Molekularbiologische Verfahren (Stuhl)	16
6	Therapie	17
II	Zielsetzung	19

III	Material und Methoden.....	20
1	Patienten.....	20
2	Gastrointestinale Endoskopie und Histologie.....	20
3	Kultur und E-Test.....	20
3.1	Kultur.....	20
3.2	E-Test.....	21
4	¹³ C-Harnstoff-Atemtest.....	22
5	Definition des <i>Helicobacter pylori</i> -Infektionsstatus.....	22
6	EIA für Stuhlmaterialien.....	23
6.1	Methodik des Stuhl-EIA.....	23
7	Stuhlaufreinigung für die molekulare Diagnostik.....	24
7.1	DNA-Extraktion aus Stuhlproben.....	24
7.2	Photometrische Kontrolle der DNA-Extraktion.....	25
8	Real-Time PCR.....	25
8.1	Methodik der Real-Time PCR.....	25
8.2	Positivkontrollen.....	28
9	Statistische Analysen.....	29
IV	Ergebnisse.....	30
1	Demographische Daten der Patienten.....	30
2	<i>Helicobacter pylori</i> -Infektionsstatus der Patienten.....	30
2.1	<i>Helicobacter pylori</i> -Infektionsstatus.....	30
2.2	Ergebnisse der Clarithromycin-Sensitivitätstestung.....	31
3	Stuhl-EIA.....	32
4	Stuhlaufreinigung.....	33
5	Real-Time PCR.....	34
V	Diskussion.....	37
1	Diskussion des Patientenkollektivs und der Standard-Diagnostik.....	37
2	Diskussion des Stuhl-EIA.....	38
3	Diskussion der Real-Time PCR.....	40
4	Fazit und Ausblick.....	42
VI	Zusammenfassung.....	44
VII	Summary.....	46
VIII	Literaturverzeichnis.....	48
IX	Anhang.....	58

1	Abkürzungsverzeichnis	58
2	Sequenz der 23S rRNA von <i>Helicobacter pylori</i>	60
3	Ausführliche Patientenliste	61
X	Danksagung	64
XI	Lebenslauf.....	65

I Einleitung

Seit es 1982 gelang, den Magenkeim *Helicobacter pylori* zu kultivieren, ist dieser Mikroorganismus im zentralen Interesse der Medizin. Viele Fachgebiete der Medizin – Gastroenterologie, Infektiologie, Mikrobiologie, Onkologie, Pathologie, Pharmakologie und Pädiatrie – beschäftigen sich seitdem in Klinik und Forschung mit *Helicobacter pylori*. Auch wenn seit dieser Entdeckung chronische Gastritiden und peptische Ulzera in den meisten Fällen als behandelbare Infektionskrankheiten gelten, gibt es z.B. durch Antibiotika-Resistenzen immer neue Herausforderungen in Diagnostik und Therapie.

1 Entdeckung von *Helicobacter pylori*

Bereits 1893 publizierte der Anatom Giulio Bizzozero das Vorkommen von spiralförmigen Mikroorganismen in der Magenschleimhaut von Hunden [15]. Der deutsche Wissenschaftler Walter Krienitz beschrieb 1906 die Entdeckung von „Spirochaeten“ in der Umgebung von Magenkarzinomen verstorbenen Patienten [77]. Auch weitere Forscher konnten Bakterien in Magenbiopsien entdecken, so Freedberg und Baron 1940 sowie Steer und Colin-Jones 1975. Diese konnten jedoch noch nicht die Bedeutung der Magenkeimbesiedlung erkennen [41, 136].

Erst im Jahr 1982 gelang der Durchbruch, als der Pathologe Robin Warren und der Mediziner Barry Marshall einen Urease-bildenden Keim aus Schleimhautbiopsien von Patienten mit chronischer Gastritis und Magenulzera isolierten und kultivierten [97, 151]. Sie postulierten erstmals einen ätiologischen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Bakteriums mit chronischen Gastritiden und peptischen Ulzera beim Menschen. Anfangs wurde dieser Publikation seitens der Mediziner kaum Bedeutung zugesprochen, jedoch zeigten sich nach und nach immer mehr Bestätigungen für ihre Theorie [53]. Kurze Zeit später erfolgten auch erste Studien zum Nachweis des Keims bei Kindern mit Gastritis-Symptomen [18, 29, 62].

Von Warren und Marshall wurde der entdeckte Mikroorganismus zuerst als *Campylobacter pyloridis* (*pylorus* [lat.] = Magenpfortner) bezeichnet [97]. Nach

Umbenennung in *Campylobacter pylori* aus grammatikalischen Gründen, setzte sich nach biochemischer und molekularbiologischer Charakterisierung die Bezeichnung *Helicobacter pylori* (*helico* [gr.] = spiralförmig) durch [52, 96]. Für ihre jahrelange Arbeit und Entdeckungen im Bereich der Forschung zu *Helicobacter pylori* erhielten Marshall und Warren 2005 den „Nobelpreis für Physiologie oder Medizin“ [1].

2 Epidemiologie

2.1 Prävalenz und Risikofaktoren

Die Infektion mit *Helicobacter pylori* ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten weltweit. In Entwicklungsländern kann bei Erwachsenen von einer Prävalenz von mehr als 80% ausgegangen werden, in Industrienationen liegt die Infektionsrate mit 20-50% deutlich niedriger [11, 117, 120, 144]. Aber auch innerhalb dieser Gruppen gibt es Unterschiede in der Prävalenz. Ein niedriger sozioökonomischer Status, niedriges Einkommen, schlechte Hygienestandards und beengte Wohnverhältnisse sind Risikofaktoren für eine *Helicobacter pylori*-Infektion im Kindesalter [93, 103]. In einer Zwillingsstudie wurde ermittelt, dass auch genetische Faktoren eine Rolle spielen [92].

Eine weitere Abhängigkeit ergibt sich durch das Alter. Es gilt als sicher, dass der größte Teil der Infektionen im Kindesalter akquiriert wird [24, 104, 121]. Mit zunehmendem Alter kann allerdings auch von einer erhöhten Infektionsrate ausgegangen werden. Dieser Effekt beruht größtenteils auf dem Kohortenphänomen. Ältere Generationen hatten noch ein höheres Risiko sich in der Kindheit mit *Helicobacter pylori* zu infizieren, als Personen, die in den letzten Jahrzehnten geboren wurden [10, 80, 119]. Man geht davon aus, dass die Rate der Neuinfektionen beim Erwachsenen pro Lebensjahr lediglich bei etwa 1% liegt [104, 155]. Dies spricht für ein eher geringes Übertragungsrisiko im Erwachsenenalter. Die besonders in den Industrienationen sinkende Prävalenz der *Helicobacter pylori*-Infektionen führt man auf höhere hygienische Standards, bessere medizinische Versorgung und bessere Wohnverhältnisse zurück [6, 123]. Bei den mit *Helicobacter pylori*-assoziierten Erkrankungen wie Gastritis

und Magenkarzinom kann man korrelierend eine sinkende Prävalenz erkennen [132].

2.2 Übertragungswege

Da *Helicobacter pylori* fast ausschließlich beim Menschen vorkommt, gilt der Übertragungsweg von Person zu Person als wahrscheinlich [50]. Es wird angenommen, dass in erster Linie nahe stehende infizierte Personen (Familienangehörige) als Überträger eine Rolle spielen [28, 122]. Der genaue Infektionsweg für *Helicobacter pylori* ist noch nicht geklärt, es wird vermutet, dass mehrere Faktoren zusammenspielen.

Helicobacter pylori konnte im Mundraum, im Speichel sowie in Erbrochenem nachgewiesen werden [36, 113, 149]. Somit könnte der Keim oro-oral durch Schleimhautkontakt oder Speichel, bzw. gastro-oral durch Reflux und Erbrechen übertragen werden. Nachdem *Helicobacter pylori* auch aus Stuhlmaterialien kultiviert werden konnte, wird angenommen, dass unter bestimmten Bedingungen (schlechte hygienische Verhältnisse, Durchfallerkrankung des Wirts) auch der fäkal-orale Übertragungsweg in Frage kommt [68, 113, 145]. Weitere Infektionswege, wie kontaminiertes Wasser, iatrogene Übertragung durch verschmutztes Endoskopiebesteck und zoonotische Übertragungen durch Haustiere werden kontrovers diskutiert [40, 72, 154].

3 Eigenschaften von *Helicobacter pylori*

3.1 Morphologie und Bakteriologie

Helicobacter pylori ist ein gramnegatives, gebogenes bis spiralförmig gewundenes Stäbchen-Bakterium, das sich durch lophotriche Begeißelung fortbewegt. Neben der Spiral-Form kommt eine rundliche, kokkoide Form vor, deren Funktion und Infektiosität bis heute nur unzureichend geklärt ist [8, 14].

Das relativ kleine Genom von *Helicobacter pylori* umfasst etwa 1,65 Millionen Basenpaare und kodiert für ca. 1500 Proteine [3, 146]. Genomanalysen zeigen, dass *Helicobacter pylori* eine hohe genetische Variabilität aufweist, verursacht durch häufige Mutationen und Rekombination zwischen verschiedenen Stämmen [67, 140]. Falls bei verschiedenen Patienten identische Bakterienstämme

auftreten, kann von einem direkten epidemiologischen Zusammenhang ausgegangen werden [43].

Es sind weitere *Helicobacter*-Spezies bekannt, von denen jedoch einzig *Helicobacter heilmannii* humanpathogen ist. Dieser Keim, der u.a. auch bei Hunden und Katzen zu finden ist, kann beim Menschen eine leichte Gastritis auslösen und ist in weniger als 0,5% aller infektiösen Gastritiden anzutreffen [63, 137]. Weitere *Helicobacter*-Spezies sind in anderen Säugetieren, wie z.B. Hunden (*H. felis*), Katzen (*H. felis*) und Frettchen (*H. mustelae*) zu finden [135].

3.2 Virulenzfaktoren

Der Magen ist durch sein saures Milieu (pH 1-3) und seine dicke Schleimhautschicht gut vor Erregern geschützt. *Helicobacter pylori* ist durch mehrere Virulenzfaktoren an diese Bedingungen adaptiert (Tab. 1).

Tab. 1: Virulenzfaktoren von *Helicobacter pylori* (verändert nach [4])

Virulenzfaktor	Effekt
Kolonisierung	
Flagellen	Motilität; Bewegung zum Schleimhautepithel
Urease	Neutralisation der Magensäure
Adhäsine	Verankerung am Schleimhautepithel
Überleben	
Superoxiddismutase, Katalase	Inaktivierung von Sauerstoff-Radikalen
Blutgruppen-ähnliche Oligosaccharide	Molekulares Mimikry; Adhäsion
Zellschädigung	
VacA-Protein	Schädigung des Epithels
CagA-Protein	Assoziiert mit Folgeerkrankungen

Um vom sauren Magenlumen zur Schleimhautschicht zu kommen, ist Beweglichkeit für *Helicobacter pylori* essentiell [32]. Hierfür besitzt das Bakterium 2-6 Flagellen, die von einer schützenden Mukopolysaccharidschicht umgeben sind [108]. Über den pH-Gradienten orientieren sich die Bakterien hin zur Magenepithelschicht [127].

Charakteristisch für *Helicobacter pylori* ist seine Fähigkeit, für kurze Zeit im sauren Milieu des Magens überleben zu können. Der Keim bildet große Mengen des Enzyms Urease, das die Reaktion von Harnstoff zu Kohlenstoffdioxid und Ammoniumionen katalysiert [105]. Durch die Ammoniumionen wird eine lokale Alkalisierung der Umgebung erzeugt und der Keim kann den Magen kolonisieren [31]. Eine weitere Funktion der Urease ist die Stickstoffmetabolisierung, zusätzlich schädigt das Enzym die Epithelzellen [101, 141].

Nach Durchdringen der Mukusschicht des Magens kann *Helicobacter pylori* engen Kontakt zu den Schleimhautzellen aufnehmen. Spezielle Adhäsine – Proteine, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind – vermitteln die Bindung des Bakteriums an die Epithelzellen [35]. Die Mehrzahl der Bakterien findet sich jedoch im Mukus unmittelbar oberhalb der Epithelzellen [61].

Obwohl für *Helicobacter pylori* ein geringer Anteil an Sauerstoff für das Überleben notwendig ist, reagiert dieser empfindlich auf zu hohe Sauerstoffkonzentrationen. Durch die Enzyme Superoxiddismutase und Katalase wirkt der Keim oxidativem Stress entgegen [58, 130].

Wie andere gramnegative Bakterien, besitzt *Helicobacter pylori* in der äußeren Zellmembran Lipopolysaccharide (LPS). Das O-Polysaccharid des LPS gleicht bei einer Mehrheit der *Helicobacter pylori*-Stämme den Lewis Blutgruppenantigenen [60]. Durch dieses molekulare Mimikry ist das Bakterium besser gegen die Immunantwort des Körpers geschützt [5].

Etwa die Hälfte aller *Helicobacter pylori*-Stämme exprimiert das vakuolisierende Zytotoxin (VacA) [7]. Das Toxin bewirkt eine Zellschädigung in Epithelzellen (Vakuolisierung des Zytoplasmas, Apoptoseinduktion) und hemmt T-Lymphozyten [42, 78, 88].

Das Protein CagA, dessen Auftreten mit der Expression des VacA korreliert, wird von ungefähr 60% der *Helicobacter pylori*-Stämme gebildet [21, 23]. Über

ein Sekretionssystem wird es in Epithelzellen transloziert und greift dort in intrazelluläre Signalwege ein [110]. Das Protein führt zur Veränderung der Zellform, Proliferation und vermehrter Ausschüttung des Zytokins IL-8, wodurch eine starke Entzündungsreaktion hervorgerufen wird [9, 129]. Die Expression des CagA-Proteins ist mit einer erhöhten Rate an schweren Folgeerkrankungen wie Ulkus und Karzinom assoziiert [81].

3.3 Antibiotika-Resistenzen

Die derzeitige Standard-Therapie der *Helicobacter pylori*-Infektion besteht aus einer so genannten Tripletherapie – einer Kombinationstherapie von zwei Antibiotika und einem Protonenpumpen-Inhibitor (PPI) [95]. Antibiotika-Resistenzraten von *Helicobacter pylori* stellen ein ernstzunehmendes Therapieproblem dar. Bei den in Standard-Therapien verwendeten Antibiotika Clarithromycin, Metronidazol und Amoxicillin muss auf Resistenzen geachtet und gegebenenfalls das Therapieschema angepasst werden (siehe Kapitel I 6). Am wichtigsten gilt hier die Resistenz gegenüber Clarithromycin, da die Infektion mit Clarithromycin-resistenten *Helicobacter pylori* ein entscheidender Grund für ein Therapieversagen ist [66, 98]. Die Übersicht über die Prävalenz der Resistenzen und der Vergleich der Eradikationsraten von sensibler und resistenter Infektion ist in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Epidemiologie der Antibiotika-Resistenzen (Europa) und Vergleich der Eradikationsraten von sensiblen und resistenten *Helicobacter pylori*-Infektionen

Antibiotikum	Resistenzrate		Eradikationsrate ^a	
	Erwachsene ^b	Kinder ^c	sensitive Inf.	resistente Inf.
Metronidazol	33%	23%	97%	72%
Clarithromycin	10%	20%	88%	18%
Amoxicillin	0,8%	0,6%	k.A.	k.A.

^a nach Mégraud *et al.* [99]; ^b nach Glupczynski *et al.* [48]; ^c nach Koletzko *et al.* [75];

k.A. keine Angabe

3.3.1 Metronidazol

Metronidazol ist ein 5-Nitroimidazol, das als Prodrug in die Bakterienzelle aufgenommen wird. Es schädigt nach Umwandlung in reaktive Metaboliten die bakterielle DNA [33]. Als Hauptursache für eine Resistenz wird eine Mutation im *rdxA*-Gen angenommen, der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar [51]. Für die primäre Resistenz geht man bei Erwachsenen in Europa von einer Prävalenz von etwa 33% aus, bei Kindern liegt die Resistenzrate in Europa etwa bei 25% (siehe Tab. 2). In einem Übersichtsartikel von Mégraud *et al.* wurde der Therapieerfolg in Abhängigkeit von der Resistenzlage untersucht. Die Eradikation gelang bei 97% der Patienten mit Metronidazol-empfindlichen und bei 72% der Patienten mit Metronidazol-resistenten Stämmen (siehe Tab. 2). Daraus ergibt sich bei Vorliegen einer Resistenz eine Abnahme des Therapieerfolgs um etwa 25% [99]. Eine sekundäre, durch die Therapie erworbene, Metronidazol-Resistenz kommt in etwa 70% der Fälle vor [59].

3.3.2 Clarithromycin

Als Makrolid bindet Clarithromycin an die Peptidyltransferase der 50S Ribosomen-Untereinheit, die von der Domäne V der 23S rRNA gebildet wird [49]. Drei Punktmutationen der 23S rRNA (A2142G, A2142C und A2143G) führen zu einer Konformationsänderung und damit jeweils zu einer verminderten Bindungsfähigkeit des Antibiotikums (siehe Abb. 1) [109, 138, 150]. Es wurden weitere Punktmutationen der 23S rRNA (A2115G, T2717C und T2182C) gefunden, die mit einer Clarithromycin-Resistenz einhergehen, deren klinische Bedeutung jedoch unklar ist [17, 38, 69, 148]. Die Mutationen A2143G und A2142G kommen in klinischen Isolaten mit 70% und 12% am häufigsten vor [99].

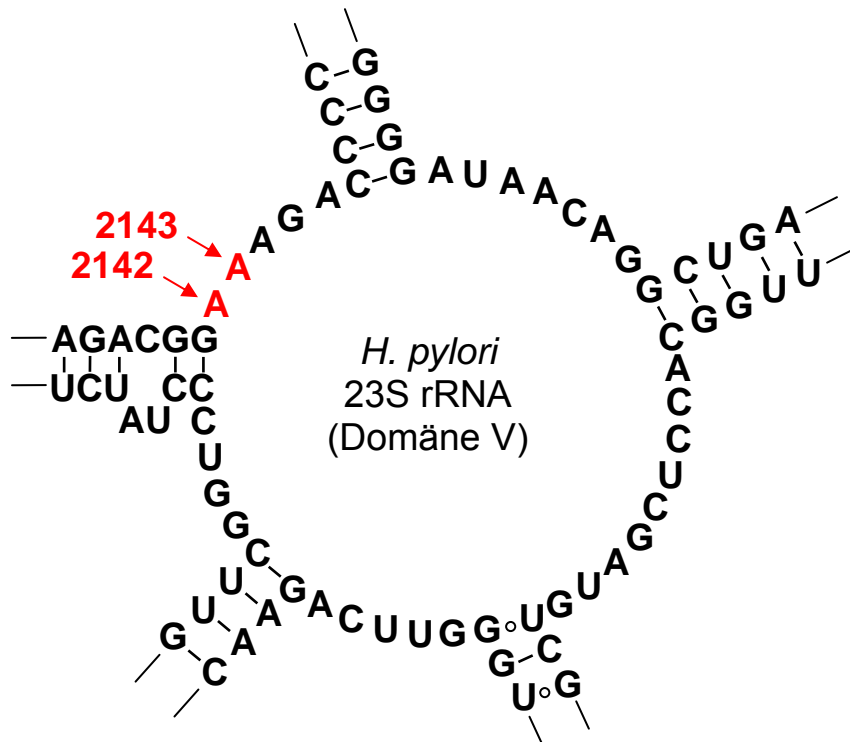


Abb. 1: Mutationen der Domäne V der 23S rRNA von *Helicobacter pylori* (verändert nach [143])

In Europa ist bei Erwachsenen die Prävalenz Clarithromycin-resistenter Stämme ungefähr 10%, bei Kindern liegt diese mit 20% deutlich darüber (siehe Tab. 2). Das Auftreten einer Resistenz korreliert mit der früheren Einnahme von Makrolid-Antibiotika, z.B. aufgrund von Infektionen der oberen Atemwege [115, 142]. Es können auch regionale Unterschiede festgestellt werden, wobei eine Zunahme der Resistenzrate von Nord- (~4%) über Zentral- (~9%) nach Süd-Europa (~18%) auffällt [48]. Mégraud *et al.* geben bei empfindlichen Stämmen eine Eradikationsrate von etwa 88% an, bei resistenten Stämmen sind es ca. 18% (siehe Tab. 2). Der Therapieerfolg verringert sich bei Vorliegen einer Clarithromycin-Resistenz also um 70% [99]. Nach Therapieversagen wird die Rate der sekundären Resistenzen mit etwa 55% angegeben [59].

3.3.3 Amoxicillin

Amoxicillin, ein β -Laktam-Antibiotikum, hemmt über Blockade der Penicillin-bindenden Proteine (PBP) die Peptidoglykan-Synthese in der Zellwand von Bakterien. Eine Resistenz entsteht vermutlich durch Mutation im Gen des PBP-1a [44]. Amoxicillin-Resistenzen sind selten und liegen für Infektionen bei

Erwachsenen sowie Kindern unter 1% (siehe Tab. 2). Da eine Resistenz nur in Einzelfällen auftritt, können bisher kaum Aussagen über den Vergleich der Eradikationsraten bei empfindlichen und resistenten Stämmen getroffen werden.

3.3.4 Weitere Antibiotika

Tetrazykline, Fluorchinolone und Rifampicin sind Antibiotika, die für Zweittherapien und bei besonderen Indikationen eingesetzt werden (siehe Kapitel I 6). Da diese Antibiotika nicht Teil der Standard-Therapien sind, soll auf Prävalenz und genaue Mechanismen der Resistenzentwicklung hier nicht näher eingegangen werden.

4 *Helicobacter pylori*-assoziierte Erkrankungen

Helicobacter pylori kann verschiedene Erkrankungen des Magens und Duodenums auslösen. Die Besiedelung des Magens, in der Regel der Antrumregion, ruft eine akute Gastritis hervor (siehe Abb. 2). In den meisten Fällen geht die Infektion in eine chronische Gastritis über, die bei 10-20% der Patienten ernsthafte Folgeerkrankungen hervorruft.

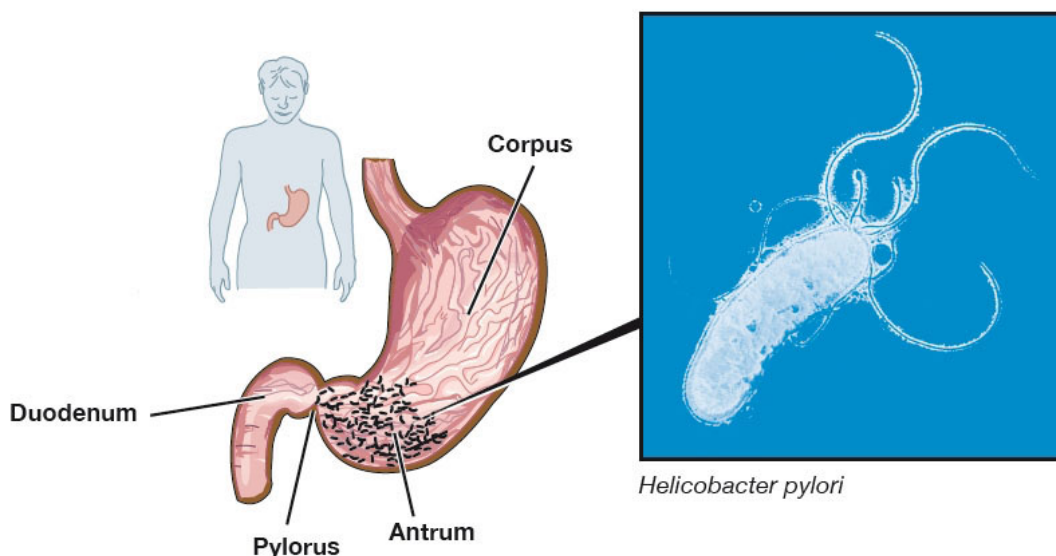


Abb. 2: Schematische Darstellung einer *Helicobacter pylori*-Infektion der Antrumregion des Magens

(nach: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/press.html)

4.1 Akute Gastritis

Helicobacter pylori erzeugt bei allen Patienten eine histologisch nachweisbare Entzündung des Magens [27]. Durch Kontakt des Keims mit den Epithelzellen wird eine Entzündungsreaktion des Immunsystems getriggert und neutrophile Granulozyten und Makrophagen invadieren die gastrale Schleimhaut [90]. Eine begleitende Hypergastrinämie vermindert die Säuresekretion des Magen und es resultiert eine akute Gastritis (siehe Abb. 3). Unspezifische Symptome wie Oberbauchschmerzen, Übelkeit und Erbrechen können auftreten, bleiben bei einigen Patienten aber aus [55, 134].

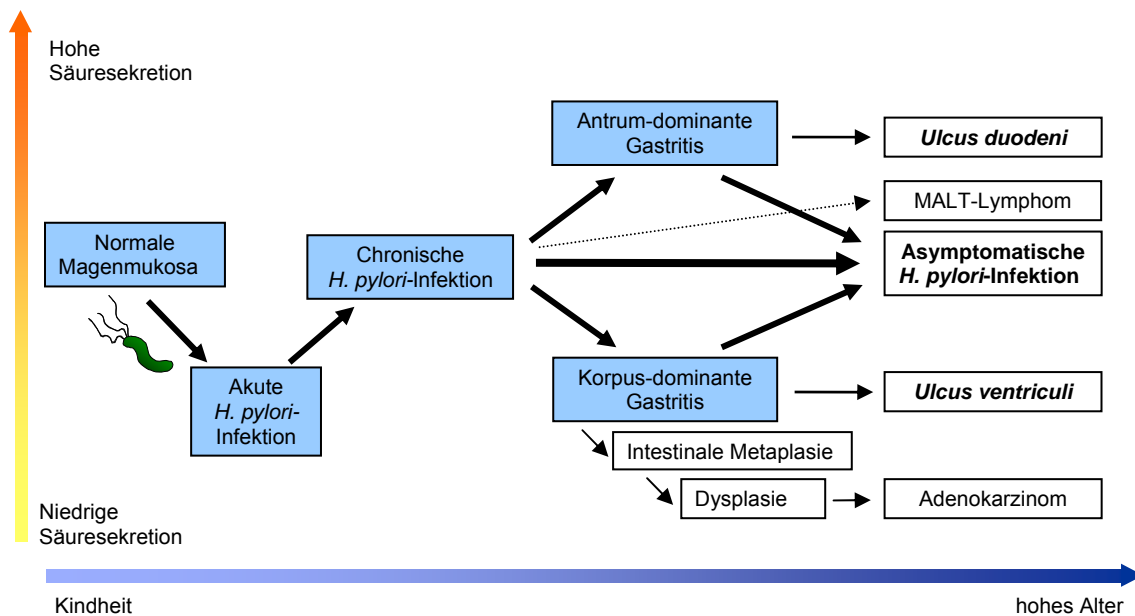


Abb. 3: Schematischer Ablauf einer Infektion mit *Helicobacter pylori*
(verändert nach [30])

4.2 Chronische Gastritis

Die akute Gastritis geht bei fast allen Patienten in eine chronische, bakterielle Gastritis (Typ B-Gastritis) über, die sich in den meisten Fällen klinisch nicht bemerkbar macht. Weitere Entzündungszellen, T- und B-Lymphozyten, invadieren die Schleimhaut und charakterisieren die chronisch-aktive Infektion [2].

In welchem Bereich des Magens sich die Gastritis am stärksten ausbildet, hängt wesentlich von der Stärke der Säuresekretion ab [139]. Häufig erhöht sich die Säuresekretion und es resultiert eine antrum-dominante Gastritis [12]. Diese Patienten sind durch überschießende Säuresekretion besonders für die Entwicklung einer duodenalen Ulkus-Erkrankung prädisponiert (siehe Abb. 3). Bei Patienten mit einer verminderten Säuresekretion breitet sich die Entzündung über den gesamten Magen aus und wird als Pangastritis oder korpus-dominante Gastritis bezeichnet [83]. Diese Patienten haben ein erhöhtes Risiko für Magenulzera, Schleimhautatrophien, Schleimhautmetaplasien und Magenkarzinome (siehe Abb. 3) [128, 139].

4.3 Magen- und Duodenalulkus

Schleimhautläsionen, die bis in die Lamina muscularis mucosae hereinreichen, werden als Ulzera bezeichnet. 10-15% der *Helicobacter pylori*-Infizierten entwickeln im Laufe ihres Lebens eine gastroduodenale (peptische) Ulkuserkrankung [133]. 85% der *Ulcera ventriculi* (Magenulzera) und 95% der *Ulcera duodeni* (Duodenalulzera) sind mit *Helicobacter pylori* assoziiert [82]. Patienten mit antrum-dominanter Gastritis haben ein erhöhtes Risiko für Duodenalulzera, Patienten mit korpus-dominanter Gastritis entwickeln eher ein Magenulkus (siehe Abb. 3). Komplikationen der Ulkuserkrankung sind Schleimhautblutungen und selten Perforationen [84].

4.4 Magenkarzinom und MALT-Lymphom

Seit ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen Magenkrebs und *Helicobacter pylori* nachgewiesen wurde, wird der Keim von der WHO als Karzinogen eingestuft [64].

Eine chronische Infektion des Magens, besonders bei Patienten mit verminderter Säuresekretion, kann nach Jahren zu einer atrophischen Umwandlung und Metaplasie des Schleimhautepithels führen [79]. Diese Umwandlung prädisponiert zu der Entwicklung eines Magenkarzinoms, das Lebenszeitrisiko beträgt für *Helicobacter pylori*-positive Patienten etwa 1%. Insgesamt 60-80% aller Magenkarzinome werden mit *Helicobacter pylori* assoziiert [79].

MALT-Lymphome (*mucosa-associated lymphoid tissue*-Lymphome) treten fast ausschließlich in Zusammenhang mit *Helicobacter pylori*-Infektionen auf [34,

112]. In weniger als 1% der *Helicobacter pylori*-infizierten Patienten entwickelt sich eine solche Krebsform. Bei 70-80% der Patienten bildet sich ein MALT-Lymphom durch eine Eradikationstherapie von *Helicobacter pylori* zurück [13].

5 Diagnostik

Die Diagnostik von *Helicobacter pylori* kann in invasive (mittels Ösophago-gastroduodenoskopie) und nicht-invasive Verfahren unterteilt werden. Eine Übersicht der diagnostischen Maßnahmen ist in Abb. 4 dargestellt.

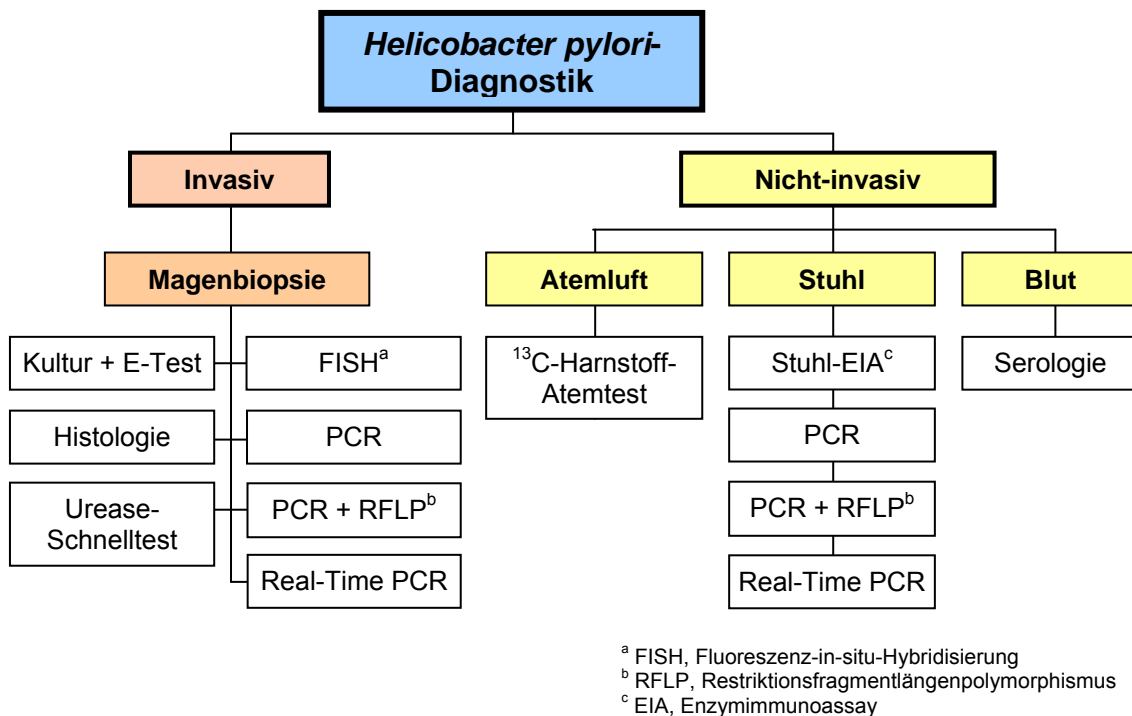


Abb. 4: Diagnostik zum Nachweis von *Helicobacter pylori*

Eine weitere Unterteilung der Diagnostik unterscheidet direkte (Nachweis des Erregers durch Kultur oder Mikroskopie) und indirekte Nachweismethoden (Nachweis von Bestandteilen des Bakteriums z.B. DNA oder Enzyme, Stoffwechselprodukten z.B. Harnstoff oder Reaktionen des Immunsystems z.B. Antikörper).

5.1 Invasive Diagnostik

Voraussetzung für die invasive Diagnostik ist eine Untersuchung des Magens mittels Ösophagogastroduodenoskopie. Es werden nach Exploration des Magens und Duodenums mit einem Endoskop mehrere Schleimhautproben entnommen und diese weiter untersucht. Vorteil dieser invasiven Methode ist – neben einem direkten Keimnachweis – die Möglichkeit die Magenschleimhaut zu beurteilen und Ulzera, MALT-Lymphome oder Karzinome festzustellen.

5.1.1 Histologie

Nach Färbung der Schleimhautproben werden diese von einem Pathologen mikroskopisch auf das Vorhandensein von *Helicobacter pylori* untersucht [76]. Nach der „Sydney-Klassifikation“ werden zusätzlich verschiedene Parameter in der histologischen Beurteilung einer möglichen Gastritis berücksichtigt (Morphologie, Ätiologie und Topographie) [19, 26]. Bei Kindern zählt die histologische Untersuchung neben dem kulturellen Nachweis zur Goldstandard-Diagnostik [95]. Sensitivität und Spezifität werden für den histologischen Nachweis von *Helicobacter pylori* mit ungefähr 95% angegeben [100]. Diese Werte sind allerdings abhängig von der Erfahrung des untersuchenden Pathologen [89].

5.1.2 Kultur und E-Test

Die Schleimhautproben werden im mikrobiologischen Labor auf spezielle Kulturmedien aufgestrichen und unter mikroaerophilen Bedingungen (O_2 -Konzentration ~5%; CO_2 -Konzentration ~10%) inkubiert. Nach mehreren Tagen kann ein kulturelles Wachstum von *Helicobacter pylori* durch seine spezielle Kulturmorphologie und weitere Tests (Urease-, Katalase- und Oxidase-Test) bestätigt werden. Bei positivem Keimnachweis kann mittels Epsilon-Test (E-Test) die Sensitivität verschiedener Antibiotika bestimmt werden [47]. Mittels eines Antibiotika-Teststreifens, auf dem ein steigender Antibiotikagradient verzeichnet ist, kann nach Inkubation des Keims auf einer Agarplatte die minimale Hemmkonzentration (MHK) abgelesen werden. Die MHK bezeichnet die minimale Konzentration eines Antibiotikums, die den Keim *in vitro* im Wachstum hemmt. Kultur und E-Test sind mit einer diagnostischen Sensitivität von über 90% und Spezifität von 100% als diagnostische Goldstandard-Methoden anzusehen [100].

5.1.3 Urease-Schnelltest

Noch während der Gastroskopie können frische Schleimhautbiopsien mittels Urease-Schnelltest auf *Helicobacter pylori* untersucht werden. Der im Test enthaltene Harnstoff kann durch die Urease von *Helicobacter pylori* in basische Ammoniumionen umgewandelt werden. Bei Vorhandensein des Keims bewirkt die pH-Änderung einen Farbumschlag eines Indikators. Sensitivität und Spezifität liegen über 90% [100].

5.1.4 Molekularbiologische Verfahren

Eine molekularbiologische Methode *Helicobacter pylori* aus Schleimhautbiopsien nachzuweisen, ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) [125, 147]. Kurze fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden ermöglichen über Hybridisierung mit der 23S rRNA von *Helicobacter pylori* einen fluoreszenz-mikroskopischen Keimnachweis mit gleichzeitiger Clarithromycin-Empfindlichkeitstestung.

Es existieren verschiedene konventionelle PCRs, RFLP-PCRs und Real-Time PCRs für den Nachweis von *Helicobacter pylori* aus Magenbiopsien [111, 114]. Je nach PCR-Design können neben einem Keimnachweis auch Aussagen über Antibiotika-Resistenzen oder z.B. den CagA- oder VacA-Status getroffen werden [20].

Durch PCR mit anschließender Restriktionsfragmentlängen-Analyse können Aussagen über eine mögliche Clarithromycin-Resistenz des Keims getroffen werden [150]. Bei dieser Methode wird das PCR-Produkt mit Restriktionsenzymen geschnitten. Es werden verschiedene Restriktionsenzyme verwendet, die das PCR-Produkt nur schneiden, wenn eine für die Clarithromycin-Resistenz verantwortlichen Punktmutationen (A2142C, A2142G oder A2143G) vorliegt [102].

Neben den RFLP-PCRs eignen sich gerade Real-Time PCRs mit Schmelzkurvenanalysen für eine schnelle Diagnostik einer Clarithromycin-Resistenz (siehe Abb. 5) [22, 45].

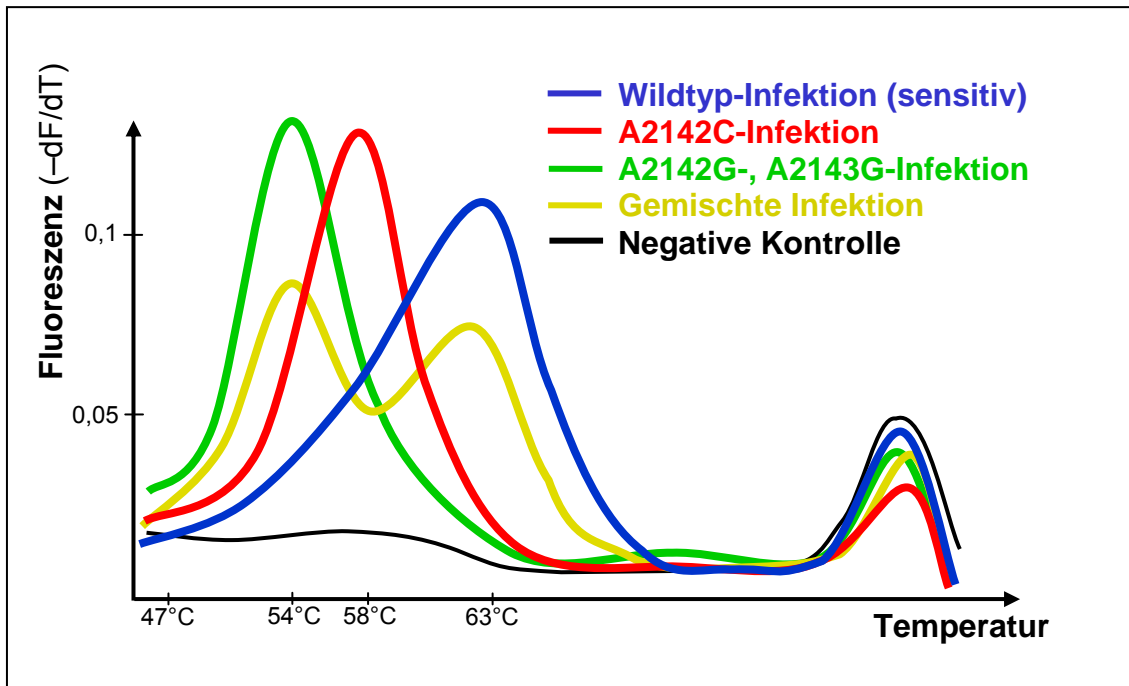


Abb. 5: Real-Time PCR – Schmelzkurvenanalyse

Die Real-Time PCR hat als Zielsequenz eine Region der 23S rRNA von *Helicobacter pylori*, auf der die Clarithromycin-Resistenz-assoziierten Punktmutationen liegen (siehe Kapitel IX 2). Im PCR-Ansatz sind neben den üblichen Reagenzien kurze fluoreszenz-markierte Oligonukleotid-Primer (Sonden) enthalten, die an das PCR Produkt binden können. Die Sonden werden nach Amplifikation über Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) angeregt. Die Fluoreszenz-abgabe der Sonden wird nun in Abhängigkeit der Temperatur gemessen. Bei einer Punktmutation und damit einer nicht komplett komplementären Sequenz diffundieren die Sonden aufgrund geringerer Bindungskräfte früher ab. Es entstehen so spezifische Abdiffusionstemperaturen und unterschiedliche Schmelzkurven für empfindliche und resistente *Helicobacter pylori*-Stämme (verändert nach [45, 126]).

5.2 Nicht-invasive Diagnostik

Nicht-invasive Methoden sind für den Patienten weit weniger belastend, da hier keine Gastroskopie zur Gewinnung von Magenbiopsien durchgeführt werden muss. Stattdessen werden Atemluft, Stuhl oder Blut als Ausgangsmaterial für die Diagnostik verwendet.

5.2.1 ¹³C-Harnstoff-Atemtest

Der nicht-invasive ¹³C-Harnstoff-Atemtest nutzt die starke Urease-Aktivität von *Helicobacter pylori*, um eine Besiedelung bzw. Infektion beim Patienten nachzuweisen [54]. Eine mit dem schweren Isotop des Kohlenstoffs (¹³C) markierte Harnstofflösung wird vom Patienten getrunken. Bei Infektion mit *Helicobacter pylori* wird der ¹³C-Harnstoff im Magen von der Urease des Bakteriums in Kohlenstoffdioxid (¹³CO₂) und Ammoniak umgewandelt. Das schwere ¹³CO₂ kann in

der Atemluft durch ein Isotopen-Massenspektrometer nachgewiesen werden. Meist wird der ^{13}C -Harnstoff-Atemtest zur Therapiekontrolle verwendet. Sensitivität und Spezifität des Atemtests liegen bei etwa 95% [100]. Bei Kleinkindern und Säuglingen ist die Spezifität des Tests jedoch herabgesetzt [70, 73].

5.2.2 Serologie

Nach Immunantwort des Patienten auf *Helicobacter pylori* können im Blut meist spezifische Antikörper mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) nachgewiesen werden. Bei Erwachsenen erzielt die Serologie eine Sensitivität und eine Spezifität von etwa 90% [86]. Nachteil der Methode ist, dass eine vor kurzem abgelaufene Infektion nicht von einer aktiven Infektion unterschieden werden kann und damit die Erfolgskontrolle einer Eradikationstherapie nicht möglich ist. Für den diagnostischen Nachweis bei Kindern ist die Serologie außerdem wenig geeignet, da unter 12 Jahren die Sensitivität gering ist [25, 95].

Antikörper gegen *Helicobacter pylori* können außer in Serum auch in Urin und Speichel nachgewiesen werden. Diese Tests gehören jedoch nicht zu den Standard-Methoden der Diagnostik.

5.2.3 Enzymimmunoassays (Stuhl)

Es gibt viele verschiedene Enzymimmunoassays (EIA) für den Nachweis von *Helicobacter pylori* aus Stuhlmaterialien [91, 152]. Die neueren EIA sind meist monoklonale Antikörpertests, die mit mehr als 95% eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität wie der ^{13}C -Harnstoff-Atemtest erreichen können [74]. Lediglich nach Eradikationstherapie könnte die Spezifität des Tests herabgesetzt sein, da auch bei erfolgreicher Therapie noch Bakterienbestandteile im Stuhl nachweisbar sein können [116].

Neuere EIA können bereits durch den behandelnden Arzt am Patientenbett durchgeführt werden. Für diese „Bedside-EIA“ wurde im Vergleich zu den konventionellen EIA jedoch eine geringere Sensitivität und Spezifität ermittelt [46].

5.2.4 Molekularbiologische Verfahren (Stuhl)

Wie schon bei der invasiven Diagnostik werden PCRs auch in der nicht invasiven *Helicobacter pylori*-Diagnostik angewandt. Das Ausgangsmaterial ist meist Stuhlmaterial des Patienten. Über verschiedene Aufreinigungsmethoden wird

DNA aus den Faeces extrahiert. Anschließend können verschiedene PCR-Methoden wie konventionelle PCRs oder PCRs mit Restriktionsfragmentlängen-Analyse angewandt werden, um eine *Helicobacter pylori*-Infektion festzustellen [39, 107, 131].

Für den Nachweis von *Helicobacter pylori* mit gleichzeitiger Clarithromycin-Empfindlichkeitstestung wurden bereits verschiedene PCRs mit konsekutiver Restriktionsfragmentlängen-Analyse aus Stuhlmaterialien angewandt [16, 39, 118]. Sensitivität und Spezifität liegen über 90%, diese Werte bedürfen aber wohl einer Bestätigung durch weitere Studien.

Eine attraktive Methode für die nicht-invasive Diagnostik mit Clarithromycin-Empfindlichkeitstestung wurde von Schabereiter-Gurtner *et al.* veröffentlicht [126]. Eine Real-Time PCR wurde an Stuhlmaterialien Erwachsener getestet und mit herkömmlichen diagnostischen Methoden verglichen. Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von *Helicobacter pylori* wurden mit jeweils 98% angegeben.

6 Therapie

Gesicherte Indikationen für die Therapie einer *Helicobacter pylori*-Infektion sind nach den Leitlinien der Maastricht-Konferenzen die peptische Ulkuserkrankung, das MALT-Lymphom und die atrophische Gastritis [94, 95]. Weitere Indikationen sind Verwandtschaft ersten Grades zu einem Magenkrebspatienten, Zustand nach Magenkrebs-Resektion, unklare Eisenmangel-Anämie und chronische thrombozytopenische Purpura.

Sowohl beim Erwachsenen als auch bei Kindern besteht die Standard-Therapie der *Helicobacter pylori*-Infektion aus zwei Antibiotika und einem Protonenpumpen-Inhibitor (PPI) [95]. Bei der klassischen „italienischen“ Tripeltherapie werden jeweils zweimal täglich ein PPI (Normaldosis; z.B. Omeprazol 20 mg), 250 mg Clarithromycin und 500 mg Metronidazol für eine Woche eingenommen. Die alternative „französische“ Tripeltherapie besteht aus zweimal täglicher Einnahme eines PPI (Normaldosis), 1000 mg Amoxicillin und 500 mg Clarithromycin für eine Woche. Neuere Studien belegen, dass eine Behandlung über 14 Tage anstatt 7 Tagen höhere Eradikationsraten erzielt [94]. Bei der

Verwendung der Antibiotika sollte auf deren regional unterschiedlichen Resistenzraten geachtet werden. Für Deutschland wird seit 2001 durch die ResiNet-Studie des Nationalen Referenzzentrums (NRZ) die Resistenzlage der am häufigsten für die *Helicobacter pylori*-Infektion verwendeten Antibiotika ermittelt [71].

Der Eradikationsrate der Standardtherapien wird mit etwa 90% angegeben [99]. Eine Therapiekontrolle sollte frühestens 4 Wochen nach Therapie durch eine nicht-invasive Diagnostik (¹³C-Harnstoff-Atemtest oder Stuhl-EIA) festgestellt werden [95]. Die Erfolgsquote hängt stark von der Compliance des Patienten und dem Vorliegen eventueller Antibiotika-Resistenzen ab.

Bei Persistenz der Infektion wird eine Quadrupel-Therapie (PPI, Tetrazykline, Metronidazol und die zusätzliche Gabe von Wismutsalzen) empfohlen. Da ein Therapieversagen auch mit einer hohen Resistenzrate einhergeht, wird außerdem angeraten, eine Antibiotika-Sensitivitätstestung vor der Zweit-Therapie durchzuführen [94]. Bei Vorliegen einer kombinierten Antibiotika-Resistenz oder erneutem Therapie-Versagen werden alternative Antibiotika (Tetrazykline, Fluorchinolone oder Rifampicin) eingesetzt.

II Zielsetzung

Mit der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene diagnostische Tests zum Nachweis von *Helicobacter pylori* bei therapie-naiven Kindern verglichen werden. Den diagnostischen Standard-Methoden Histologie, Kultur, E-Test und ¹³C-Harnstoff-Atemtest wurden Methoden zur nicht-invasiven Stuhltestung – ein Enzymimmunoassay (*Amplified IDEIA Hp StAR*; DakoCytomation) und eine Real-Time PCR (*Helicobacter pylori ClariRes assay*, Ingenetix) – gegenübergestellt. Es sollte eruiert werden, ob der Enzymimmunoassay und die Real-Time PCR für eine Diagnostik im klinischen Bereich geeignet sind und Standard-Methoden der *Helicobacter pylori*-Diagnostik bei Kindern ersetzen können.

Vor dem Hintergrund, dass die Clarithromycin-Resistenz von *Helicobacter pylori* eine wichtige Rolle für den Therapieerfolg darstellt, lag ein Schwerpunkt dieser Arbeit in der Sensitivitätstestung dieses Antibiotikums. Es stellte sich die Frage, ob eine nicht-invasive Sensitivitätstestung mittels Real-Time PCR die etablierte Diagnostik ersetzen kann. Bisher wurden bei Kindern lediglich Verfahren zur invasiven Sensitivitätstestung angewandt, welche durch die Gastroskopie einen unangenehmen Eingriff mit möglichen Nebenwirkungen und Komplikationen mit sich brachte. In dieser Arbeit wurde erstmals eine Real-Time PCR-Methode für Stuhlmaterial von Kindern untersucht, die bereits bei Erwachsenen mit viel versprechenden Ergebnissen getestet wurde [126].

III Material und Methoden

1 Patienten

Die Patienten wurden in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Sibylle Koletzko vom Dr. von Haunerschen-Kinderspital (Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland) ausgewählt. Es wurden Kinder und Jugendliche von 0 bis 18 Jahren in die Studie eingeschlossen, bei denen aufgrund von gastrointestinaler Symptomatik (Bauchschmerzen, peptische Symptome) eine Ösophagogastroduodenoskopie durchgeführt wurde.

Um eine einheitliche Diagnostik zu garantieren, wurden Patienten von der Studie ausgeschlossen, die in der Vergangenheit gegen *Helicobacter pylori* behandelt wurden oder in den vier Wochen vor der endoskopischen Untersuchung Antibiotika, Protonenpumpen-Inhibitoren, H₂-Rezeptorantagonisten, Antazida oder Wismut-Präparate zu sich genommen hatten.

2 Gastrointestinale Endoskopie und Histologie

Bei allen Patienten wurde eine obere gastrointestinale Endoskopie durchgeführt. Während dieses Eingriffes wurden die Schleimhautbeschaffenheiten des Magens untersucht und jeweils mindestens vier Biopsieproben der Magenschleimhaut entnommen. Zwei Biopsiepräparate des Antrums und zwei des Korpus wurden an das Pathologische Institut der LMU München geschickt. Dort wurden die Proben in 10%igem Formalin fixiert und mit einer modifizierten Giemsa- oder Hämatoxilin-Eosin-Lösung gefärbt. Ein Pathologe des Pathologischen Instituts der LMU München untersuchte diese Proben mikroskopisch auf das Vorhandensein von *Helicobacter pylori*.

3 Kultur und E-Test

3.1 Kultur

Innerhalb von vier Stunden nach Gastroskopie wurde eine Antrum-Biopsie in einem Transportmedium (*Portagerm pylori*; bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) in das Max von Pettenkofer-Institut zur Weiterverarbeitung gebracht.

In einer Petrischale wurden die Biopsien mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und homogenisiert. Die Biopsien wurden auf die Oberfläche von Columbia Agarplatten mit 5% Schaf-Erythrozyten (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) oder Schaedler Agarplatten mit 5% Schaf-Erythrozyten und Vitamin K1 (Becton Dickinson) ausgestrichen. Ein Kontrollstamm von *Helicobacter pylori* (Stammnummer 26695; freundlicherweise bereitgestellt durch die Arbeitsgruppe Haas, Max von Pettenkofer-Institut, LMU München) wurde ebenfalls auf eine separate Platte ausgestrichen und als Wachstums-Kontrolle hinzugefügt. In einem Anaerobierbehälter wurden durch Zugabe eines *GENbox Microaer* Papiers (bioMérieux) mikroaerophile Bedingungen geschaffen (Sauerstoff-Konzentration 7-10%; CO₂-Konzentration 20%). Die beimpften Platten wurden in diesem Behälter für 5-10 Tage bei 37 °C inkubiert. Ein positives kulturelles Wachstum von *Helicobacter pylori* wurde durch die charakteristische Morphologie der Kolonien (gräulich-glasige, kleine Kolonien), das typische Aussehen nach Gramfärbung (gramnegative, gekrümmte Stäbchen) und positiven Urease-, Katalase- und Oxidase-Tests bestätigt.

3.2 E-Test

Bei positivem Wachstum von *Helicobacter pylori* wurde eine Sensitivitätstestung auf Clarithromycin mittels Epsilon-Test (E-Test) durchgeführt. Es wurden mit einer sterilen Öse Einzelkolonien von den Schaedler- oder Columbia-Agarplatten abgeimpft und in 4-5 ml 0,9% NaCl-Lösung suspendiert. Die Trübung der Lösung entsprach einem McFarland Standard 3. Mit einem sterilen Glasspatel wurden Müller-Hinton Agarplatten (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf der gesamten Fläche mit dieser Suspension benetzt. Nach kurzem Antrocknen von 5-10 min wurden mit einer sterilen Pinzette die E-Teststreifen (AB Biodisk, Solna, Schweden) auf die Agarplatten aufgebracht. Nach zwei Tagen Inkubation unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37 °C konnten die MHK auf den Teststreifen abgelesen werden. *Helicobacter pylori*-Isolate wurde ab einer MHK > 1 µg/ml als resistent angesehen [124]. Alle Clarithromycin-Sensitivitätstestungen wurden zur Bestätigung zweifach wiederholt.

4 ¹³C-Harnstoff-Atemtest

Die ¹³C-Harnstoff-Atemtests wurden am Dr. von Haunerschen Kinderspital (LMU München) durchgeführt.

Nach mindestens vierstündiger Nüchternheit gaben die Kinder eine Vergleichs-Atemprobe „P0“ ab. Zum Sammeln der Atemluft wurden die Kinder gebeten, in einen Atembeutel (Medicheck, Essen, Deutschland) oder einen Strohhalm eines 10 ml Vacutainer Röhrchen (Labco, Buckinghamshire, Großbritannien) tief auszuatmen. Bei sehr kleinen Kindern wurde zum Sammeln der Atemprobe eine Maske verwendet. Nach Abgabe der Nüchtern-Atemprobe tranken die Kinder zuerst 150 ml reinen Apfelsaft (pH 3,4) und dann 20 ml Saft mit 75 mg darin gelösten ¹³C-gelabeltem Harnstoff (Eurisotop, Paris, Frankreich). Anschließend bekamen die Kinder 30 ml Apfelsaft, um Rückstände des Harnstoffs aus dem Mundraum zu spülen. Säuglinge und Kleinkinder, die jünger als drei Jahre waren, bekamen nur eine Gesamtmenge von 80-100 ml Apfelsaft. Nach einer Wartezeit von 30 Minuten wurde bei allen Kindern eine weitere Atemprobe „P30“ abgenommen.

Die Ausatemluft wurde ggf. von Atembeutel oder Maske in die Vacutainer umgefüllt und mittels Isotopen-Massenspektrometrie (MAT delta S; Finnigan, Bremen, Deutschland) analysiert. Die Ergebnisse wurden positiv für *Helicobacter pylori* gewertet, wenn der Unterschied von „P0“ zu „P30“, dem sog. Delta-Wert, $\geq 0,5\text{‰}$ betrug [70].

5 Definition des *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus

Für die Definition einer *Helicobacter pylori*-Infektion wurden die Ergebnisse von Histologie, Kultur und des ¹³C-Harnstoff-Atemtests herangezogen.

Ein Kind wurde als positiv für eine *Helicobacter pylori*-Infektion gewertet, wenn mindestens zwei der drei Tests ein positives Ergebnis lieferten. Als negativ für eine *Helicobacter pylori*-Infektion wurden die Kinder gewertet, bei denen alle drei Tests negativ waren.

6 EIA für Stuhlmaterialien

Die Eltern der Kinder wurden gebeten, zum Zeitpunkt der Gastroskopie eine Stuhlprobe ihres Kindes mitzubringen. Hierfür wurde ihnen bereits zum Aufklärungsgespräch vor Gastroskopie ein Stuhlprobengefäß mitgegeben. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden alle Stuhlproben bei -20 °C gelagert.

6.1 Methodik des Stuhl-EIA

Das Stuhlmaterial wurde mit einem monoklonalem Sandwich-EIA, dem *Amplified IDEIA Hp StAR* (DakoCytomation, Cambridge, UK), nach Protokoll des Herstellers auf das Vorhandensein des Katalase-Antigens von *Helicobacter pylori* untersucht.

In ein Probenröhrchen wurden 500 µl Probenverdünnungsmittel (Puffer) pipettiert und mit einem Holzstäbchen eine erbsengroße Stuhlmenge (ca. 0,1 g) hinzugegeben. Das Gemisch wurde auf einem Vortexmischer 15 Sekunden lang homogenisiert und anschließend bei 14000 rpm zentrifugiert. In die einzelnen Vertiefungen (Kavitäten) einer Mikrotiterplatte (beschichtet mit monoklonalen Antikörpern gegen die Katalase von *Helicobacter pylori*) wurden jeweils 50 µl des Stuhlüberstandes und 50 µl Konjugat (Meerrettichperoxidase-markierte monoklonale Antikörper) pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde auf einem Schüttler für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so dass vorhandene *Helicobacter pylori*-Antigene an die Antikörper auf der Mikrotiterplatte und an die Konjugat-Antikörper binden konnten. Anschließend wurden die Kavitäten mit 250-300 µl Waschpuffer 5-mal gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurden durch gründliches Ausklopfen der Kavitäten letzte Flüssigkeitsreste entfernt. Es wurde 100 µl Substrat (Tetramethylbenzidin; bei Umwandlung durch Meerrettichperoxidase Farbumschlag nach blau) in die Kavitäten pipettiert. Nach zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde 100 µl Stopplösung (Umschlagen der Farbreaktion nach gelb) hinzupipettiert.

Die Proben wurden photometrisch ausgewertet. Mit einem EIA-Plattenlesegerät wurde eine doppelte Wellenlängenbestimmung (450 µm und 620 µm) durchgeführt. Die Testergebnisse wurden nach Herstellerangaben wie folgt interpretiert: Proben mit Extinktionswerten $\geq 0,150$ wurden als positiv, Proben mit Extinktionswerten $< 0,150$ als negativ gewertet.

Bei jedem Probendurchlauf wurden eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. Bei der photometrischen Ausmessung mussten diese für die Positivkontrolle Extinktionswerte von $> 1,0$, für die Negativkontrolle Extinktionswerte $< 0,1$ aufweisen.

7 Stuhlaufreinigung für die molekulare Diagnostik

7.1 DNA-Extraktion aus Stuhlproben

Für die PCR-Diagnostik musste zuerst bakterielle DNA aus den Stuhlproben extrahiert werden. Hierfür wurde ein DNA-Stuhlaufreinigungs-kit, *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland), verwendet. Die durchgeführten Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers.

Jeweils etwa 200 mg (± 20 mg) Stuhl wurde mittels einer Feinwaage abgewogen und mit einem sterilen Holzstäbchen in ein 2 ml Eppendorfgefäß platziert. 1,4 ml ASL Puffer wurde zu der Probe hinzugefügt und diese eine Minute auf einem Vortexmischer homogenisiert. In einem Wasserbad wurde die Probe für fünf Minuten bei 70 °C erhitzt, um Bakterien abzutöten und zu lysieren. Die Lösung wurde anschließend für 15 Sekunden auf dem Vortexmischer homogenisiert und bei 14000 rpm für eine Minute zentrifugiert. 1,2 ml des Überstandes wurden in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß gefüllt und eine InhibitEX Tablette hinzugefügt. Diese spezielle Tablette soll PCR-Inhibitoren und DNA-zerstörende Substanzen binden. Nach Auflösen der Tablette und einer Minute Wartezeit wurde die Probe erneut zentrifugiert (drei Minuten) und der komplette Überstand umpipettiert (1,5 ml Eppendorfgefäß). Erneut wurde zentrifugiert (drei Minuten) und anschließend 200 μ l des Überstandes in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Es wurden 15 μ l Proteinase K und 200 μ l AL Puffer zu der Probe hinzugegeben und bei 70 °C für zehn Minuten inkubiert. 200 μ l Ethanol (100%) wurden hinzugegeben und die Probe mithilfe des Vortexers kurz gemischt. Nun wurde die komplette Lösung in eine *QIAamp spin column* (Filter-Säule zur Extraktion der DNA) pipettiert und für eine Minute zentrifugiert. Die *spin column* wurde auf ein neues Auffanggefäß gesetzt, 500 μ l Puffer AW1 wurden hinzugefügt und für eine Minute zentrifugiert. Die *spin column* wurde wiederum auf ein neues Auffanggefäß gesetzt, 500 μ l Puffer AW2 wurden hin-

zugefügt und für drei Minuten zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die *spin column* auf ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt, 200 µl AE Puffer wurden hinzugefügt und nach einer Wartezeit von einer Minute für eine Minute zentrifugiert. Die so gewonnenen DNA-Proben wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

7.2 Photometrische Kontrolle der DNA-Extraktion

Nach Stuhlaufreinigung wurde bei zehn Stichproben der DNA-Gehalt photometrisch quantifiziert. Die Proben wurden 1:10 bis 1:100 verdünnt und das reine Lösungsmittel als Referenzprobe getestet. Ein Photometer (Ultrospec 300, Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm die Extinktion (Optische Dichte; OD) der Proben. Die Konzentration der DNA in der Probe wurde vom Photometer automatisch berechnet und liegt für eine $OD_{260\text{ nm}}$ von 1 bei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Aus dem Quotient der $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ konnte der DNA-Reinheitsgrad der Proben ermittelt werden, der optimalerweise bei $\geq 1,8$ liegen sollte.

8 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR mit Nachweis von *Helicobacter pylori* und gleichzeitiger Clarithromycin-Empfindlichkeitstestung wurde mit dem *Helicobacter pylori ClariRes assay* (Ingenetix, Wien, Österreich) durchgeführt.

8.1 Methodik der Real-Time PCR

Die PCR wurde nach Anweisungen des Herstellers ausgeführt. Es wurde folgender 20 µl Ansatz hergestellt: 2 µl *LightCycler FastStart DNA Master SYBR green I* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland), 2,4 µl 4mM $MgCl_2$, 12,1 µl deionisiertes Wasser, 0,5 µl *Helicobacter pylori ClariRes assay* Lösung (Ingenetix) und 1 µl einer verdünnten internen Kontroll-Lösung (Ingenetix). Die 18 µl dieser Lösung und 2 µl der DNA-Aufreinigung (siehe Kapitel III 7) wurden jeweils in eine 20 µl LightCycler Kapillare (Roche Molecular Biochemicals) pipettiert. Neben den normalen Testproben wurde immer zusätzlich eine Negativkontrolle hergestellt, welcher 2 µl deionisiertes Wasser anstatt der DNA-Aufreinigung zugegeben wurde. Eigenschaften und Sequenzen der

Oligonukleotid-Primern und -Sonden, die in der *Helicobacter pylori* ClariRes assay Lösung enthalten waren, sind in Tab. 3 beschrieben.

Tab. 3: Oligonukleotid-Primer der Real-Time PCR

Name	Sequenz (5' - 3') ^a	Position ^b
23S-F	AGATGGGAGCTGTCTCAACCAG	2069-2090
23S-R	TCCTGCGCATGATATTCCC	2187-2205
23S-S (Sonde)	Cy5 ^c -AAGACGGAAAGACCCCGT-Biotin	2139-2156

^a Oligonukleotid-Primer-Sequenzen nach Schabereiter-Gurtner *et al.* [126]

^b Position auf dem 23S rRNA Gen des *Helicobacter pylori* Stamms 26695 (siehe Kapitel IX 2)

^c Cyanin-5, Fluoreszenz-Farbstoff

Die weiteren Schritte wurden an einem LightCycler 2.0 (Roche; siehe Abb. 6) durchgeführt. Die Kapillaren wurden mit einem Deckel verschlossen und in ein LightCycler Karussell (LC Carousel; Roche) platziert. Dieses wurde in einer speziellen Zentrifuge (LC Carousel Centrifuge, Roche) kurz zentrifugiert und anschließend in den LightCycler gestellt (siehe Abb. 6).

PCR-Bedingungen waren wie folgt: Denaturierung bei 95 °C für 10 Minuten; 70 Zyklen Amplifikation bei 95 °C für 5 Sekunden, 65 °C für 10 Sekunden und 72 °C für 6 Sekunden. Nach Kühlen der Lösung auf 35 °C, Start der Schmelzkurvenanalyse durch Erhitzen der Lösung auf 95 °C mit einem Temperaturanstieg von 0,1 °C pro Sekunde (insgesamt etwa 10 Minuten). Zuletzt wurde die Lösung auf 40 °C abgekühlt.

Während des Erhitzens wurden durch den LightCycler die Temperatur bei Fluoreszenz-Änderung und damit die Abdiffusionstemperatur der Sonden vom PCR-Produkt ermittelt. Diese spezifische Abdiffusionstemperatur wurde von der Roche LightCycler Software (Version 3.5.3) für jede Probe in eine Schmelzkurve umgerechnet (siehe Abb. 5, Seite 15).

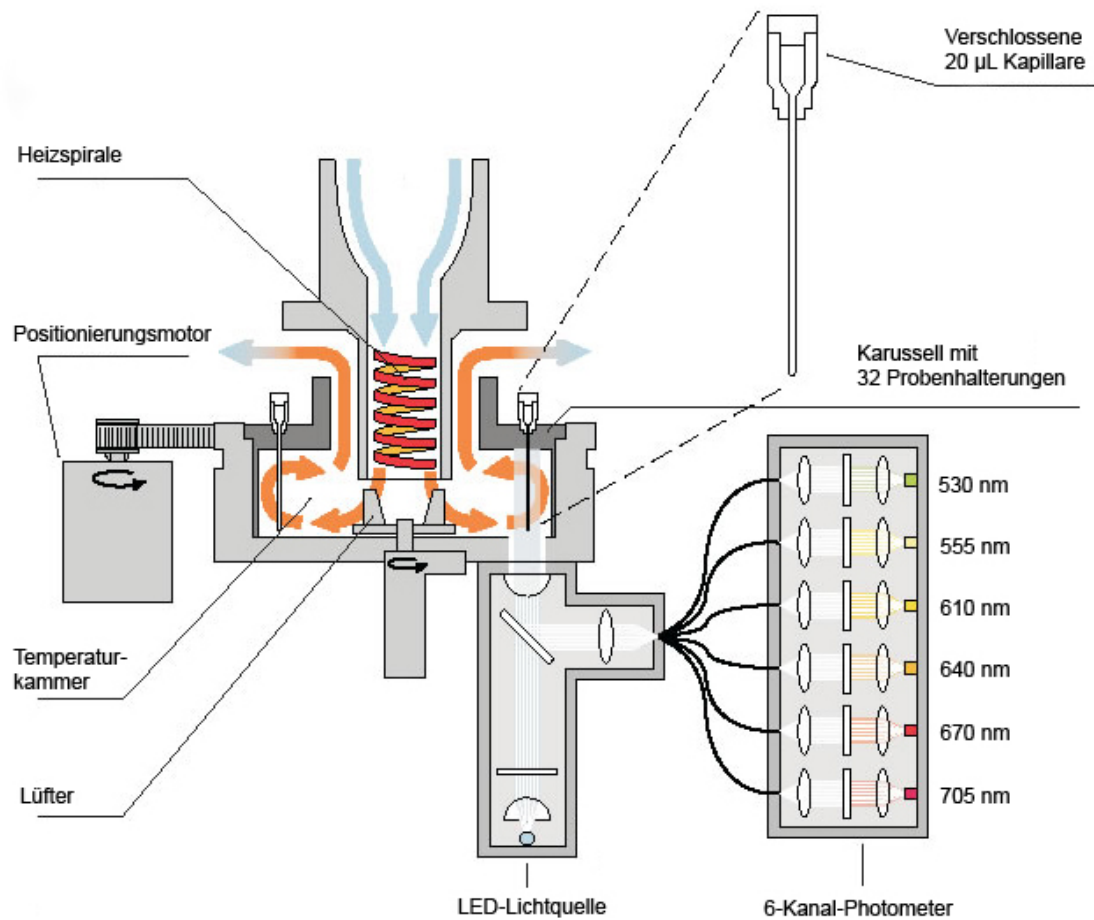


Abb. 6: Schematische Darstellung des LightCycler 2.0

(Verändert nach www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/index.jsp?id=LC01050101)

Die Ergebnisse und Schmelzkurven wurden anschließend analysiert. Nach Auswertung konnten die Proben als *Helicobacter pylori*-positiv oder -negativ gewertet werden. Bei positiven Proben konnte außerdem über die Schmelzkurven-Temperatur eine Aussage über die Clarithromycin-Empfindlichkeit getroffen werden (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Schmelzkurven-Analyse

Schmelzkurve bei	<i>Helicobacter pylori</i> - Infektionsstatus	Clarithromycin- Empfindlichkeit
47 °C (± 1 °C)	Negativ (Schmelzkurve der Internen Kontrolle)	—
54 °C (± 1 °C)	Positiv	Resistent (Mutation A2142G oder A2143G)
58 °C (± 1 °C)	Positiv	Resistent (Mutation A2142C)
63 °C (± 1 °C)	Positiv	Empfindlich (Wildtyp-Infektion)
2 Schmelzkurven (zwischen 54 °C und 63 °C; ± 1 °C)	Positiv	gemischte Infektion

8.2 Positivkontrollen

Die für die Positivkontrollen verwendeten *Helicobacter pylori*-Stämme sind in Tab. 5 aufgelistet.

Tab. 5: Positiv-Kontrollen

<i>Helicobacter pylori</i> -DNA	Wildtyp/Resistenz	Quelle
MC 098	Wildtyp (empfindlich)	
MC 081	A2142G-Resistenz	Klinisches Isolat, Sonja Strobel, Universität Freiburg, Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
MC 028	A2143G-Resistenz	
CI 50	A2142C-Resistenz	Klinisches Isolat, Konstanze Vogt, Humboldt Universität Berlin

9 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurden Sensitivität, Spezifität, der positiv prädiktive Wert (PPW), der negativ prädiktive Wert (NPW) mittels Chi-Quadrat-Test berechnet.

IV Ergebnisse

1 Demographische Daten der Patienten

Das Durchschnittsalter der 100 getesteten Kinder betrug $9,36 \pm 4,8$ Jahre mit einer Altersverteilung von 0,3 bis 18,3 Jahren. 28 Kinder waren jünger als 6 Jahre, 36 waren zwischen 6 und 12 Jahren und 36 Kinder waren älter als 12 Jahre.

2 *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus der Patienten

2.1 *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus

In Tab. 6 sind die Ergebnisse von Histologie, Kultur und ^{13}C -Harnstoff-Atemtest mit dem daraus definierten *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus aufgeführt.

Tab. 6: *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus

Gruppe	Ergebnis von			<i>H. pylori</i> - Infektions- status	Anzahl der Patienten
	Histologie	Kultur	^{13}C -Atemtest		
H I	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	40
H II	Positiv	Positiv	ND	Positiv	5
H III	Positiv	Negativ	Positiv	Positiv	1
H IV	Negativ	Negativ	ND	Negativ	32
H V	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	9
H VI	Negativ	ND	ND	Negativ	7
H VII	Negativ	ND	Negativ	Negativ	6

ND Nicht durchgeführt

Für 46 der 100 getesteten Kinder ergibt sich somit ein positiver *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus. Bei 40 Kindern konnten alle drei Tests (Histologie, Kultur, Atemtest) positive Ergebnisse erzielen (Gruppe H I). Bei 5 Kindern lag kein

Atemtest vor, die weiteren Test Kultur und Histologie lieferten aber ein positives Ergebnis (Gruppe H II). Unterschiedliche Ergebnisse ergaben sich bei einem Kind. Bei diesem waren Histologie und ^{13}C -Harnstoff-Atemtests positiv, die Kultur war negativ (Gruppe H III).

Für 54 der Kinder ergaben sich negative Ergebnisse in allen durchgeführten Tests (Gruppe H IV-VII).

Die genauen Ergebnisse der einzelnen Tests (u.a. Deltawert des ^{13}C -Harnstoff-Atemtests und MHK für Clarithromycin) können dem Anhang (siehe Kapitel IX 3) entnommen werden.

2.2 Ergebnisse der Clarithromycin-Sensitivitätstestung

Die Ergebnisse der E-Tests auf Clarithromycin sind in Tab. 7 aufgeführt.

Tab. 7: Clarithromycin-Sensitivität

Gruppe	<i>Helicobacter pylori</i> - Infektionsstatus	Kultur	E-Test aus Kultur ^a	Anzahl der Patienten
C I	Positiv	Positiv	Empfindlich	39
C II	Positiv	Positiv	Resistent	6
C III	Positiv	Negativ	NCG	1
C IV	Negativ	Negativ/ND	NCG	54

^a MHK $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ \rightarrow Empfindlich; MHK $> 1 \mu\text{g/ml}$ \rightarrow Resistent;

NCG Kein Kulturwachstum; ND nicht durchgeführt

Der E-Test zeigte bei 39 Patienten Infektionen mit *Helicobacter pylori*-Stämmen, die auf Clarithromycin empfindlich reagierten (Gruppe C I). Bei 6 Patienten lagen Infektionen mit Clarithromycin-resistenten *Helicobacter pylori*-Stämmen vor (Gruppe C II). Aufgrund des fehlenden Kulturwachstums bei einem *Helicobacter pylori*-positiven Patienten, konnte hier keine Aussage über die Clarithromycin-Sensitivität der Infektion getroffen werden (Gruppe C III).

3 Stuhl-EIA

Die Ergebnisse des Stuhl-EIA im Vergleich zum *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus sind in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Ergebnisse des Stuhl-EIA

Gruppe	<i>Helicobacter pylori</i> - Infektionsstatus	Ergebnis des Stuhl-EIA	Anzahl der Patienten
E I	Positiv	Positiv	44
E II	Positiv	Negativ	2
E III	Negativ	Negativ	54

44 der Patienten hatten übereinstimmend zum *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus ein positives Testergebnis (Gruppe E I). Lediglich bei zwei Patienten zeigte der Stuhl-EIA ein negatives Ergebnis, obwohl die anderen Tests einen positiven *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus festlegten (Gruppe E II). Bei allen *Helicobacter pylori*-negativen Patienten zeigte auch der EIA ein negatives Ergebnis (Gruppe E III).

Die detaillierten Ergebnisse des Stuhl-EIA sind im Anhang (siehe Kapitel IX 3) aufgeführt.

Die statistische Analyse des Stuhl-EIA ist in Tab. 9 angegeben. Der Stuhl-EIA zeigte eine Sensitivität von 95,7%, eine Spezifität von 100%, einen positiv prädiktiven Wert (PPW) von 100% und einen negativ prädiktiven Wert (NPW) von 96,4%.

Tab. 9: Statistische Analyse des Stuhl-EIA

Anzahl Positiver Proben	Anzahl Negativer Proben	Anzahl falsch- positiver Proben	Anzahl falsch- negativer Proben	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	PPW (%)	NPW (%)
44	54	0	2	95,7	100	100	96,4

Die Ergebnisse in Abhängigkeit vom Alter der Kinder sind in Tab. 10 dargestellt. Sowohl in der Altersgruppe bis sechs Jahre, als auch in der Gruppe zwischen sechs und zwölf Jahren konnte der Stuhl-EIA den *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus bestätigen. Bei Kindern und Jugendlichen über zwölf Jahren konnte der Stuhl-EIA bei 16 von 18 Kindern eine Infektion bestätigen. In allen Altersgruppen (54 Kinder) konnte der EIA den negativen *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus bestätigen.

Tab. 10: Ergebnisse des Stuhl-EIA in Abhängigkeit vom Alter der Kinder

Alter (Jahren)	Anteil <i>Helicobacter pylori</i> -positiver Kinder	Sensitivität	Spezifität
< 6	14,3% (4 von 28)	100% (4 von 4)	100% (24 von 24)
≥ 6 ; ≤ 12	69,9% (23 von 36)	100% (24 von 24)	100% (14 von 14)
> 12	52,8% (19 von 36)	88,9% (16 von 18)	100% (16 von 16)
Gesamt	46,0% (46 von 100)	95,7% (44 von 46)	100% (54 von 54)

4 Stuhlaufreinigung

Die DNA-Konzentration und Reinheitskontrolle nach Stuhlaufreinigung wurde stichprobenartig bei zehn Proben mittels Photometrie überprüft. Die genauen Werte sind in Tab. 11 dargestellt. Es ergab sich durch diese Quantifizierung ein durchschnittlicher DNA-Gehalt der Proben von 210 ng/μl. Die DNA-Reinheit der Lösungen waren mit einem Durchschnittsquotienten $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ von 2,1 größer als 1,8 und damit als rein zu beurteilen.

Tab. 11: DNA-Quantifizierung

Probennummer	OD _{260 nm}	OD _{280 nm}	OD _{260 nm} /OD _{280 nm}	DNA-Konz. der Probe
D 1	0,396	0,189	2,1	198 ng/μl
D 2	0,394	0,163	2,4	197 ng/μl
D 3	0,500	0,237	2,1	250 ng/μl
D 4	0,446	0,252	1,8	223 ng/μl
D 5	0,466	0,222	2,1	233 ng/μl
D 6	0,370	0,165	2,2	185 ng/μl
D 7	0,382	0,161	2,4	191 ng/μl
D 8	0,388	0,209	1,9	194 ng/μl
D 9	0,466	0,230	2,0	233 ng/μl
D 10	0,400	0,211	1,9	200 ng/μl
Gesamt	Ø 0,421	Ø 0,204	Ø 2,1	Ø 210 ± 22 ng/μl

5 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR-Ergebnisse sind in Tab. 12 aufgeführt. Bezüglich des Infektionsstatus lieferte der *Helicobacter pylori* ClariRes assay bei 29 Patienten eine Bestätigung des durch die anderen Tests festgestellten positiven *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus (Gruppe R I-II). Bei allen 54 *Helicobacter pylori*-negativen Patienten bestätigte die Real-Time PCR den negativen Infektionsstatus (Gruppe R VI). Unterschiedliche Ergebnisse lieferte die Real-Time PCR bei 17 Patienten (Gruppe R III-V). Bei ihnen zeigte die Real-Time PCR ein negatives Ergebnis, obwohl die anderen Tests einen positiven *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus feststellten.

In Hinblick auf die Sensitivitätstestung ordnete die Real-Time PCR allen positiven Ergebnissen den richtigen Genotyp zu (Gruppe R I-II). 25 Infektionen mit

Helicobacter pylori-Stämmen, die im E-Test auf Clarithromycin sensitiv getestet wurden und in der Real-Time PCR positiv waren, wurden in der Schmelzkurvenanalyse als sensitiv (23S rRNA-Wildtyp; Schmelzkurvenmaximum bei 63°C) erkannt. Bei vier Patienten, die eine Infektion mit einem Clarithromycin-resistenten *Helicobacter pylori*-Stamm hatten und von der Real-Time PCR als positiv erkannt wurden, zeigte die Schmelzkurvenanalyse ein Schmelzkurvenmaximum bei 54°C. Dies bestätigte eine 23S rRNA-Mutation (A2142G oder A2143G) mit daraus resultierender Clarithromycin-Resistenz.

Tab. 12: Ergebnisse der Real-Time PCR

Gruppe	Goldstandard		Real-Time PCR		Anzahl der Patienten
	<i>H. pylori</i> -Inf.-Status	E-Test aus Kultur ^a	<i>H. pylori</i>	Schmelzkurvenanalyse ^b	
R I	Positiv	Empfindlich	Positiv	Empfindlich (63 °C)	25
R II	Positiv	Resistent	Positiv	Resistent (54 °C)	4
R III	Positiv	Empfindlich	Negativ	—	14
R IV	Positiv	Resistent	Negativ	—	2
R V	Positiv	NCG	Negativ	—	1
R VI	Negativ	NCG	Negativ	—	54

^a MHK ≤ 1 µg/ml → Empfindlich; MHK > 1 µg/mL → Resistent

^b in Klammern sind die Temperaturen der Schmelzkurvenmaxima angegeben

NCG Kein Kulturwachstum

Die statistische Auswertung für die Real-Time PCR ist in Tab. 13 dargestellt. Bei den 100 getesteten Patienten zeigte die Real-Time PCR für den Nachweis von *Helicobacter pylori* eine Sensitivität von 63%, eine Spezifität von 100%, einen PPW von 100% und einen NPW von 76,1%.

Tab. 13: Statistische Analyse der Real-Time PCR

Anzahl Positiver Proben	Anzahl Negativer Proben	Anzahl falsch- positiver Proben	Anzahl falsch- negativer Proben	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	PPW (%)	NPW (%)
29	54	0	17	63,0	100	100	76,1

V Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden nicht-invasive diagnostische Methoden (ein EIA und eine Real-Time PCR für Stuhlmaterial) mit den Goldstandard-Methoden der *Helicobacter pylori*-Diagnostik bei Kindern verglichen. Der *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus von 100 Kindern wurde durch Histologie, Kultur und ¹³C-Harnstoff-Atemtest festgelegt und mit den Ergebnissen des Stuhl-EIA und der Real-Time PCR verglichen.

Nach den aktuellen Maastricht III Consensus Leitlinien (2005) sollten Kinder mit unklaren Oberbauchbeschwerden auf *Helicobacter pylori* getestet werden [94]. Der Goldstandard zum Nachweis von *Helicobacter pylori* bei Kindern ist die Ösophagogastroduodenoskopie mit Schleimhautbiopsien und konsekutiven histopathologischen und mikrobiologischen Untersuchungen [37]. Aufgrund der Resistenzlage sollte bei der *Helicobacter pylori*-Diagnostik von Kindern immer eine Resistenztestung erfolgen [37]. Gerade in Hinsicht auf die zunehmende Clarithromycin-Resistenz von *Helicobacter pylori* (Primärresistenzrate bei Kindern etwa 20%) und dem damit verbundenen signifikant erhöhten Therapieversagen, lag ein Schwerpunkt der Arbeit in der Evaluation der nicht-invasiven Clarithromycin-Sensitivitätstestung mittels der Real-Time PCR [75, 99, 153].

1 Diskussion des Patientenkollektivs und der Standard-Diagnostik

Die Studie wurde an 100 Kindern im Alter von 0 bis 18 Jahren durchgeführt (Durchschnittsalter 9,36 Jahre). Bezüglich der Altersverteilung der Kinder konnte eine gleichmäßige Verteilung über die verschiedenen Altersgruppen erzielt werden (28 Kinder < 6 Jahre; 36 Kinder > 6 und < 12 Jahre; 36 Kinder > 12 Jahre). Gerade bei jüngeren Kindern (< 6 Jahre) gibt es vergleichsweise wenig Studien zur *Helicobacter pylori*-Diagnostik [57]. Es zeigt sich, dass bei Kindern unter 6 Jahren ¹³C-Harnstoff-Atemtests vermehrt falsch-positive und serologische Untersuchungen vermehrt falsch-negative Ergebnisse erzielen können [57, 70]. Durch eine gleichmäßige Altersverteilung berücksichtigt diese Arbeit auch junge Kinder (< 6 Jahren), bei denen womöglich schwierigere Testbedingungen vorliegen.

Durch die Standardmethoden der Diagnostik wurde für 46 Kinder ein positiver und für 54 Kinder ein negativer *Helicobacter pylori*-Status definiert. Histologie, Kultur und ¹³C-Harnstoff-Atemtest zeigten mit Ausnahme eines Falles durchweg übereinstimmende Ergebnisse. Bei einem Kind waren Histologie und Atemtest positiv, jedoch zeigte die Kultur ein negatives Ergebnis (Gruppe H III; siehe Tab. 6, Seite 30). Da die Histologie eine sehr spezifische Methode zum Nachweis von *Helicobacter pylori* ist und neben dieser auch der Atemtest positiv war, wurde diese Probe als positiv gewertet. Der kulturelle Nachweis von *Helicobacter pylori* hat zwar definitionsgemäß eine Spezifität von 100%, jedoch lässt der Test auch falsch-negative Ergebnisse zu [85]. Dies ist dadurch erklärbar, dass bei Magenschleimhautbiopsien von *Helicobacter pylori*-positiven Patienten auch ein nicht-kolonisiertes Areal biopsiert werden und damit ein negatives Ergebnis vorliegen kann. Deshalb sollen in der *Helicobacter pylori*-Diagnostik immer mindestens zwei diagnostische Tests durchgeführt werden [57]. Dies wurde bei der Definition des *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus in dieser Studie beachtet.

Bezüglich der Clarithromycin-Resistenz zeigte sich durch die Standardmethoden eine Resistenzrate bei 6 von 46 infizierten Kindern (13%). Dies liegt nur knapp unter der in der Literatur beschriebenen Resistenzrate von etwa 20% [75]. Es liegt somit ein repräsentativer Anteil an Clarithromycin-resistenten Infektionen in der Studienpopulation vor. Jedoch muss angemerkt werden, dass mit sechs Patienten leider nur eine geringe Zahl an resistenten Fällen vorliegt. Dieses Problem hätte nur durch eine höhere Anzahl an Patienten gelöst werden können, die für diese Studie aber leider nicht akquiriert werden konnten.

2 Diskussion des Stuhl-EIA

Stuhlantigentests mittels monoklonaler Antikörper sind mittlerweile eine anerkannte Methode in der Diagnostik zum Nachweis von *Helicobacter pylori* bei Kindern [37]. Der monoklonale Stuhl-EIA, der in dieser Arbeit durchgeführt wurde (*Amplified IDEIA Hp StAR*, DakoCytomation), zeigte bezogen auf den *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus eine Sensitivität und Spezifität von 95,7% und 100%. Lediglich bei zwei *Helicobacter pylori*-positiven Kindern konnte der

Test keine Infektion nachweisen (Gruppe E II; siehe Tab. 8, Seite 32). Dies bestätigt die Ergebnisse anderer monoklonaler EIA, die ebenfalls eine hohe Sensitivität und Spezifität (von über 95%) zeigten [74, 152]. Durch eine einfache Durchführbarkeit und ein schnelles Ergebnis innerhalb von zwei bis drei Stunden eignet sich der Stuhl-EIA hervorragend auch im ambulanten Bereich. Die Stuhlproben können von der pädiatrischen Praxis direkt an ein Labor verschickt werden, welches das Material dann weiter untersucht und nach wenigen Stunden ein Ergebnis liefern kann. Vorteil gegenüber dem ^{13}C -Harnstoff-Atemtest ist, dass keine Spezialgeräte und speziell geschultes Personal notwendig sind.

Der *Amplified IDEIA Hp StAR* zeigte gerade bei den 28 Kindern unter sechs Jahren exzellente Ergebnisse (Sensitivität und Spezifität je 100%; siehe Tab. 10, Seite 33). Wie schon angeführt, erweist sich die *Helicobacter pylori*-Diagnostik von Kindern unter sechs Jahren oft schwieriger als bei älteren Kindern. Der ^{13}C -Harnstoff-Atemtest konnte in dieser Gruppe nur bei acht von 20 Kindern durchgeführt werden. Bei Säuglingen oder Kleinkindern ist die Diagnostik mittels ^{13}C -Harnstoff-Atemtest schwieriger durchzuführen als bei älteren Kindern und kann außerdem vermehrt falsch-positive Werte zeigen. Der Stuhl-EIA sollte gerade in dieser Gruppe angewendet werden, da das Stuhlmaterial im Vergleich zu den Atemproben wesentlich einfacher zu erhalten und keine Kooperation des Patienten notwendig ist. Bei Kleinkindern und Säuglingen ist also der Stuhl-EIA eine geeignete und attraktive Alternative für die nicht-invasive Diagnostik.

Um in dieser Arbeit eine einheitliche Diagnostik zu gewährleisten, wurde lediglich Stuhlmaterial von therapie-naiven Kindern untersucht. Der Stuhl-EIA könnte sich bei Kindern auch in der Diagnostik nach erfolgter Eradikationstherapie als gute Alternative zum ^{13}C -Harnstoff-Atemtest erweisen. Hierfür liegen in anderen Studien bereits viel versprechende Ergebnisse vor [56].

Auch wenn der Stuhl-EIA ein sehr guter nicht-invasiver Test ist, hat er den Nachteil, dass eine Clarithromycin-Empfindlichkeitstestung nicht möglich ist. Da in der Primärdiagnostik nach den aktuellen Leitlinien der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften e.V.) von 2009 bei Kindern eine Resistenztestung erfolgen soll, müsste hier also auf andere Verfahren zurückgegriffen werden [37]. In dieser Arbeit wurde eine nicht-

invasive Alternative mit Resistenztestung in Form der Real-Time PCR evaluiert, die im Folgenden diskutiert werden soll.

3 Diskussion der Real-Time PCR

Real-Time PCR-Methoden ermöglichen durch den Nachweis von Punktmutationen der 23S rRNA eine Clarithromycin-Sensitivitätstestung in der *Helicobacter pylori*-Diagnostik. Verschiedene Real-Time PCRs wurden schon für die Sensitivitätstestung von Bakterienkulturen und Schleimhautbiopsien angewandt [22, 45, 87, 111]. Eine solche Real-Time PCR, die erstmals Stuhl als Probenausgangsmaterial untersuchte, wurde von Schabereiter-Gurtner *et al.* etabliert und an 92 Erwachsenen getestet [126]. Diese Real-time PCR (*Helicobacter pylori ClariRes assay*, Ingenetix) erwies sich mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 98% als sehr akkurate Methode zur nicht-invasiven Resistenztestung bei Erwachsenen. In der vorliegenden Arbeit wurde der *Helicobacter pylori ClariRes assay* an Stuhlmaterial von 100 Kindern getestet. Auf diese Weise wurde erstmals bei Kindern eine nicht-invasive Clarithromycin-Sensitivitätstestung evaluiert.

Bei 46 der 100 Kinder wurde durch die Goldstandard-Methoden ein positiver *Helicobacter pylori*-Status ermittelt. Der *Helicobacter pylori ClariRes assay* zeigte einen positiven Infektionsnachweis bei 29 dieser 46 Kinder (Gruppen R I-II; siehe Tab. 12, Seite 35). Es ergab sich mit 63% eine Sensitivität, die signifikant niedriger war als die Sensitivität, die bei Erwachsenen ermittelt wurde (98%) [126].

Es stellt sich die Frage, warum bei 17 Kindern ein falsch negatives Ergebnis und damit eine deutlich niedrigere Sensitivität erzielt wurde. Interessanterweise ergab der Stuhl-EIA für 15 dieser 17 falsch-negativen Versuche einen positiven Nachweis. Deshalb kann angenommen werden, dass ausreichend *Helicobacter pylori*-Proteine in diesen Stuhlproben vorhanden waren. Die stichprobenartige DNA-Quantifizierung nach der Stuhlaufreinigung mittels *QIAamp DNA Stool Mini Kit* ergab eine durchschnittliche Gesamt-DNA-Menge von 185 bis 250 ng/ μ l, die in einem ausreichendem Reinheitsgrad vorlag (durchschnittlicher $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}} > 1,8$; siehe Tab. 11, Seite 34). Die Nachweisgrenze des

Helicobacter pylori ClariRes assay wurde von Schabereiter-Gurtner *et al.* für etwa 10-15 pg/g Stuhl ermittelt [126]. Es ist also unwahrscheinlich, dass eine zu geringe DNA-Menge im Stuhl Grund für die falsch-negativen Resultate war. Allerdings kann durch die DNA-Quantifizierung keine Aussage über die Qualität der vorliegenden DNA gemacht werden. Eine Möglichkeit der schlechten Sensitivität könnte somit eine minderwertige Qualität der DNA gewesen sein. Da die Proben teilweise bei -20°C zwischengelagert werden mussten, ist nicht auszuschließen, dass dadurch die DNA degradiert wurde und die Real-Time PCR deshalb falsch-negative Ergebnisse erzielte.

Eine weitere Möglichkeit für die herabgesetzte Empfindlichkeit der PCR sind PCR-Inhibitoren, die sich v.a. in organischem Material (besonders Stuhl und Gewebe) finden [106, 107]. Es existieren verschiedene Aufreinigungsmethoden, die das Stuhlmaterial von diesen Inhibitoren befreien und DNA aus den Proben anreichern [65]. In dieser Arbeit wurde für die Stuhlaufreinigung das *QIAamp DNA Stool Mini Kit* gewählt, um möglichst standardisiert und mit einer etablierten Methode DNA aus dem Ausgangsmaterial zu gewinnen. PCR-Inhibitoren können als Ursache für die falsch-negativen Ergebnisse weitestgehend ausgeschlossen werden, da die interne Amplifikationskontrolle, die nach der Stuhlaufreinigung dem PCR-Ansatz hinzugegeben wurde, in allen Fällen ein positives Schmelzkurvenkorrelat zeigte. Aus diesem Grund sind auch Fehler, die mit dem PCR-Ansatz zusammenhängen (fehlende Substanzen oder Verunreinigungen), unwahrscheinlich, da auch in diesen Fällen keine Amplifikation der internen Kontrolle erfolgt wäre.

Ein weiterer Grund für die herabgesetzte Sensitivität im Vergleich zur Testung bei Erwachsenen, sind womöglich Unterschiede im Magen-Darm-Trakt von Erwachsenen und Kindern. So könnte z.B. eine unterschiedliche mikrobakterielle Darmbesiedelung oder eine kürzere, schnellere Darmpassage bei Kindern die Qualität der DNA im Stuhl für die PCR-Testung beeinflussen.

Bei allen 54 *Helicobacter pylori*-negativen Kindern bestätigte die Real-Time PCR ein negatives Ergebnis (Spezifität 100%; siehe Tab. 12, Seite 35). Dieses Ergebnis liegt nahe an der Spezifität (98%), die mit dem *Helicobacter pylori ClariRes* assay bei Erwachsenen ermittelt wurde [126]. Es deutet also darauf hin, dass die im *Helicobacter pylori ClariRes* assay verwendeten Primer sehr

spezifisch an *Helicobacter pylori*-DNA binden. Dieses Argument wird noch deutlicher, wenn man die positiven Ergebnisse des *Helicobacter pylori* ClariRes assay betrachtet. Alle 29 positiv getesteten Kinder zeigten auch ein positives *Helicobacter pylori*-Kulturergebnis. Auch die Clarithromycin-Sensitivitätstestung bestätigte in allen Fällen das durch den E-Test ermittelte Ergebnis (Gruppen R I-II; siehe Tab. 12, Seite 35). Die Schmelzkurvenanalyse der LightCycler Software war einfach zu interpretieren und zeigte eindeutige Schmelzkurvenmaxima. Es konnte also im Falle eines positiven *Helicobacter pylori* ClariRes assay immer eine exakte Aussage über die Clarithromycin-Sensitivität gemacht werden. Die Real-Time PCR lieferte gegenüber dem E-Test sogar noch zusätzliche Information über die Art der Punktmutation der 23S rRNA (in allen 4 Fällen A2142G oder A2143G).

Ein Vorteil der Real-Time PCR ist, dass sie sehr schnelle Ergebnisse liefert (nach etwa drei Stunden). Stuhlaufreinigung und Real-Time PCR waren nach einer kurzen Einübungsphase einfach durchzuführen. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass durch den LightCycler ein sehr teures Gerät zur Verfügung stehen muss und zusätzlich die Materialien für diesen Test teuer sind (Kosten etwa 50 € pro Probe). Es ist somit, verglichen zu Stuhl-EIA (17 €) und ¹³C-Harnstoff-Atemtest (25 €), eine relativ teure Untersuchung für die Routinediagnostik.

4 Fazit und Ausblick

Eine invasive *Helicobacter pylori*-Diagnostik liefert neben einem Keimnachweis wertvolle Informationen über Entzündungsgrad der Magenschleimhaut, peptische Ulzera und Keimresistenz, bringt jedoch eine psychische Belastung für Kinder und Eltern sowie mögliche Nebenwirkungen und Komplikationen des invasiven Eingriffes. Die nicht-invasive Diagnostik in Form von Stuhltests gewinnt immer mehr an Bedeutung, da diese Tests schnelle Ergebnisse liefern und auch im ambulanten Bereich ohne eine spezielle Ausstattung erfolgen können.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass der Stuhl-EIA ein sensitiver (95,7%) und spezifischer (100%) Test in der Diagnostik von *Helicobacter pylori* ist. Gerade bei Kindern unter sechs Jahren zeigt der Stuhl-Test im Vergleich zum ¹³C-

Harnstoff-Atemtest gute Ergebnisse und kann ohne Kooperation des Patienten angewandt werden.

Der Nachweis von *Helicobacter pylori* aus dem Stuhl von Kindern durch den *Helicobacter pylori* ClariRes assay zeigte eine sehr hohe Spezifität (100%), aber nur eine geringe Sensitivität (64%). Die Arbeit konnte zeigen, dass der Nachweis von *Helicobacter pylori* aus Stuhlmaterial durch Real-Time PCRs schwierig ist und bisher nicht die anderen diagnostischen Tests ersetzen kann. Insbesondere eignet sich der *Helicobacter pylori* ClariRes assay aufgrund der niedrigen Sensitivität nicht als Screening-Test in der Diagnostik von *Helicobacter pylori*. Für bestimmte Fragestellungen, z.B. als Bestätigungstest nach positivem Stuhl-EIA, wäre der Test gegebenenfalls geeignet, um zusätzliche Informationen über die Clarithromycin-Sensitivität zu liefern.

Um nicht zu viele beeinflussende Faktoren zu erhalten, wurden nur Kinder in die Studie aufgenommen, die vorher keine Therapie gegen *Helicobacter pylori* erhalten hatten. Eine Frage, die sich durch diese Studie nicht beantworten lässt, ist die diagnostische Wertigkeit des EIA und der Real-Time PCR nach Therapie. Insbesondere für den *Helicobacter pylori* ClariRes assay wäre diese Fragestellung interessant, da bei Therapieversagern die Resistenzrate für Clarithromycin stark ansteigt. Hier wäre eine nicht-invasive Diagnostik besonders erstrebenswert, um eine erneute Gastroskopie zu vermeiden.

VI Zusammenfassung

Helicobacter pylori, ein gramnegatives Stäbchenbakterium, kann durch eine Invasion der Magenschleimhaut Erkrankungen wie die Typ B-Gastritis, die gastroduodenale Ulkuserkrankung, das Magenkarzinom sowie das MALT-Lymphom hervorrufen. Etwa die Hälfte der Weltbevölkerung ist von einer Infektion betroffen und damit potentiell einem erhöhten Risiko für diese Erkrankungen ausgesetzt. Die Behandlung einer *Helicobacter pylori*-Infektion erfolgt durch eine Kombinationstherapie, bestehend aus zwei Antibiotika – Clarithromycin plus Metronidazol oder Clarithromycin plus Amoxicillin – und einem Protonenpumpen-Inhibitor. Therapeutische Probleme bereiten zunehmende Antibiotika-Resistenzen von *Helicobacter pylori* – insbesondere Resistenzen gegen Clarithromycin, die fast immer mit einem Therapieversagen assoziiert sind. Die derzeitige Goldstandard-Diagnostik mittels Ösophagogastroduodenoskopie beinhaltet deshalb neben dem Keimnachweis immer auch eine Antibiotika-Sensitivitätstestung.

Ziel dieser Arbeit war es, zwei nicht-invasive Tests – einen Enzymimmunoassay (*Amplified IDEIA Hp StAR*; DakoCytomation) und eine Real-Time PCR (*Helicobacter pylori ClariRes assay*; Ingenetix) – an Stuhlmaterial von 100 symptomatischen, therapie-naiven Kindern zu testen und mit den gängigen Methoden der *Helicobacter pylori*-Diagnostik zu vergleichen. Der Infektionsstatus der Kinder wurde durch die Methoden Histologie, Kultur und ¹³C-Harnstoff-Atemtest festgelegt.

Die Standard-Methoden zeigten für 54 Kinder einen negativen *Helicobacter pylori*-Infektionsstatus. Dieses Ergebnis wurde durch beide Stuhltests bestätigt (Spezifität jeweils 100%). Für die restlichen 46 Kinder wurde durch die Standard-Methoden ein positiver Infektionsstatus festgestellt. Der Stuhl-EIA bestätigte bei 44 dieser Kinder das positive Ergebnis und zeigte nur zwei falsch-negative Tests (Sensitivität 95,7%). Die Real-Time PCR lieferte bei 29 dieser Kinder ein positives Ergebnis (Sensitivität 69%). Für diese 29 Kinder konnte die Clarithromycin-Sensitivitätstestung des *Helicobacter pylori ClariRes assay* in allen Fällen das Ergebnis des E-Tests bestätigen.

Es stellte sich heraus, dass der Stuhl-EIA durch seine exzellente Sensitivität und Spezifität über alle Altersgruppen ein guter Test ist, der günstig und leicht durchzuführen ist. Gerade bei Kindern unter sechs Jahren sollte er statt des ebenfalls nicht-invasiven ¹³C-Harnstoff-Atemtests angewendet werden. Nachteil des Stuhl-EIA bleibt jedoch eine fehlende Clarithromycin-Sensitivitätstestung. Der *Helicobacter pylori* ClariRes assay stellte sich zwar ebenfalls als schnelle und einfache diagnostische Methode dar, lieferte aber einige falsch-negative Ergebnisse (14 Kinder) und ist, verglichen mit den anderen nicht-invasiven Tests, relativ teuer. Daher kann dieser Test keine Alternative zur bisherigen Diagnostik darstellen und sollte lediglich als Zusatzuntersuchung für spezielle Fragestellungen eingesetzt werden. So könnte er z.B. als Bestätigungstest nach positivem Stuhl-EIA hilfreich sein, um zusätzliche Informationen über eine möglicherweise vorhandene Clarithromycin-Resistenz zu liefern.

In dieser Studie wurden nur therapie-naive Kinder in die Untersuchung einbezogen. Ob diese Tests bei Kindern nach erfolgter Eradikationstherapie ähnliche Ergebnisse liefern, bedarf einer Bestätigung durch weitere Studien.

VII Summary

The gram negative bacterium *Helicobacter pylori* colonizes the gastric mucosa and potentially induces chronic gastritis, peptic ulcer disease, gastric cancer and MALT lymphoma. About half of the world's population is infected by *Helicobacter pylori* and therefore at higher risk for these diseases. Treatment of *Helicobacter pylori* comprises a combination therapy of two antibiotics (Clarithromycin plus Amoxicillin or Clarithromycin plus Metronidazole) and a proton pump inhibitor. Therapeutic problem is an increasing antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* – especially its resistance to Clarithromycin which is strongly associated with treatment failure. Thus, “gold standard” of *Helicobacter pylori* diagnostics includes gastroduodenoscopy with concomitant susceptibility testing of antibiotics.

Aim of this study was to evaluate an enzyme immuno assay (*Amplified IDEIA Hp StAR*; DakoCytomation) and a real-time PCR (*Helicobacter pylori ClariRes assay*; Ingenetix) for the detection of *Helicobacter pylori* infection in stool samples from 100 symptomatic children. The results of these stool methods were directly compared with the results obtained from histological examination of gastric biopsy specimens, culturing and the ¹³C-urea breath test.

Fecal specimens from all 54 children who were shown to be non-infective by “gold standard” tests gave true-negative results in both stool tests (specificity 100%). Of the remaining 46 children a positive *Helicobacter pylori* status was shown by standard methods. The stool EIA confirmed 44 of these children to be infective giving only two negative results (sensitivity 95.7%). The real-time PCR found only 29 cases to be *Helicobacter pylori* positive (sensitivity 63%). For these 29 cases the *Helicobacter pylori ClariRes assay* confirmed all results from phenotypic Clarithromycin susceptibility testing by Etest.

In summary, this investigation demonstrates that the stool EIA is a very accurate and inexpensive test that can easily and quickly be performed. Especially in children under the age of six years the test should be used instead of the ¹³C-urea breath test. Disadvantage of the stool EIA remains a missing Clarithromycin susceptibility testing. The *Helicobacter pylori ClariRes assay* is also a quick and simple diagnostic method, but showed 14 false-negative results and is rela-

tively expensive compared to the other non-invasive methods. Thus, the real-time PCR cannot replace other tests for the accurate diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children but could be used for specific questions. For instance the *Helicobacter pylori* ClariRes assay could help as a confirmation test after positive stool EIA to give additional information about a possible Clarithromycin resistance.

In this study only therapy-naive children were included in the investigations. Thus, other studies need to evaluate these tests for children after eradication therapy.

VIII Literaturverzeichnis

1. **Abbott, A.** 2005. Gut feeling secures medical Nobel for Australian doctors. *Nature* **437**:801.
2. **Algood, H. M., and T. L. Cover.** 2006. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clin Microbiol Rev* **19**:597-613.
3. **Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and T. J. Trust.** 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**:176-180.
4. **Andersen, L. P., and T. Wadström.** 2001. Basic Bacteriology and Culture, p. 27-38. In H. L. Mobley, G. L. Mendz, and S. L. Hazell (ed.), *Helicobacter pylori*: physiology and genetics. ASM Press, Washington, DC.
5. **Appelmek, B. J., R. Negrini, A. P. Moran, and E. J. Kuipers.** 1997. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends Microbiol* **5**:70-73.
6. **Asaka, M., T. Kimura, M. Kudo, H. Takeda, S. Mitani, T. Miyazaki, K. Miki, and D. Y. Graham.** 1992. Relationship of *Helicobacter pylori* to serum pepsinogens in an asymptomatic Japanese population. *Gastroenterology* **102**:760-766.
7. **Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek, Jr., M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover.** 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* **270**:17771-17777.
8. **Azevedo, N. F., C. Almeida, L. Cerqueira, S. Dias, C. W. Keevil, and M. J. Vieira.** 2007. Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. *Appl Environ Microbiol* **73**:3423-3427.
9. **Backert, S., S. Moese, M. Selbach, V. Brinkmann, and T. F. Meyer.** 2001. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* *CagA* protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* **42**:631-644.
10. **Banatvala, N., K. Mayo, F. Megraud, R. Jennings, J. J. Deeks, and R. A. Feldman.** 1993. The cohort effect and *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis* **168**:219-221.
11. **Bardhan, P. K.** 1997. Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Clin Infect Dis* **25**:973-978.
12. **Bayerdorffer, E., N. Lehn, R. Hatz, G. A. Mannes, H. Oertel, T. Sauerbruch, and M. Stolte.** 1992. Difference in expression of *Helicobacter pylori* gastritis in antrum and body. *Gastroenterology* **102**:1575-1582.
13. **Bayerdorffer, E., A. Neubauer, B. Rudolph, C. Thiede, N. Lehn, S. Eidt, and M. Stolte.** 1995. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. *Lancet* **345**:1591-1594.
14. **Benaissa, M., P. Babin, N. Quellard, L. Pezennec, Y. Cenatiempo, and J. L. Fauchere.** 1996. Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. *Infect Immun* **64**:2331-2335.
15. **Bizzozero, G.** 1893. Ueber die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. *Arch Mikr Anat* **42**:82-152.
16. **Booka, M., M. Okuda, K. Shin, E. Miyashiro, H. Hayashi, K. Yamauchi, Y. Tamura, and N. Yoshikawa.** 2005. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* infection in children using stool sample. *Helicobacter* **10**:205-213.

17. **Burucoa, C., C. Landron, M. Garnier, and J. L. Fauchere.** 2005. T2182C mutation is not associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:868; author reply 868-70.
18. **Cadranel, S., H. Goossens, M. De Boeck, A. Malengreau, P. Rodesch, and J. P. Butzler.** 1986. *Campylobacter pyloridis* in children. *Lancet* **1**:735-736.
19. **Caselli, M., A. Aleotti, A. Barboni, and V. Alvisi.** 1990. Sydney classification for gastritis and *Helicobacter pylori*. *Lancet* **336**:1445-1446.
20. **Chattopadhyay, S., R. Patra, T. Ramamurthy, A. Chowdhury, A. Santra, G. K. Dhali, S. K. Bhattacharya, D. E. Berg, G. B. Nair, and A. K. Mukhopadhyay.** 2004. Multiplex PCR assay for rapid detection and genotyping of *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens. *J Clin Microbiol* **42**:2821-2824.
21. **Ching, C. K., B. C. Wong, E. Kwok, L. Ong, A. Covacci, and S. K. Lam.** 1996. Prevalence of *CagA*-bearing *Helicobacter pylori* strains detected by the anti-*CagA* assay in patients with peptic ulcer disease and in controls. *Am J Gastroenterol* **91**:949-953.
22. **Chisholm, S. A., R. J. Owen, E. L. Teare, and S. Saverymuttu.** 2001. PCR-based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and real-time determination of clarithromycin resistance directly from human gastric biopsy samples. *J Clin Microbiol* **39**:1217-1220.
23. **Cover, T. L., Y. Glupczynski, A. P. Lage, A. Burette, M. K. Tummuru, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blaser.** 1995. Serologic detection of infection with *cagA+* *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol* **33**:1496-1500.
24. **Cullen, D. J., B. J. Collins, K. J. Christiansen, J. Epis, J. R. Warren, I. Surveyor, and K. J. Cullen.** 1993. When is *Helicobacter pylori* infection acquired? *Gut* **34**:1681-1682.
25. **de Oliveira, A. M., G. A. Rocha, D. M. Queiroz, E. N. Mendes, A. S. de Carvalho, T. C. Ferrari, and A. M. Nogueira.** 1999. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children from different age groups with and without duodenal ulcer. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **28**:157-161.
26. **Dixon, M. F., R. M. Genta, J. H. Yardley, and P. Correa.** 1996. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* **20**:1161-1181.
27. **Dooley, C. P., H. Cohen, P. L. Fitzgibbons, M. Bauer, M. D. Appleman, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blaser.** 1989. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N Engl J Med* **321**:1562-1566.
28. **Drumm, B., G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser, and P. M. Sherman.** 1990. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* **322**:359-363.
29. **Drumm, B., P. Sherman, E. Cutz, and M. Karmali.** 1987. Association of *Campylobacter pylori* on the gastric mucosa with antral gastritis in children. *N Engl J Med* **316**:1557-1561.
30. **Duck, W. M., J. Sobel, J. M. Pruckler, Q. Song, D. Swerdlow, C. Friedman, A. Sulka, B. Swaminathan, T. Taylor, M. Hoekstra, P. Griffin, D. Smoot, R. Peek, D. C. Metz, P. B. Bloom, S. Goldschmidt, J. Parsonnet, G. Triadafilopoulos, G. I. Perez-Perez, N. Vakil, P. Ernst, S. Czinn, D. Dunne, and B. D. Gold.** 2004. Antimicrobial resistance incidence and risk factors among *Helicobacter pylori*-infected persons, United States. *Emerg Infect Dis* **10**:1088-1094.
31. **Eaton, K. A., C. L. Brooks, D. R. Morgan, and S. Krakowka.** 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* **59**:2470-2475.
32. **Eaton, K. A., D. R. Morgan, and S. Krakowka.** 1992. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* **37**:123-127.
33. **Edwards, D. I.** 1993. Nitroimidazole drugs - action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother* **31**:9-20.

34. **Eidt, S., M. Stolte, and R. Fischer.** 1994. *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol* **47**:436-439.
35. **Evans, D. J., Jr., and D. G. Evans.** 2000. *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives. *Helicobacter* **5**:183-195.
36. **Ferguson, D. A., Jr., C. Li, N. R. Patel, W. R. Mayberry, D. S. Chi, and E. Thomas.** 1993. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J Clin Microbiol* **31**:2802-2804.
37. **Fischbach, W., P. Malfertheiner, J. C. Hoffmann, W. Bolten, J. Bornschein, O. Gotze, W. Hohne, M. Kist, S. Koletzko, J. Labenz, P. Layer, S. Miehlike, A. Morgner, U. Peitz, J. Preiss, C. Prinz, U. Rosien, W. Schmidt, A. Schwarzer, S. Suerbaum, A. Timmer, G. Treiber, and M. Vieth.** 2009. S3-Guideline "*Helicobacter pylori* and gastro-duodenal ulcer disease" of the German Society for Digestive and Metabolic Diseases (DGVS) in cooperation with the German Society for Hygiene and Microbiology, Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition e. V., German Society for Rheumatology, AWMF-Registration-no. 021 / 001. *Z Gastroenterol* **47**:1230-1263.
38. **Fontana, C., M. Favaro, S. Minelli, A. A. Criscuolo, A. Pietroiusti, A. Galante, and C. Favalli.** 2002. New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3765-3769.
39. **Fontana, C., M. Favaro, A. Pietroiusti, E. S. Pistoia, A. Galante, and C. Favalli.** 2003. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in stool samples. *J Clin Microbiol* **41**:3636-3640.
40. **Fox, J. G.** 1995. Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* **9 Suppl 2**:93-103.
41. **Freedberg, A. S., and L. E. Baron.** 1940. The presence of spirochetes in human gastric mucosa. *Am J Dig Dis* **7**:443-445.
42. **Gebert, B., W. Fischer, E. Weiss, R. Hoffmann, and R. Haas.** 2003. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* **301**:1099-1102.
43. **Georgopoulos, S. D., A. F. Mentis, C. A. Spiliadis, L. S. Tzouveleakis, E. Tzelepi, A. Moshopoulos, and N. Skandalis.** 1996. *Helicobacter pylori* infection in spouses of patients with duodenal ulcers and comparison of ribosomal RNA gene patterns. *Gut* **39**:634-638.
44. **Gerrits, M. M., D. Schuijffel, A. A. van Zwet, E. J. Kuipers, C. M. Vandenbroucke-Grauls, and J. G. Kusters.** 2002. Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2229-2233.
45. **Gibson, J. R., N. A. Saunders, B. Burke, and R. J. Owen.** 1999. Novel method for rapid determination of clarithromycin sensitivity in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* **37**:3746-3748.
46. **Gisbert, J. P., and J. M. Pajares.** 2004. Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. *Helicobacter* **9**:347-368.
47. **Glupczynski, Y., N. Broutet, A. Cantagrel, L. P. Andersen, T. Alarcon, M. Lopez-Brea, and F. Megraud.** 2002. Comparison of the E test and agar dilution method for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**:549-552.
48. **Glupczynski, Y., F. Megraud, M. Lopez-Brea, and L. P. Andersen.** 2001. European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**:820-823.
49. **Goldman, R. C., D. Zakula, R. Flamm, J. Beyer, and J. Capobianco.** 1994. Tight binding of clarithromycin, its 14-(R)-hydroxy metabolite, and erythromycin to *Helicobacter pylori* ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:1496-1500.
50. **Goodman, K. J., and P. Correa.** 1995. The transmission of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. *Int J Epidemiol* **24**:875-887.

51. **Goodwin, A., D. Kersulyte, G. Sisson, S. J. Veldhuyzen van Zanten, D. E. Berg, and P. S. Hoffman.** 1998. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol* **28**:383-393.
52. **Goodwin, C. S., J. A. Armstrong, T. Chilvers, M. Peters, M. D. Collins, L. Sly, W. McConnell, and W. E. S. Harper.** 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* **39**:397-405.
53. **Graham, D. Y.** 1989. *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. *Gastroenterology* **96**:615-625.
54. **Graham, D. Y., P. D. Klein, D. J. Evans, Jr., D. G. Evans, L. C. Alpert, A. R. Opekun, and T. W. Boutton.** 1987. *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the ¹³C-urea breath test. *Lancet* **1**:1174-1177.
55. **Graham, D. Y., A. R. Opekun, M. S. Osato, H. M. El-Zimaity, C. K. Lee, Y. Yamaoka, W. A. Qureshi, M. Cadoz, and T. P. Monath.** 2004. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut* **53**:1235-1243.
56. **Guarner, J., N. Kalach, Y. Elitsur, and S. Koletzko.** 2010. *Helicobacter pylori* diagnostic tests in children: review of the literature from 1999 to 2009. *Eur J Pediatr* **169**:15-25.
57. **Guarner, J., N. Kalach, Y. Elitsur, and S. Koletzko.** 2009. *Helicobacter pylori* diagnostic tests in children: review of the literature from 1999 to 2009. *Eur J Pediatr* **169**:15-25.
58. **Hazell, S. L., D. J. Evans, Jr., and D. Y. Graham.** 1991. *Helicobacter pylori* catalase. *J Gen Microbiol* **137**:57-61.
59. **Heep, M., M. Kist, S. Strobel, D. Beck, and N. Lehn.** 2000. Secondary resistance among 554 isolates of *Helicobacter pylori* after failure of therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**:538-541.
60. **Heneghan, M. A., C. F. McCarthy, and A. P. Moran.** 2000. Relationship of blood group determinants on *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide with host lewis phenotype and inflammatory response. *Infect Immun* **68**:937-941.
61. **Hessey, S. J., J. Spencer, J. I. Wyatt, G. Sobala, B. J. Rathbone, A. T. Axon, and M. F. Dixon.** 1990. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut* **31**:134-138.
62. **Hill, R., J. Pearman, P. Worthy, V. Caruso, S. Goodwin, and E. Blincow.** 1986. *Campylobacter pyloridis* and gastritis in children. *Lancet* **1**:387.
63. **Hilzenrat, N., E. Lamoureux, I. Weintrub, E. Alpert, M. Lichter, and L. Alpert.** 1995. *Helicobacter heilmannii*-like spiral bacteria in gastric mucosal biopsies. Prevalence and clinical significance. *Arch Pathol Lab Med* **119**:1149-1153.
64. **International Agency for Research on Cancer.** 1994. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum **61**:1-241.
65. **Kabir, S.** 2004. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. *Helicobacter* **9**:115-123.
66. **Kalach, N., P. H. Benhamou, F. Campeotto, M. Bergeret, C. Dupont, and J. Raymond.** 2001. Clarithromycin resistance and eradication of *Helicobacter pylori* in children. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2134-2135.
67. **Kansau, I., J. Raymond, E. Bingen, P. Courcoux, N. Kalach, M. Bergeret, N. Braimi, C. Dupont, and A. Labigne.** 1996. Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Res Microbiol* **147**:661-669.

68. **Kelly, S. M., M. C. Pitcher, S. M. Farmery, and G. R. Gibson.** 1994. Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *Gastroenterology* **107**:1671-1674.
69. **Kim, K. S., J. O. Kang, C. S. Eun, D. S. Han, and T. Y. Choi.** 2002. Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. *J Korean Med Sci* **17**:599-603.
70. **Kindermann, A., H. Demmelmair, B. Koletzko, S. Krauss-Etschmann, B. Wiebecke, and S. Koletzko.** 2000. Influence of age on ¹³C-urea breath test results in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **30**:85-91.
71. **Kist, M., E. Glocker, and S. Suerbaum.** 2005. Pathogenese, Diagnostik und Therapie der *Helicobacter-pylori*-Infektion. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **48**:669-678.
72. **Klein, P. D., D. Y. Graham, A. Gaillour, A. R. Opekun, and E. O. Smith.** 1991. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. *Lancet* **337**:1503-1506.
73. **Koletzko, S., and A. Feydt-Schmidt.** 2001. Infants differ from teenagers: use of non-invasive tests for detection of *Helicobacter pylori* infection in children. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **13**:1047-1052.
74. **Koletzko, S., N. Konstantopoulos, D. Bosman, A. Feydt-Schmidt, A. van der Ende, N. Kalach, J. Raymond, and H. Rüssmann.** 2003. Evaluation of a novel monoclonal enzyme immunoassay for detection of *Helicobacter pylori* antigen in stool from children. *Gut* **52**:804-806.
75. **Koletzko, S., F. Richy, P. Bontems, J. Crone, N. Kalach, M. L. Monteiro, F. Gottrand, D. Celinska-Cedro, E. Roma-Giannikou, G. Orderda, S. Kolacek, P. Urruzuno, M. J. Martinez-Gomez, T. Casswall, M. Ashorn, H. Bodanszky, and F. Megraud.** 2006. Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. *Gut* **55**:1711-1716.
76. **Kolts, B. E., B. Joseph, S. R. Achem, T. Bianchi, and C. Monteiro.** 1993. *Helicobacter pylori* detection: a quality and cost analysis. *Am J Gastroenterol* **88**:650-655.
77. **Krienitz, W.** 1906. Ueber das Auftreten von Spirochaeten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. *Dtsch Med Wochenschr* **32**:872.
78. **Kuck, D., B. Kolmerer, C. Iking-Konert, P. H. Krammer, W. Stremmel, and J. Rudi.** 2001. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun* **69**:5080-5087.
79. **Kuipers, E. J.** 1999. Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* **13 Suppl 1**:3-11.
80. **Kuipers, E. J., A. S. Pena, G. van Kamp, A. M. Uytterlinde, G. Pals, N. F. Pels, E. Kurz-Pohlmann, and S. G. Meuwissen.** 1993. Seroconversion for *Helicobacter pylori*. *Lancet* **342**:328-331.
81. **Kuipers, E. J., G. I. Perez-Perez, S. G. Meuwissen, and M. J. Blaser.** 1995. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J Natl Cancer Inst* **87**:1777-1780.
82. **Kuipers, E. J., J. C. Thijs, and H. P. Festen.** 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther* **9 Suppl 2**:59-69.
83. **Kusters, J. G., A. H. van Vliet, and E. J. Kuipers.** 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* **19**:449-490.
84. **Labenz, J., U. Peitz, H. Kohl, J. Kaiser, P. Malfertheiner, A. Hackelsberger, and G. Borsch.** 1999. *Helicobacter pylori* increases the risk of peptic ulcer bleeding: a case-control study. *Ital J Gastroenterol Hepatol* **31**:110-115.
85. **Laheij, R. J., W. A. de Boer, J. B. Jansen, H. J. van Lier, P. M. Sneeberger, and A. L. Verbeek.** 2000. Diagnostic performance of biopsy-based methods for determination

- of *Helicobacter pylori* infection without a reference standard. J Clin Epidemiol **53**:742-746.
86. **Laheij, R. J., H. Straatman, J. B. Jansen, and A. L. Verbeek.** 1998. Evaluation of commercially available *Helicobacter pylori* serology kits: a review. J Clin Microbiol **36**:2803-2809.
87. **Lascols, C., D. Lamarque, J. M. Costa, C. Copie-Bergman, J. M. Le Glaunec, L. Deforges, C. J. Soussy, J. C. Petit, J. C. Delchier, and J. Tankovic.** 2003. Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. J Clin Microbiol **41**:4573-4577.
88. **Leunk, R. D., P. T. Johnson, B. C. David, W. G. Kraft, and D. R. Morgan.** 1988. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. J Med Microbiol **26**:93-99.
89. **MacOni, G., L. Vago, G. Galletta, V. Imbesi, O. Sangaletti, F. Parente, C. Cucino, S. Bonetto, and G. Bianchi Porro.** 1999. Is routine histological evaluation an accurate test for *Helicobacter pylori* infection? Aliment Pharmacol Ther **13**:327-331.
90. **Mai, U. E., G. I. Perez-Perez, J. B. Allen, S. M. Wahl, M. J. Blaser, and P. D. Smith.** 1992. Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. J Exp Med **175**:517-525.
91. **Makristathis, A., W. Barousch, E. Pasching, C. Binder, C. Kuderna, P. Apfalter, M. L. Rotter, and A. M. Hirschl.** 2000. Two enzyme immunoassays and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens from pediatric patients before and after eradication therapy. J Clin Microbiol **38**:3710-3714.
92. **Malaty, H. M., L. Engstrand, N. L. Pedersen, and D. Y. Graham.** 1994. *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. Ann Intern Med **120**:982-986.
93. **Malaty, H. M., and D. Y. Graham.** 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. Gut **35**:742-745.
94. **Malfertheiner, P., F. Megraud, C. O'Morain, F. Bazzoli, E. El-Omar, D. Graham, R. Hunt, T. Rokkas, N. Vakil, and E. J. Kuipers.** 2007. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut **56**:772-781.
95. **Malfertheiner, P., F. Megraud, C. O'Morain, A. P. Hungin, R. Jones, A. Axon, D. Y. Graham, and G. Tytgat.** 2002. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht 2-2000 Consensus Report. Aliment Pharmacol Ther **16**:167-180.
96. **Marshall, B. J., and C. S. Goodwin.** 1987. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. Int J Syst Bacteriol **37**:68.
97. **Marshall, B. J., and J. R. Warren.** 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet **1**:1311-1315.
98. **Megraud, F.** 2004. Basis for the management of drug-resistant *Helicobacter pylori* infection. Drugs **64**:1893-1904.
99. **Megraud, F.** 2004. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Gut **53**:1374-1384.
100. **Megraud, F., and P. Lehours.** 2007. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev **20**:280-322.
101. **Megraud, F., V. Neman-Simha, and D. Brugmann.** 1992. Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by *Helicobacter pylori* urease on human epithelial cells. Infect Immun **60**:1858-1863.
102. **Menard, A., A. Santos, F. Megraud, and M. Oleastro.** 2002. PCR-restriction fragment length polymorphism can also detect point mutation A2142C in the 23S rRNA gene, as-

- sociated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin. Antimicrob Agents Chemother **46**:1156-1157.
103. **Mendall, M. A., P. M. Goggin, N. Molineaux, J. Levy, T. Toosy, D. Strachan, and T. C. Northfield.** 1992. Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. Lancet **339**:896-897.
104. **Mitchell, H. M., Y. Y. Li, P. J. Hu, Q. Liu, M. Chen, G. G. Du, Z. J. Wang, A. Lee, and S. L. Hazell.** 1992. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China: identification of early childhood as the critical period for acquisition. J Infect Dis **166**:149-153.
105. **Mobley, H. L., M. J. Cortesia, L. E. Rosenthal, and B. D. Jones.** 1988. Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol **26**:831-836.
106. **Monteiro, L., D. Bonnemaïson, A. Vekris, K. G. Petry, J. Bonnet, R. Vidal, J. Cabrita, and F. Megraud.** 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. J Clin Microbiol **35**:995-998.
107. **Monteiro, L., N. Gras, R. Vidal, J. Cabrita, and F. Megraud.** 2001. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. J Microbiol Methods **45**:89-94.
108. **O'Toole, P. W., M. C. Lane, and S. Porwollik.** 2000. *Helicobacter pylori* motility. Microbes Infect **2**:1207-1214.
109. **Occhialini, A., M. Urdaci, F. Doucet-Populaire, C. M. Bebear, H. Lamouliatte, and F. Megraud.** 1997. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. Antimicrob Agents Chemother **41**:2724-2728.
110. **Odenbreit, S., J. Puls, B. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer, and R. Haas.** 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science **287**:1497-1500.
111. **Oleastro, M., A. Menard, A. Santos, H. Lamouliatte, L. Monteiro, P. Barthelemy, and F. Megraud.** 2003. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol **41**:397-402.
112. **Parsonnet, J., S. Hansen, L. Rodriguez, A. B. Gelb, R. A. Warnke, E. Jellum, N. Orentreich, J. H. Vogelmann, and G. D. Friedman.** 1994. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N Engl J Med **330**:1267-1271.
113. **Parsonnet, J., H. Shmueli, and T. Haggerty.** 1999. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. JAMA **282**:2240-2245.
114. **Peek, R. M., Jr., G. G. Miller, K. T. Tham, G. I. Perez-Perez, T. L. Cover, J. C. Atherton, G. D. Dunn, and M. J. Blaser.** 1995. Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. J Clin Microbiol **33**:28-32.
115. **Perez Aldana, L., M. Kato, S. Nakagawa, M. Kawarasaki, T. Nagasako, T. Mizushima, H. Oda, J. Kodaira, Y. Shimizu, Y. Komatsu, R. Zheng, H. Takeda, T. Sugiyama, and M. Asaka.** 2002. The relationship between consumption of antimicrobial agents and the prevalence of primary *Helicobacter pylori* resistance. Helicobacter **7**:306-309.
116. **Perri, F., G. Manes, M. Neri, D. Vaira, and G. Nardone.** 2002. *Helicobacter pylori* antigen stool test and ¹³C-urea breath test in patients after eradication treatments. Am J Gastroenterol **97**:2756-2762.
117. **Pounder, R. E., and D. Ng.** 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. Aliment Pharmacol Ther **9 Suppl 2**:33-39.
118. **Rimbara, E., N. Noguchi, T. Yamaguchi, K. Narui, T. Kawai, and M. Sasatsu.** 2005. Development of a highly sensitive method for detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from human feces. Curr Microbiol **51**:1-5.
119. **Roosendaal, R., E. J. Kuipers, J. Buitenwerf, C. van Uffelen, S. G. Meuwissen, G. J. van Kamp, and C. M. Vandenbroucke-Grauls.** 1997. *Helicobacter pylori* and the

- birth cohort effect: evidence of a continuous decrease of infection rates in childhood. *Am J Gastroenterol* **92**:1480-1482.
120. **Rothenbacher, D., and H. Brenner.** 2003. Burden of *Helicobacter pylori* and *H. pylori*-related diseases in developed countries: recent developments and future implications. *Microbes Infect* **5**:693-703.
121. **Rothenbacher, D., J. Inceoglu, G. Bode, and H. Brenner.** 2000. Acquisition of *Helicobacter pylori* infection in a high-risk population occurs within the first 2 years of life. *J Pediatr* **136**:744-748.
122. **Rothenbacher, D., M. Winkler, T. Gonser, G. Adler, and H. Brenner.** 2002. Role of infected parents in transmission of *Helicobacter pylori* to their children. *Pediatr Infect Dis J* **21**:674-679.
123. **Rupnow, M. F., R. D. Shachter, D. K. Owens, and J. Parsonnet.** 2000. A dynamic transmission model for predicting trends in *Helicobacter pylori* and associated diseases in the United States. *Emerg Infect Dis* **6**:228-237.
124. **Rüssmann, H., K. Adler, R. Haas, B. Gebert, S. Koletzko, and J. Heesemann.** 2001. Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured *Helicobacter pylori* by fluorescent in situ hybridization. *J Clin Microbiol* **39**:4142-4144.
125. **Rüssmann, H., V. A. Kempf, S. Koletzko, J. Heesemann, and I. B. Autenrieth.** 2001. Comparison of fluorescent in situ hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* **39**:304-308.
126. **Schabereiter-Gurtner, C., A. M. Hirschl, B. Dragosics, P. Hufnagl, S. Puz, Z. Kovach, M. Rotter, and A. Makristathis.** 2004. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *J Clin Microbiol* **42**:4512-4518.
127. **Schreiber, S., M. Konradt, C. Groll, P. Scheid, G. Hanauer, H. O. Werling, C. Josenhans, and S. Suerbaum.** 2004. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:5024-5029.
128. **Schultze, V., A. Hackelsberger, T. Gunther, S. Miehke, A. Roessner, and P. Malfertheiner.** 1998. Differing patterns of *Helicobacter pylori* gastritis in patients with duodenal, prepyloric, and gastric ulcer disease. *Scand J Gastroenterol* **33**:137-142.
129. **Segal, E. D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1999. Altered states: involvement of phosphorylated *CagA* in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:14559-14564.
130. **Seyler, R. W., Jr., J. W. Olson, and R. J. Maier.** 2001. Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization. *Infect Immun* **69**:4034-4040.
131. **Sicinschi, L. A., P. Correa, L. E. Bravo, and B. G. Schneider.** 2003. Detection and typing of *Helicobacter pylori cagA/vacA* genes by radioactive, one-step polymerase chain reaction in stool samples from children. *J Microbiol Methods* **52**:197-207.
132. **Sipponen, P.** 1997. *Helicobacter pylori* gastritis--epidemiology. *J Gastroenterol* **32**:273-277.
133. **Sipponen, P., K. Varis, O. Fraki, U. M. Korri, K. Seppala, and M. Siurala.** 1990. Cumulative 10-year risk of symptomatic duodenal and gastric ulcer in patients with or without chronic gastritis. A clinical follow-up study of 454 outpatients. *Scand J Gastroenterol* **25**:966-973.
134. **Sobala, G. M., J. E. Crabtree, M. F. Dixon, C. J. Schorah, J. D. Taylor, B. J. Rathbone, R. V. Heatley, and A. T. Axon.** 1991. Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut* **32**:1415-1418.
135. **Solnick, J. V., and D. B. Schauer.** 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev* **14**:59-97.

136. **Steer, H. W., and D. G. Colin-Jones.** 1975. Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium. *Gut* **16**:590-597.
137. **Stolte, M., E. Wellens, B. Bethke, M. Ritter, and H. Eidt.** 1994. *Helicobacter heilmannii* (formerly *Gastrospirillum hominis*) gastritis: an infection transmitted by animals? *Scand J Gastroenterol* **29**:1061-1064.
138. **Stone, G. G., D. Shortridge, R. K. Flamm, J. Versalovic, J. Beyer, K. Idler, L. Zulawinski, and S. K. Tanaka.** 1996. Identification of a 23S rRNA gene mutation in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **1**:227-228.
139. **Suerbaum, S., and P. Michetti.** 2002. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* **347**:1175-1186.
140. **Suerbaum, S., J. M. Smith, K. Bapumia, G. Morelli, N. H. Smith, E. Kunstmann, I. Dyrek, and M. Achtman.** 1998. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:12619-12624.
141. **Suzuki, M., S. Miura, M. Suematsu, D. Fukumura, I. Kurose, H. Suzuki, A. Kai, Y. Kudoh, M. Ohashi, and M. Tsuchiya.** 1992. *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. *Am J Physiol* **263**:G719-725.
142. **Taneike, I., S. Goshi, Y. Tamura, N. Wakisaka-Saito, N. Matsumori, A. Yanase, T. Shimizu, Y. Yamashiro, S. Toyoda, and T. Yamamoto.** 2002. Emergence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* (CRHP) with a high prevalence in children compared with their parents. *Helicobacter* **7**:297-305.
143. **Taylor, D. E., Z. Ge, D. Purych, T. Lo, and K. Hiratsuka.** 1997. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2621-2628.
144. **The EUROGAST Study Group.** 1993. Epidemiology of, and risk factors for, *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. *Gut* **34**:1672-1676.
145. **Thomas, J. E., G. R. Gibson, M. K. Darboe, A. Dale, and L. T. Weaver.** 1992. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* **340**:1194-1195.
146. **Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Wathley, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, and J. C. Venter.** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539-547.
147. **Trebesius, K., K. Panthel, S. Strobel, K. Vogt, G. Faller, T. Kirchner, M. Kist, J. Heesemann, and R. Haas.** 2000. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. *Gut* **46**:608-614.
148. **van Doorn, L. J., Y. J. Debets-Ossenkopp, A. Marais, R. Sanna, F. Megraud, J. G. Kusters, and W. G. Quint.** 1999. Rapid detection, by PCR and reverse hybridization, of mutations in the *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene, associated with macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1779-1782.
149. **Varoli, O., M. P. Landini, M. LaPlaca, A. Tucci, R. Corinaldesi, G. F. Paparo, V. Stanghellini, and L. Barbara.** 1991. Presence of *Helicobacter pylori* in gastric juice. *Am J Gastroenterol* **86**:249.
150. **Versalovic, J., D. Shortridge, K. Kibler, M. V. Griffy, J. Beyer, R. K. Flamm, S. K. Tanaka, D. Y. Graham, and M. F. Go.** 1996. Mutations in 23S rRNA are associated

- with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother **40**:477-480.
151. **Warren, J. R., and B. J. Marshall.** 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet **1**:1273-1275.
152. **Weingart, V., H. Rüssmann, S. Koletzko, J. Weingart, W. Hochter, and M. Sackmann.** 2004. Sensitivity of a novel stool antigen test for detection of *Helicobacter pylori* in adult outpatients before and after eradication therapy. J Clin Microbiol **42**:1319-1321.
153. **Wolle, K., A. Leodolter, P. Malfertheiner, and W. König.** 2002. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in Germany: stable primary resistance from 1995 to 2000. J Med Microbiol **51**:705-9.
154. **Wu, M. S., J. T. Wang, J. C. Yang, H. H. Wang, J. C. Sheu, D. S. Chen, and T. H. Wang.** 1996. Effective reduction of *Helicobacter pylori* infection after upper gastrointestinal endoscopy by mechanical washing of the endoscope. Hepatogastroenterology **43**:1660-1664.
155. **Xia, H. H., and N. J. Talley.** 1997. Natural acquisition and spontaneous elimination of *Helicobacter pylori* infection: clinical implications. Am J Gastroenterol **92**:1780-1787.

IX Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

¹³ C	schweres Kohlenstoffisotop
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AE, AL, ASL, AW1, AW2	Probenpuffer des <i>QIAamp DNA Stool Mini Kit</i>
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften e.V.
C	Cytosin
<i>cagA</i>	<i>cytotoxin-associated gene A</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy5	Cyanin-5
d	Differenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
E-Test	Epsilonometer-Test
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> ; und andere
F	Fluoreszenz
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanin
gr.	Griechisch
Konz.	Konzentration
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IL-8	Interleukin-8
Inf.	Infektion
lat.	Lateinisch
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MHK	Minimale Hemmkonzentration
NaCl	Natriumchlorid
NCG	Kein Kulturwachstum
ND	nicht durchgeführt
neg.	negativ
NPW	negativ prädiktiver Wert
NRZ	Nationales Referenzzentrum

O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte, Extinktion
PBP	Penicillin-bindende Proteine
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	<i>potential Hydrogenii</i> ; Potenz der Wasserstoffionen
pos.	positiv
PPI	Protonenpumpen-Inhibitor
PPW	positiv prädiktiver Wert
resist.	resistent
<i>rdxA</i>	<i>oxigen-insensitive nitroreductase</i>
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
sens.	sensitiv
spp.	Spezies
T	Thymin
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
<i>vacA</i>	<i>vacouating cytotoxin A</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

Einheiten

bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
M	Molare Masse
min	Minute
s	Sekunde
U	Unit

2 Sequenz der 23S rRNA von *Helicobacter pylori*

In Abb. 7 ist die Sequenz der 23S rRNA des *Helicobacter pylori*-Stamms 26695 abgebildet (Genbank Accession Nummer. NC 000915; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Farblich markiert sind die häufigsten Clarithromycin-Mutationen (A2142C/G, A2143G und T2171C) und die im *Helicobacter pylori* ClariRes assay verwendeten Primer.

1	taaggcagtg	gtagcgctga	agaatattcg	tgcaattgtc	gttattcatt	ataaaaaggg
61	cgggttttaa	aggatatttt	aaaattttaa	acaagctttt	aagagcagat	ggcggatgcc
121	ttgccaaga	gaggcgatga	aggacgtact	agactgcgat	aagctatgcy	gagctgtcaa
181	ggagctttga	tgcgtagatg	tccgaatggg	gcaacccaac	taatatagat	attagttact
241	ctttaataga	gagcgaacct	agtgaagtga	aacatctcag	taactagagg	aaaagaaatc
301	aacgagattc	cctaagtagt	ggcgcgcaaa	cggggaaaag	ggcaaaccga	gtgcttgcac
361	tgggggttga	ggactgcaac	atccaagaga	acgcttttagc	agagttacct	ggaaaggtaa
421	gccatagaaa	gtgatagctc	tgtatgcgac	aaggcgttct	taggtagcag	tatccagagt
481	aggccaagac	acgagaaatc	caggttgaag	cggggagagc	cactctccaa	aacctaaatc
541	tactctttga	gcgatagcga	acaagtaccg	tgagggaag	gtgaaagaa	ccgcagtgag
601	cggagtgaaa	tagaacctga	aacctctgcy	ttacaatcat	tcagagccct	atgatttatc
661	agggtgatgg	actgcctttt	gcataatgat	cctgcgagtt	gtggtatctg	gcaaggttaa
721	gcgaatgcga	agccgtagcg	aaagcgagtc	ttaatagggc	gaacaagtca	gatgctgcag
781	acccgaagct	aagtgatcta	tccatggcca	agttgaaacg	cgtgtaatat	cgctggagg
841	actgaaactg	taccatttga	aacgggttgg	gatgagctgt	ggataggggt	gaaaggccaa
901	acaaacttag	tgatagctgg	ttctcttcca	aatatattta	ggtagctgcy	caagtataca
961	taaaaggggg	tagagccctg	attgggctag	ggctgctcgc	cgcggtacca	aacctatca
1021	aacttcgaat	accttttatc	gtatcttggg	agtcaggcgg	tgggtgataa	aatcaatcgt
1081	caaaagggga	acaaccaga	ctaccaata	aggtccctaa	gttctattct	gagtggaata
1141	agatgtgtgg	ctactcaaac	aaccaggagg	ttggcttaga	agcagccatc	ctttaagaa
1201	agcgtaacag	ctcactggtc	tagtggctcat	gcgctgaaaa	tataacgggg	ctaagataga
1261	caccgaattt	gtagattgtg	ttaaaccacg	tggtagaaga	gcgttcatac	cagcgttgaa
1321	ggtataccgg	taaggagtgc	tggagcggta	tgaagtgagc	atgcaaggaat	gagtaacgat
1381	aagatatatg	agaattgtat	ccgcccgtaa	tctaaggttt	cctacgcgat	ggtcgtcatc
1441	gtagggttag	tggggtccta	agccgagtc	gaaaggggta	ggtagggcca	aattgggtta
1501	tattccaata	ccgactgtgg	agcgtgatgg	ggggacgcat	aggggttaagc	gagctagctg
1561	atggaagcgc	tagtctaagg	gcgtagattg	gagggaaaggc	aaatccacct	ctgtatttga
1621	aacccaaaca	ggctctttga	gtccttttag	gacaaagggga	gaatcgctga	taccgctcgt
1681	caagaagaa	tctctaagca	tatccatagt	cgctccgtacc	gcaaaccgac	acaaggtatg
1741	gagatgagta	ttctaaggcg	cgtgaaagaa	ctctgggtta	ggaactctgc	aaactagcac
1801	cgtaagtctg	cgataaggtg	tgccacagcg	atgtggtctc	agcaaagagt	ccctcccagc
1861	tgtttaccaa	aaacacagca	ctttgccaac	tcgtaagagg	aagataaagg	tgtgacgcct
1921	gcccgggtgc	cgaagggtta	gaggatgcgt	cagtcgcaag	atgaaagcgt	gaattgaaagc
1981	ccgagtaaac	ggcggccgta	actataacgg	tcctaaggta	gcaaaattcc	ttgtcgggta
2041	aataccgacc	tgcattgaatg	gcgtaacgag	atgggagctg	tctcaaccag	agattcagtg
2101	aaattgtagt	ggaggtgaaa	attcctccta	cccgcggcga	gacggtaaga	ccccgtggac
2161	ctttactaca	acttagcact	gctaattgga	atatcatgcy	caggataggt	gggaggcttt
2221	gaagtaaggg	ctttggctct	tatggagcca	tccttgagat	accacccttg	atgtttctgt
2281	tagctaactg	gcctgtgtta	tccacaggca	ggacaatgct	tggtaggtg	tttgactggg
2341	gcggtcgcct	cctaaaaagt	aacggaggct	tgcaaaagggt	ggctcattgc	ggtaggaaat
2401	cgcaagttga	gtgtaatggc	acaagccagc	ctgactgtaa	gacatacaag	tcaagcagag
2461	acgaaagtgc	gtcatagtga	tccgggtggt	ctgtgtggaa	gggccatcgc	tcaaaggata
2521	aaaggatccc	cggggataaac	aggctgatct	cccccaagag	ctcacatcga	cggggagggt
2581	tggcacctcg	atgtcggctc	atcgcaccc	ggggctggag	caggtcccaa	gggtatggct
2641	gttcgcatc	taaagcggta	cgcgagctgg	gttcagaacg	tcgtgagaca	gttcgggtcc
2701	tatctgcctg	ggcgcgtagga	aagttgagga	gagctgtccc	tagtacgaga	ggaccgggat
2761	ggacgtgtca	ctgggtgcacc	agttgttctg	ccaagagcat	cgctgggtg	ctacacacgg
2821	atgtgataac	tgtgaaagc	atctaagcag	gaagccaact	ccaagatgaa	ctttccctga
2881	agctcgca	aagactatgt	gcttgatagg	gtagatgtgt	gagcgcagta	atgcgttag
2941	ctgactacta	ctaataagagc	gtttggcttg	ttttt		

Mutationen assoziiert mit Clarithromycin-Resistenz:
A2142C; A2142G; A2143G

Oligonukleotidprimer und -Sonde der verwendeten Real-Time PCR:
23S-F (2069–2090); 23S-R (2187–2205); 23S-S (2139–2156)

Abb. 7: Sequenz der 23S rRNA von *Helicobacter pylori*

3 Ausführliche Patientenliste

Patienten-Nr.	Patientenalter (Jahre)	<i>H. pylori</i> -Infektionsstatus	Histologie	¹³ C-Harnstoff-Atemtest	Deltawert (%) (¹³ C-Harnstoff-Atemtest)	Kultur	E-Test	MHK Clarithromycin (E-Test)	Stuhl-EIA	OD-Werte (Stuhl-EIA)	Real-Time PCR	Mutationsanalyse (Real-Time PCR)
1	11,5	neg.	neg.	neg.	0,3	neg.			neg.	0,020	neg.	
2	10,4	pos.	pos.	pos.	29	pos.	Resist.	4	pos.	3,469	pos.	Resist. A2142/3G
3	12,8	neg.	neg.	neg.	1,1	neg.			neg.	0,030	neg.	
4	3,6	pos.	pos.	pos.	76	pos.	sens.	0,016	pos.	3,524	neg.	
5	9,0	pos.	pos.	pos.	32,5	pos.	sens.	<0,016	pos.	3,452	pos.	Wildtyp
6	12,0	pos.	pos.	pos.	26,9	pos.	sens.	0,016	pos.	3,450	neg.	
7	3,4	neg.	neg.	neg.	0,3	ND			neg.	0,040	neg.	
8	15,1	pos.	pos.	pos.	16,2	pos.	sens.	<0,016	pos.	1,806	pos.	Wildtyp
9	7,6	pos.	pos.	pos.	71,4	pos.	sens.	0,016	pos.	3,487	pos.	Wildtyp
10	15,5	neg.	neg.	neg.	0,3	ND			neg.	0,038	neg.	
11	14,0	pos.	pos.	pos.	27,8	pos.	sens.	0,016	pos.	3,379	neg.	
12	11,6	pos.	pos.	pos.	17,8	pos.	Resist.	>256	pos.	2,300	neg.	
13	12,6	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,025	neg.	
14	4,4	neg.	neg.	neg.	1	ND			neg.	0,025	neg.	
15	13,1	neg.	neg.	neg.	0,1	ND			neg.	0,022	neg.	
16	11,1	pos.	pos.	pos.	18,6	pos.	sens.	<0,016	pos.	3,489	pos.	Wildtyp
17	12,0	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,019	neg.	
18	7,9	pos.	pos.	pos.	25,8	pos.	sens.	0,016	pos.	3,470	pos.	Wildtyp
19	1,6	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,029	neg.	
20	10,9	pos.	pos.	pos.	13,1	pos.	sens.	<0,016	pos.	3,486	pos.	Wildtyp
21	2,4	neg.	neg.	neg.	1,4	neg.			neg.	0,019	neg.	
22	14,3	pos.	pos.	pos.	15,6	pos.	sens.	<0,016	neg.	0,131	neg.	
23	3,2	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,018	neg.	
24	4,2	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,019	neg.	
25	2,9	neg.	neg.	ND		ND			neg.	0,020	neg.	
26	11,2	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,020	neg.	
27	15,2	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,023	neg.	
28	0,3	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,015	neg.	
29	12,3	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,029	neg.	
30	2,6	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,035	neg.	
31	9,1	pos.	pos.	pos.	25,6	pos.	sens.	0,016	pos.	2,995	pos.	Wildtyp
32	15,8	pos.	pos.	pos.	11,6	pos.	sens.	<0,016	pos.	0,393	pos.	Wildtyp
33	4,2	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,033	neg.	
34	6,7	pos.	pos.	pos.	41,6	pos.	sens.	0,016	pos.	3,232	neg.	
35	0,8	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,039	neg.	

Patienten-Nr.	Patientenalter (Jahre)	<i>H. pylori</i> -Infektionsstatus	Histologie	¹³ C-Harnstoff-Atemtest	Deltawert (%) (¹³ C-Harnstoff-Atemtest)	Kultur	E-Test	MHK Clarithromycin (E-Test)	Stuhl-EIA	OD-Werte (Stuhl-EIA)	Real-Time PCR	Mutationsanalyse (Real-Time PCR)
36	13,7	pos.	pos.	pos.	26,4	pos.	Resist.	>256	neg.	0,038	neg.	
37	0,5	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,031	neg.	
38	15,2	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,027	neg.	
39	10,2	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,037	neg.	
40	5,0	neg.	neg.	neg.	0,9	ND			neg.	0,030	neg.	
41	9,1	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,070	neg.	
42	17,1	neg.	neg.	neg.	0,3	neg.			neg.	0,038	neg.	
43	17,0	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,036	neg.	
44	6,4	pos.	pos.	ND		pos.	sens.	<0,016	pos.	3,034	pos.	Wildtyp
45	5,3	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,030	neg.	
46	4,6	pos.	pos.	pos.	37,9	pos.	sens.	<0,016	pos.	3,525	pos.	Wildtyp
47	9,4	pos.	pos.	pos.	90,3	pos.	Resist.	32	pos.	3,620	pos.	Resist. A2142/3G
48	0,4	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,033	neg.	
49	5,7	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,030	neg.	
50	14,2	pos.	pos.	pos.	19,4	pos.	sens.	0,016	pos.	3,543	neg.	
51	8,2	pos.	pos.	ND		pos.	sens.	<0,016	pos.	2,684	pos.	Wildtyp
52	11,7	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,043	neg.	
53	7,5	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,049	neg.	
54	12,4	pos.	pos.	pos.	11,3	pos.	sens.	0,016	pos.	3,660	neg.	
55	6,2	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,037	neg.	
56	8,1	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,034	neg.	
57	6,0	pos.	pos.	pos.	8,5	neg.			pos.	3,487	neg.	
58	10,1	pos.	pos.	pos.	29,4	pos.	sens.	<0,016	pos.	3,602	pos.	Wildtyp
59	15,0	pos.	pos.	pos.	9,8	pos.	sens.	0,016	pos.	3,620	neg.	
60	14,5	pos.	pos.	pos.	13,6	pos.	sens.	0,5	pos.	3,559	neg.	
61	2,8	neg.	neg.	ND		ND			neg.	0,036	neg.	
62	15,1	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,041	neg.	
63	1,5	neg.	neg.	ND		ND			neg.	0,039	neg.	
64	16,3	pos.	pos.	pos.	13,9	pos.	sens.	<0,016	pos.	0,649	neg.	
65	5,8	pos.	pos.	pos.	21,2	pos.	sens.	0,032	pos.	3,356	pos.	Wildtyp
66	14,1	pos.	pos.	ND		pos.	sens.	<0,016	pos.	0,615	pos.	Wildtyp
67	9,7	pos.	pos.	ND		pos.	Resist.	>256	pos.	3,367	pos.	Resist. A2142/3G
68	10,2	neg.	neg.	neg.	0,5	neg.			neg.	0,028	neg.	
69	13,3	neg.	neg.	neg.	1,4	neg.			neg.	0,022	neg.	
70	5,1	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,023	neg.	
71	14,9	pos.	pos.	ND		pos.	sens.	<0,016	pos.	3,435	pos.	Wildtyp
72	2,8	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,035	neg.	
73	12,2	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,051	neg.	

Patienten-Nr.	Patientenalter (Jahre)	<i>H. pylori</i> -Infektionsstatus	Histologie	¹³ C-Harnstoff-Atemtest	Deltawert (%) (¹³ C-Harnstoff-Atemtest)	Kultur	E-Test	MHK Clarithromycin (E-Test)	Stuhl-EIA	OD-Werte (Stuhl-EIA)	Real-Time PCR	Mutationsanalyse (Real-Time PCR)
74	9,8	pos.	pos.	pos.	36,2	pos.	sens.	<0,016	pos.	3,389	neg.	
75	12,8	pos.	pos.	pos.	16,1	pos.	sens.	<0,016	pos.	3,268	neg.	
76	12,5	pos.	pos.	pos.	33	pos.	sens.	<0,016	pos.	3,365	pos.	Wildtyp
77	16,4	neg.	neg.	neg.	-0,1	neg.			neg.	0,030	neg.	
78	7,1	neg.	neg.	ND		ND			neg.	0,024	neg.	
79	11,6	pos.	pos.	pos.	23	pos.	sens.	<0,016	pos.	1,820	pos.	Wildtyp
80	4,7	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,023	neg.	
81	18,3	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,029	neg.	
82	2,3	neg.	neg.	ND		ND			neg.	0,037	neg.	
83	12,3	neg.	neg.	neg.	2	neg.			neg.	0,039	neg.	
84	6,7	pos.	pos.	pos.	28,7	pos.	sens.	<0,016	pos.	3,385	neg.	
85	15,9	pos.	pos.	pos.	39,2	pos.	sens.	0,032	pos.	2,971	pos.	Wildtyp
86	13,1	pos.	pos.	pos.	13,8	pos.	Resist.	>256	pos.	2,483	pos.	Resist. A2142/3G
87	5,2	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,039	neg.	
88	12,2	pos.	pos.	pos.	25,3	pos.	sens.	0,016	pos.	3,191	neg.	
89	3,3	neg.	neg.	ND		neg.			neg.	0,040	neg.	
90	15,1	neg.	neg.	neg.	1,3	ND			neg.	0,040	neg.	
91	7,2	neg.	neg.	ND		ND			neg.	0,035	neg.	
92	3,8	pos.	pos.	pos.	19,9	pos.	sens.	<0,016	pos.	3,057	pos.	Wildtyp
93	6,6	pos.	pos.	pos.	79	pos.	sens.	<0,016	pos.	2,431	pos.	Wildtyp
94	10,7	neg.	neg.	neg.	0,4	neg.			neg.	0,037	neg.	
95	14,2	pos.	pos.	pos.	19,4	pos.	sens.	0,016	pos.	3,257	pos.	Wildtyp
96	11,2	neg.	neg.	ND		ND			neg.	0,034	neg.	
97	8,5	pos.	pos.	pos.	21,2	pos.	sens.	<0,016	pos.	2,922	neg.	
98	16,3	pos.	pos.	pos.	22,7	pos.	sens.	0,016	pos.	1,532	pos.	Wildtyp
99	8,0	pos.	pos.	pos.	19,5	pos.	sens.	<0,016	pos.	2,830	pos.	Wildtyp
100	7,6	pos.	pos.	pos.	71,4	pos.	sens.	0,016	pos.	3,549	pos.	Wildtyp

X Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Rüssmann für ein spannendes und interessantes Doktorarbeitsthema, eine exzellente fachliche Beratung, Diskussionsbereitschaft, kreative Vorschläge sowie seine Unterstützung über die Betreuung der Doktorarbeit hinaus.

Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann danke ich für die Möglichkeit zur Promotion am Max von Pettenkofer-Institut. Insbesondere möchte ich ihm für seine Vermittlung an Prof. Dr. Rüssmann während meiner Themensuche danken.

Prof. Dr. Sibylle Koletzko und ihren Mitarbeitern möchte ich besonders für die freundliche Kooperation und die Bereitstellung der Patientenproben danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Dr. Klaus Panthel danke ich für seine vielen Ideen, konstruktive Kritik und Expertise auf dem Gebiet der *Helicobacter pylori*-Diagnostik.

Gudrun Pfaffinger danke ich sehr für Ihre enorme Hilfe, viel positive Energie und die sorgfältige methodische Einarbeitung in die Mysterien der Laborarbeit.

Auch meinen Laborkollegen Victoria Sevil, Katrin Meinel, Brigitte Köhn und Stefan Jellbauer möchte ich für ihre guten Ratschläge, aufbauende Gespräche und eine gesellige Laboratmosphäre danken.

Besonderer Dank gebührt meinen Eltern, auf deren Motivation und Unterstützung ich jederzeit zählen kann, und die mir dieses spannende Studium und damit diese Doktorarbeit ermöglicht haben.

Last but not least danke ich meiner großartigen Freundin Stefanie für ihre Unterstützung!

XI Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christian Lottspeich
Geburtsdatum	06.10.1982 in München
Adresse	Steinheilstr. 9; D-80333 München

Schulbildung

1989 – 1993	Grundschule Neuried
1993 – 2002	Feodor-Lynen-Gymnasium Planegg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Endnote: 1,5)
1999 – 2000	Halbjähriger Schulaufenthalt an einer amerikanischen High School in Bergen, New York State (USA)

Akademische Ausbildung

10/2005 – 05/2010	Studium der Humanmedizin an der LMU München
08/2007	1. Staatsexamen
05/2010	2. Staatsexamen; Endnote 1,67

Praktisches Jahr (12/2008 – 12/2009)

1. Terial (Innere Medizin)	Medizinische Poliklinik, München (8 Wochen) St. Michael's Hospital, Toronto, Kanada (8 Wochen)
2. Terial (Neurologie)	Friedrich-Baur-Institut, München (8 Wochen) Queen Square Institute of Neurology, London, UK (8 Wochen)
3. Terial (Chirurgie)	Universitätsspital Zürich, Schweiz (16 Wochen)

Beruf

seit 06/2010	Assistenzarzt der Medizinischen Klinik und Poliklinik Innenstadt, Klinikum der Universität München (Direktor: Prof. Dr. M. Reincke)
--------------	---

Weitere Tätigkeiten

1990 – 1996	Sänger im Tölzer Knabenchor mit Gesangsausbildung zum Solisten
1998 – 2009	Gruppenleiterausbildung der evangelischen Jugend Fürstentfeldbruck; in dieser Zeit aktiv als Gruppen- und Freizeitleiter tätig
2000 – 2006	Kirchenvorsteher der evangelischen Kirchengemeinde Stockdorf
2002 – 2003	Zivildienst in der hepatologischen Ambulanz (bei Prof. Dr. Zachoval) der Med. Poliklinik II am Klinikum Großhadern, LMU München
2006 – 2009	Nachtdienstbetreuer (6 Nachdienste/Monat) in der Dynamisch-Psychiatrischen Klinik Meterschwaige (München)

Hobbies

Sport (Basketball, Tennis, Badminton und Squash),
Gitarre, Reparieren/Fahren meines VW Käfers,
Offroad-Reisen in Wüstengebiete (Nord-Sahara, Syrien/Jordanien)