



Fakultät für Medizin

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene

der Technischen Universität München

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Busch)

Validierung eines neuen Immuno-Line-blots zur Detektion der *Helicobacter pylori* Infektion

Laura Kim Anh Romberg

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin

der Technischen Universität München

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. Gerhard

2. Priv.-Doz. Dr. B. W. Neu

Die Dissertation wurde am 18.09.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.05.2014 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Formelverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.1.1 Epidemiologie	3
1.1.2 Systematik und Morphologie	5
1.1.3 Pathogenese	6
1.1.4 Virulenzfaktoren	9
1.1.5 Immunreaktion auf <i>H. pylori</i>	14
1.1.6 Diagnostik	15
1.1.6.1 Invasive Diagnostik	16
1.1.6.2 Nicht-invasive Diagnostik	18
1.1.7 Therapie und Antibiotikaresistenzen	21
1.2 Ziele und Fragestellung dieser Arbeit	24
2 Material	26
2.1 Bakterien	26
2.2 Oligonukleotide	26
2.3 Chemikalien und Kits	28
2.4 Lösungen, Puffer und Nährmedien	28
2.5 Hilfsmittel	29
2.6 Geräte	30
2.7 Software und Datenbank	30

3	Methoden	31
3.1	Erstellung des Patientenkollektivs.....	31
3.1.1	Studienteilnehmer	31
3.1.2	Gewinnung und Lagerung der Magenbiopsien.....	32
3.1.3	Bestimmung des <i>H. pylori</i> Infektionsstatus.....	33
3.1.3.1	Histologie	33
3.1.3.2	Kultur	34
3.1.4	Serologie	34
3.1.4.1	RecomWell® <i>Helicobacter</i> IgG.....	35
3.1.4.2	RecomLine® <i>Helicobacter</i> IgG	36
3.1.4.3	Immunoblot® <i>Helicobacter</i> IgG	38
3.1.4.4	Luminex	39
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	39
3.2.1	Design der Primer	39
3.2.2	DNA-Isolierung	41
3.2.3	Bestimmung der DNA Konzentration.....	41
3.2.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	41
3.2.5	DNA-Agarosegelelektrophorese.....	43
3.3	Statistische Analyse.....	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Prävalenzen und Diagnostik der <i>H. pylori</i> Infektion	45
4.1.1	Demographische Daten der Studienteilnehmer.....	45
4.1.2	<i>H. pylori</i> Infektionsstatus der Studienteilnehmer	46
4.1.3	Serologie der humanen Serumproben	48
4.2	Auswertung recomLine® und recomWell® im positiven und negativen <i>H. pylori</i> Kollektiv	50
4.2.1	Diskrepante Fälle.....	51

4.2.2	Häufigkeit der erkannten recomLine® Antigene	54
4.2.3	Korrelation der Serologie mit den Krankheitsgruppen Gastritis, Ulcus und Karzinom	56
4.2.4	Cutoff des recomLine®	62
4.3	Auswertung recomLine® und recomWell® im eradizierten <i>H. pylori</i> Kollektiv	63
4.4	Vergleich der einzelnen Testverfahren.....	66
4.4.1	Immunoblot®	66
4.4.2	Luminex Verfahren.....	67
4.4.3	PCR der humanen Magenbiopsien	69
4.4.3.1	PCR Antigene	71
4.4.3.2	Vergleich PCR und Serologie.....	71
4.4.3.3	Korrelation Histologie und PCR.....	72
5	Diskussion	74
5.1	Bedeutung der Serologie	74
5.1.1	RecomLine®	76
5.1.1.1	Sensitivität und Spezifität	76
5.1.1.2	<i>H. pylori</i> spezifische Antigene	78
5.2	Diskussion des Studienkollektivs	79
5.2.1	Eradizierte Fälle	80
5.2.2	RecomLine® im Vergleich zur PCR	83
5.3	Bedeutung der Studienergebnisse.....	86
5.4	Ausblick	87
6	Zusammenfassung	90
	Literaturverzeichnis	92
	Anhang	105
	Danksagung	132

Abkürzungsverzeichnis

BabA	Blood-group-antigen-binding adhesion
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CagA	Cytotoxin associated gene A protein
Da	Dalton (g/mol)
ddH ₂ O	Destilliertes, deionisiertes Wasser
d.h.	Das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	Und andere
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
ggf.	Gegebenenfalls
gGT	Gamma-Glutamyl Transpeptidase
GroEL	Heat shock protein 60
HcpC	<i>Helicobacter</i> cystein-rich protein C
HpaA	<i>Helicobacter pylori</i> adhesin A
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HP0231	Hypothetical protein 0231
HtrA	High temperature requirement protein A
ICD	Isocitrat Dehydrogenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
i.v.	Intravenös
k	Kilo (1*10 ³)
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	Mili (1*10 ⁻³)
m	Meter

M	Molar [mol/l]
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
min	Minute
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
n	Nano (1*10 ⁻⁹)
NapA	Neutrophil-activating protein
NO	Stickstoffmonoxid
NSAR	Nicht Steroidale Antirheumatika
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge von x nm
OMP	Outer membrane protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Potentia hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.h.	Siehe
TAE	Tris-acetate-EDTA
U	Unit (1U entspricht der Menge an Enzym, die unter Standardbedingungen 1µmol Substrat pro Minute umsetzt)
UreA	Urease A
UV	Ultraviolett
V	Volt
VacA	Vacuolating cytotoxin A
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
z.B.	Zum Beispiel
°C	Grad Celsius
µ	Mikro (1*10 ⁻⁶)
±	Plus Minus, kennzeichnet ggf. eine folgende Standardabweichung
Ø	Mittelwert

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der historischen Migration von <i>H. pylori</i> (Falush et al. 2003)	4
Abbildung 2: Lokalisation von <i>H. pylori</i> im Magen (Press Release: The 2005 Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012).....	6
Abbildung 3: <i>H. pylori</i> Infektion und ihre Folgekrankheiten	7
Abbildung 4: Endoskopische Sicht auf ein Ulcus ventriculi in der Angulusfalte des Magens..	8
Abbildung 5: <i>H. pylori</i> Testverfahren nach Präferenz.....	16
Abbildung 6: Färbeergebnis Warthin-Starry.....	17
Abbildung 7: Endoskopische Sicht auf eine unauffällige Magen Antrum Schleimhaut.....	32
Abbildung 8: Testprinzip und –durchführung recomWell® <i>Helicobacter</i> IgG (Mikrogen, Neuried)	35
Abbildung 9: RecomLine® <i>H. pylori</i> Austestung von klinisch definierten Patientenseren (Mikrogen, Neuried).....	37
Abbildung 10: Altersentsprechende <i>H. pylori</i> Prävalenz	47
Abbildung 11: <i>H. pylori</i> Prävalenz nach Herkunftsland der Studienteilnehmer	47
Abbildung 12: Beispiele recomLine® Testergebnisse.....	49
Abbildung 13: RecomWell® Extinktions Score der recomWell® positiven und Histologie <i>H. pylori</i> negativen, positiven und eradizierten Fälle	52
Abbildung 14: RecomLine® Punkte Score der recomLine® positiven und Histologie <i>H. pylori</i> negativen, positiven und eradizierten Fälle.....	53
Abbildung 15: Anteil an nur CagA positiven recomLine® Ergebnissen an allen positiven recomLine® Testergebnissen.....	54
Abbildung 16: Positive recomLine® Antigene bezogen auf die einzelnen Histologie Kategorien.....	55
Abbildung 17: Anteil von CagA in Bezug auf die Histologie und Herkunft	56
Abbildung 18: Verteilung der Histologiebefunde im gesamten Kollektiv (n = 1350).....	56
Abbildung 19: Positivitätsraten der Antigene in Bezug auf den Grad der Entzündung	57
Abbildung 20: Positivitätsraten der Antigene in Bezug auf die Aktivität der Entzündung	58

Abbildung 21: Zusammenhang zwischen dem Antigen CagA (laut recomLine®) und dem Grad, bzw. der Aktivität der Entzündung in der Histologie	58
Abbildung 22: Zusammenhang zwischen dem Antigen VacA und dem Grad der Entzündung in der Histologie.....	59
Abbildung 23: Zusammenhang zwischen recomLine® Punkte Score und Grad / Aktivität der Entzündung	61
Abbildung 24: Zusammenhang zwischen Zeitpunkt der Eradikation und der Immunantwort im recomWell®	65
Abbildung 25: Zusammenhang zwischen Zeitpunkt der Eradikation und den Antigenen im recomLine®	65
Abbildung 26: Übereinstimmung zwischen dem Punkte Score im recomLine® und Immunoblot®	67
Abbildung 27: Korrelation der Anzahl der Antigene im Luminex mit der Summe im recomLine®	68
Abbildung 28: Positiv Kontrolle der PCR Screening Primer, <i>H. pylori</i> G27	69
Abbildung 29: Patient Nummer P005, positives PCR Ergebnis.....	70
Abbildung 30: Patient Nummer MRI 10, negatives PCR Ergebnis	70
Abbildung 31: GGT Primer gegen humane DNA (1 – 3) und humane Magenbiopsien (4 – 7)	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>H. pylori</i> Virulenzfaktoren und ihre Funktion.....	10
Tabelle 2: Sensitivität und Spezifität der diagnostischen Verfahren zur Detektion einer <i>H. pylori</i> Infektion modifiziert nach (Gisbert et al. 2006)	20
Tabelle 3: Therapie Schemata zur <i>H. pylori</i> Eradikationstherapie.....	22
Tabelle 4: Antibiotikaresistenzen modifiziert nach (Francesco et al. 2010)	23
Tabelle 5: Verwendete Screening Primer sense	26
Tabelle 6: Verwendete Screening Primer antisense	27
Tabelle 7: Verwendete Proteine zum Design der Primer	40
Tabelle 8: Charakteristika der 1350 in die Studie eingeschlossenen Patienten.....	45
Tabelle 9: Übereinstimmung zwischen Histologie und Kultur im Münchner Kollektiv	46
Tabelle 10: Übereinstimmung zwischen Histologie und recomWell®	48
Tabelle 11: Übereinstimmung zwischen Histologie und recomLine®	49
Tabelle 12: Statistische Gütekriterien von recomLine® und recomWell®	50
Tabelle 13: Diskrepante Fälle zwischen Serologie und Histologie	51
Tabelle 14: Positivitätsraten (%) der einzelnen Antigene im recomLine® bezogen auf den Grad und die Aktivität der Entzündung und pathologische Veränderungen	59
Tabelle 15: RecomLine® Score und Anzahl positiver Antigene in Abhängigkeit verschiedener Histologie-merkmale.....	61
Tabelle 16: Sensitivität und Spezifität bei diversen recomLine® Punktwerten (sensitive Bandenbewertung)	63
Tabelle 17: <i>H. pylori</i> eradiziertes Kollektiv	63
Tabelle 18: Mittelwert des Luminex Scores in Bezug auf die Übereinstimmung mit dem recomLine®	69
Tabelle 19: Anzahl und Prozentangaben positiver Antigene in der PCR.....	71
Tabelle 20: Übereinstimmung zwischen der PCR und der Serologie (recomLine®).....	72
Tabelle 21: Korrelation Antigene in PCR mit der Aktivität der Entzündung in der Histologie ..	73
Tabelle 22: Ausführliche Liste der Studienteilnehmer	105

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Antikörperaktivität aus den Extinktionswerten.....	36
Formel 2: Berechnung der Schmelztemperatur T_M [°Celsius]	40
Formel 3: Berechnung der <i>Annealing</i> -Temperatur T_A [°Celsius]	43

1 Einleitung

1.1 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori ist ein gram-negatives mikroaerophiles Bakterium, das den menschlichen Magen besiedeln kann. Insgesamt sind über die Hälfte der Bevölkerung weltweit mit dem Bakterium *H. pylori* infiziert, mit geschätzten Prävalenz-Raten von bis zu 90% in Entwicklungsländern und im Durchschnitt 30% in Industrienationen (Bures et al. 2011; Perez-Perez et al. 2004). Die ersten Entdeckungen eines solchen spiralförmigen Bakteriums im Magen lassen sich auf das Jahr 1893 durch Bizzozero in Turin zurückführen (Bizzozero G. 1893). Im 20. Jahrhundert erfolgte dann mehrfach die Beschreibung von spiralförmigen Organismen in der Magenmukosa durch Anatomen, Pathologen und Chirurgen (Marshall 2001). Der erste Nachweis erfolgte schließlich durch Robin Warren und Barry Marshall (Marshall 1983). Seit 1979 beobachteten die beiden australischen Wissenschaftler spiralförmige Bakterien in der Magenmukosa. Schließlich gelang ihnen der Nachweis eines gram-negativen Bakteriums, sowie dessen Verbindung zu Magenschleimhautentzündungen (Gastritis) und wiederum die Assoziation einer Gastritis zu duodenalen und gastralen Ulzerationen. Im Jahre 1982 gelang es Warren und Marshall erstmals den Keim erfolgreich zu isolieren und auch zu kultivieren (Marshall 1983). Von den 100 Patienten, die dazu initial in ihre Studie eingeschlossen wurden, waren über 65% *H. pylori* positiv, fast alle hatten eine Gastritis. Ebenso waren alle 13 Patienten mit duodenalen Ulzera und 18 der 22 Patienten mit Magenulzera *H. pylori* positiv – ein erster kausaler Zusammenhang zwischen *H. pylori* und der Entstehung von Ulzera war damit bestätigt (Marshall 2001; Marshall und Warren 1984). Für diese weitreichenden Entdeckungen erhielten Warren und Marshall 2005 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. In der Zwischenzeit erfolgte vielfach der Nachweis eines direkten Zusammenhangs zwischen einer *H. pylori* Infektion und diversen Krankheiten des Magens. So besteht bei einer *H. pylori* Infektion ein erhöhtes Risiko für Ulzerationen des Magens und Duodenums, Magenadenokarzinome und Magenlymphome (Goodwin et al. 1986a; Uemura et al. 2001; Parsonnet 1998; Stolte et al. 2002). Aufgrund dieser Datenlage wurde *H. pylori* im Jahr 1994 als Klasse 1 Karzinogen von der WHO (World Health Organisation) eingestuft (World Health Organisation 1994).

Weltweit ist Magenkrebs der am vierthäufigsten diagnostizierte Krebs und machte im Jahr 2008 acht Prozent der 12,7 Millionen neu diagnostizierten Krebserkrankungen aus. Betrachtet man die mit Krebs assoziierten Todesfälle, stand Magenkrebs hinter Lungen- und Bronchial-Karzinomen sogar an zweiter Stelle und machte zehn Prozent der 7,6 Millionen durch Karzinome verursachte Todesfälle aufgrund von Karzinomen im Jahr 2008 aus (Jemal

et al. 2011). Studien haben gezeigt, dass über 90% der Patienten mit Magenkarzinomen *H. pylori* positiv waren (Enomoto et al. 1998) – *H. pylori* stellt somit ein ernstzunehmendes weltweites Gesundheitsproblem dar. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die Therapie der *H. pylori* Infektion mit Antibiotika, also eine Eradikation des Bakteriums, das Fortschreiten von Schleimhautatrophie und die Entwicklung von Magenkrebs verhindern kann (Wong et al. 2004). In einer Studie von Uemura wurde gezeigt, dass während der Beobachtungsphase nur *H. pylori* positive Patienten Magenkrebs entwickeln, wohingegen die *H. pylori* negative Referenzgruppe tumorfrei blieb (Uemura 2001). So könnte man zu dem Schluss kommen, dass alle *H. pylori* infizierten Individuen von einer Eradikationstherapie profitieren würden. Es muss jedoch beachtet werden, dass nur knapp ein Prozent der mit *H. pylori* infizierten Menschen tatsächlich ein Magenkarzinom entwickelt. Außerdem birgt eine Eradikationstherapie – wie jede antibiotische Behandlung – Nebenwirkungen und erhöht die Gefahr der Resistenzbildung gegen Antibiotika (Francesco et al. 2010). Ein weltweiter flächendeckender Therapieansatz könnte weiterhin schon allein aus Kostengründen nicht durchgeführt werden. Zusätzlich zeigen neuere Studien, dass *H. pylori* neben den humanpathogenen Eigenschaften durchaus auch protektive Effekte hat. So wurde gezeigt, dass *H. pylori* positive Patienten seltener an Cardia-Karzinomen, Reflux und folglich ebenso seltener an Ösophagus Karzinomen, chronisch entzündlichen Darmkrankheiten und seltener an Asthma bronchiale leiden (Kamangar et al. 2006; Ghoshal und Chourasia 2010; Pronai et al. 2004; Reibman et al. 2008; Arnold et al. 2011). Es wird daher von einer starken Verbindung zwischen sinkenden *H. pylori* Infektionsraten und beispielweise steigenden Raten für gastroösophagealen Reflux, Barrett-Ösophagus und Ösophagus Karzinomen in Industrienationen ausgegangen (Konturek et al. 2006). Eine Therapie von allen *H. pylori* Infizierten erscheint somit nicht sinnvoll (Dorer et al. 2009). Vielversprechender erscheint hingegen die Identifikation und Therapie von Patienten mit einem erhöhten Risiko für gastroduodenale Erkrankungen. Zur Zeit wird in Deutschland gemäß der S3-Leitlinie „*Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulcuskrankheit“ der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten eine Therapie bei peptischen Ulzera und bei symptomatischer *H. pylori* Infektion nach definitiver Diagnose einer Infektion empfohlen (Fischbach et al. 2009). Es stehen verschiedene Methoden zur Diagnostik einer *H. pylori* Infektion zur Verfügung. Den Goldstandard stellt die Endoskopie dar, die es erlaubt Magenschleimhautbiopsien zur histologischen Analyse zu gewinnen. Aufgrund der diskontinuierlichen Verbreitung von *H. pylori* im Magen kann es jedoch hier zu falsch negativen Ergebnissen kommen (Enomoto et al. 1998). Weiterhin ist die endoskopische Untersuchung des Magens nicht immer verfügbar und aufgrund der Invasivität und Kosten nicht für einen flächendeckenden Screeningansatz einsetzbar. Dafür

geeignet sind hingegen nicht-invasive Verfahren wie der Atemtest, der Stuhl-Antigen-Test und die serologische Analyse von Antikörpern gegen *H. pylori*. Jedoch liefern auch diese Verfahren meist nur eine Einteilung in infizierte und nicht infizierte Patienten – in der Routinediagnostik gibt es zurzeit keine Methode die eine Risikostratifizierung erlaubt. In Kooperation mit der Firma Mikrogen wurde daher ein neuer Immuno-line-blot (recomLine[®]) entwickelt, der die IgG Immunantwort auf sechs *H. pylori* Antigene im Serum erkennt. Dafür wurden sechs virulente und immunogene *H. pylori* Proteine ausgewählt, rekombinant hergestellt und auf einer Nitrocellulose Membran immobilisiert. Je nachdem welche und wie viele Proteine nun erkannt werden, sollen daraus neue prognostische Parameter bestimmt werden, die eine Vorhersage bezüglich des Magenkarzinomrisikos erlauben. In vorliegender Arbeit wurde der recomLine[®] zum Nachweis von *H. pylori* im Serum validiert. Dafür wurden Blut- und Gewebeproben von Patienten mit gesunder und entzündlich veränderter Magenschleimhaut untersucht.

Im Folgenden werden einzelne Aspekte der *H. pylori* Infektion näher betrachtet. Dabei wird zunächst unter besonderer Berücksichtigung der Übertragungswege und Prävalenzen auf die Epidemiologie von *H. pylori* eingegangen. Nach der Erörterung von Systematik und Morphologie der Gattung der *Helicobacter* wird die Pathogenese des Bakteriums thematisiert. In diesem Zusammenhang wird auf die einzelnen Virulenzfaktoren, die Immunantwort und die assoziierten Krankheiten eingegangen. Abschließend erfolgt ein Einblick in die Diagnostik und Therapie.

1.1.1 Epidemiologie

Die Infektion mit *H. pylori*, deren Übertragungsweg nur unzureichend geklärt ist, erfolgt meist schon im Kindesalter. Es wird von einem oral-oralen oder gastral-oralen Übertragungsweg ausgegangen, da eine Kultivierung von *H. pylori* aus Speichel, Erbrochenem und Stuhlgang gelang (Parsonnet et al. 1999; Leung et al. 1999). Dabei weißt besonders der erbrochene Mageninhalt eine hohe Dichte an *H. pylori* Bakterien auf (Leung et al. 1999). In Entwicklungsländern wurde weiterhin die Kontamination von Trinkwasser mit *H. pylori* Keimen als Übertragungsweg vermutet (Baker und Hegarty 2001; Klein et al. 1991), jedoch gelang hier ein kultureller oder molekularbiologischer Nachweis nur selten (Janzon et al. 2009; Lu et al. 2002).

Die Übertragung erfolgt meist innerhalb einer Familie. So liegt bei *H. pylori* infizierten Familienmitgliedern meist eine Infektion mit demselben *H. pylori* Stamm vor, und Kinder aus Familien mit *H. pylori* infizierten Elternteilen haben eine erhöhte Seroprävalenz im

Gegensatz zu Kindern nicht infizierter Eltern (Kivi et al. 2003; Han et al. 2000). Da die einzelnen Stämme bevorzugt innerhalb von Familien weitergegeben werden, haben sich im Laufe der Zeit verschiedene Bakterienstämme in geographischen Mustern verbreitet. Somit lassen sich durch Vergleiche des Bakteriengenoms Informationen über Migrationsbewegungen der Bakterien und damit der Menschen in der Vergangenheit nachvollziehen (Falush et al. 2003; Dorer et al. 2009).

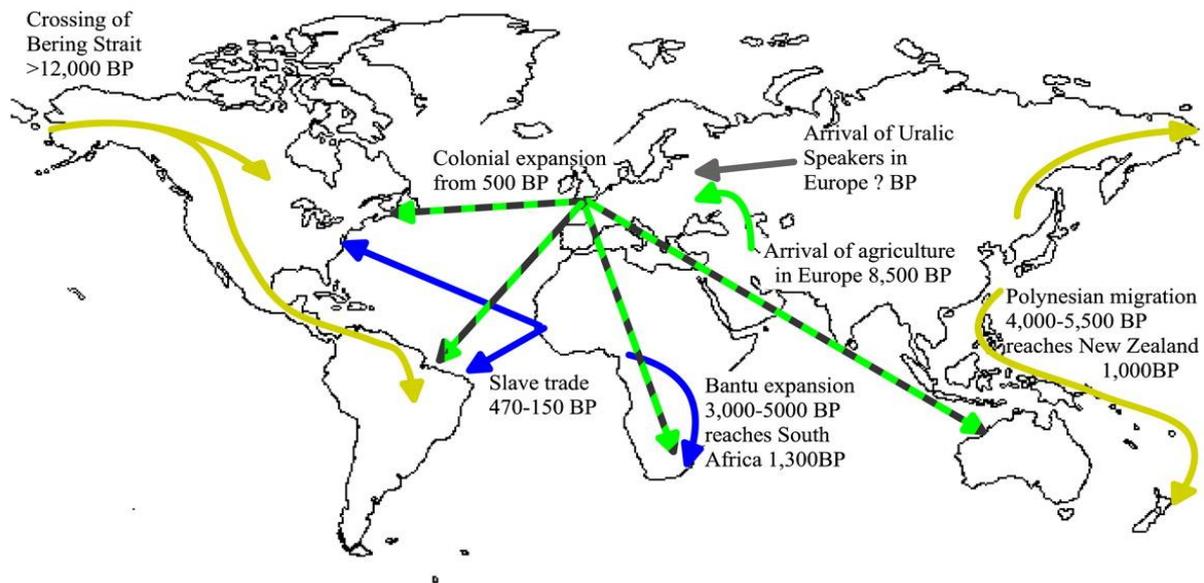


Abbildung 1: Darstellung der historischen Migration von *H. pylori* (Falush et al. 2003)

Die Pfeile zeigen die spezifischen Migrationen von Menschen und *H. pylori* Populationen. Grün/Grau: *H. pylori* Europa; Blau: *H. pylori* ancestral Afrika; Gelb: *H. pylori* Ost Asien; BP: vor der Gegenwart (years before present). Aus Falush et al. 2003. Mit freundlicher Genehmigung von AAAS

Neben einer vertikalen Verbreitung der *H. pylori* Infektion innerhalb einer Familie werden vor allem in Entwicklungsländern auch horizontale Verbreitungen diskutiert (Delport et al. 2006; Schwarz et al. 2008). Als Gründe dafür werden unter anderem schlechte sanitäre Standards und höherer physischer Kontakt mit Menschen außerhalb der eigenen Familie in Entwicklungsländern genannt. Ein weiterer möglicher Übertragungsweg ist die gastro-orale Verbreitung, die beispielsweise über den Kontakt mit *H. pylori* infiziertem Magenschleim erfolgt. Dazu kann es durch Erbrochenes oder aber auch im Rahmen einer Endoskopie kommen. Bei Gastroenterologen findet sich zum Beispiel eine erhöhte Prävalenz von *H. pylori*, es besteht ein statistisch signifikant erhöhtes relatives Risiko von 1,5 für eine *H. pylori* Infektion (Peters et al. 2011).

Es sind über 50% der Bevölkerung weltweit mit *H. pylori* infiziert, damit ist die *H. pylori* Infektion eine der häufigsten chronischen bakteriellen Infektionen überhaupt (Cave 1997).

Die Infektionsraten in Industrienationen wie zum Beispiel Deutschland liegen dabei mit 10 – 30% deutlich unter den Infektionsraten in Entwicklungsländern (Bures et al. 2011), für welche Prävalenz-Werte von bis zu 90% der Bevölkerung angegeben werden (Perez-Perez et al. 2004). Auch nach Migration in eine Industrienation bleibt das Herkunftsland ein bestehender Risikofaktor für eine *H. pylori* Infektion, wobei das Risiko mit einer längeren Aufenthaltsdauer im Immigrationsland negativ korreliert (Perez-Perez et al. 2005). Die großen Unterschiede lassen sich nicht nur aufgrund der Herkunftsländer, sondern auch durch sozioökonomische Faktoren erklären (Brown 2000). Von großer Bedeutung sind dabei unter anderem Hygiene-Praktiken, wie regelmäßiges Händewaschen, sauberes Trinkwasser sowie das Vorhandensein von sanitären Anlagen (Brown 2000; Bures et al. 2011). Außerdem spielen das Einkommen und der Beruf der Eltern, die Anzahl der Kinder im selben Haushalt sowie die Bevölkerungsdichte eine wichtige Rolle. Insgesamt hat eine Verbesserung der Lebensstandards im Laufe der Jahre in Industrienationen als auch in Entwicklungsländern zu einem Rückgang der *H. pylori* Infektionsraten geführt (Bures et al. 2011; Roosendaal et al. 1997; Tkachenko et al. 2007).

Neben Herkunft und sozioökonomischen Faktoren spielt auch das Alter eine wichtige Rolle (Staat et al. 1996). Die Infektion mit *H. pylori* erfolgt im Kindesalter und persistiert ein Leben lang; im Erwachsenenalter sind die Serokonversionsraten mit 0,2 – 1,0% relativ gering (Xia und Talley 1997). In Industrienationen liegt die *H. pylori* Prävalenz bei Kindern bei 5 – 10% und steigt auf bis zu 40% im Erwachsenenalter an (Boltshauser 1999). Die höheren Prävalenzraten im Alter ergeben sich nicht etwa durch eine altersbedingte Zunahme des Infektionsrisikos, sondern sind Ausdruck eines sogenannten Kohorteneffekts (Parsonnet 1995). So weisen ältere Geburtenjahrgänge im Vergleich zu ähnlichen Altersgruppen aus jüngeren Geburtenjahrgängen höhere Prävalenzen auf. Dies lässt sich auf eine erhöhte Infektiosität in der Kindheit älterer Geburtenjahrgänge zurückführen, beispielsweise bedingt durch schlechtere hygienische Bedingungen.

1.1.2 Systematik und Morphologie

Bei seiner Entdeckung in den Achtziger Jahren wurde das Bakterium *H. pylori* zunächst als *Campylobacter pyloridis* benannt: „*Campylobacter*“ da es aufgrund seines Guanin und Cytosin Gehaltes der Gattung *Campylobacter* ähnelt, und „*pyloridis*“, aufgrund seines Vorkommens am Pylorus, dem Magenausgang (Marshall 1984). Zunächst erfolgte wegen eines linguistischen Fehlers die Umbenennung in *Campylobacter pylori* (Marshall und Goodwin 1987), dann ergaben diverse molekularbiologische Untersuchungen, dass die

Zuordnung zu der Gattung „Campylobacter“ nicht korrekt war und dass es sich um ein neues Genus handeln müsste (Goodwin et al. 1985; Goodwin et al. 1986b; Goodwin et al. 1989b; Lau et al. 1987; Romaniuk et al. 1987). 1989 wurde schließlich die neue Gattung der „*Helicobacter*“ etabliert und das Bakterium in *Helicobacter pylori* umbenannt (Goodwin et al. 1989a). Die Gattung der *Helicobacter* umfasst gram-negative, mikroaerophile, gebogene oder spiralförmige Stäbchen. Die Größe beträgt ca. 3,5µm mal 0,5 – 1µm. *Helicobacter* bilden keine Sporen aus, sind Katalase und Oxidase positiv und weisen meist eine starke Produktion von Urease auf. Der wichtigste humanpathogene Vertreter ist *H. pylori*, weitere Arten sind *H. heilmannii*, *H. cinaedi* und *H. fennelliae* (Heilmann und Borchard 1991). Für *H. pylori* stellt der Mensch das einzige Reservoir dar. Die anderen der über 25 *Helicobacter* Arten sind tierpathogen (Suerbaum 2012). Im Unterschied zu den Campylobactern zeichnet sich *H. pylori* durch multiple Geißeln aus, an einem Pol trägt es 4 – 7 Geißeln, was zu einer starken Beweglichkeit des Bakteriums beiträgt. Es liegt gebogen oder spiralförmig vor, in älteren Kulturen können die Bakterien auch kokkoide Formen annehmen (Kusters et al. 1997). Unter Temperaturen von 30°C kann *H. pylori* nicht kultiviert werden, weiterhin sind mikroaerophile Kulturbedingungen essentiell.

1.1.3 Pathogenese

Das Hauptreservoir des Bakteriums ist der Magen; hier besiedelt der Keim bevorzugt das Magenantrum.

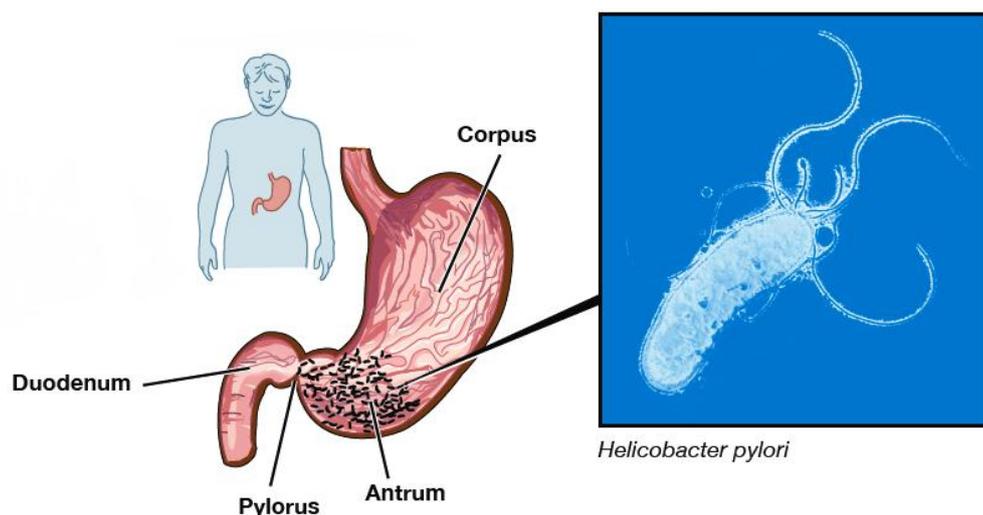


Abbildung 2: Lokalisation von *H. pylori* im Magen (Press Release: The 2005 Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012) Mit freundlicher Genehmigung der Nobelstiftung

Durch verschiedene Mechanismen gelingt es dem Bakterium der Zersetzung durch die aggressive Magensäure zu entgehen. Zum Einen ist *H. pylori* freibeweglich im viskösen Mukos und kann so durch chemotaktisch gerichtete Bewegungen entlang des pH Gradienten wandern. Dort nistet sich *H. pylori* unterhalb der Säurebarriere im alkalischen Teil der Magenschleimhaut ein (Suerbaum et al. 1993). Zum Anderen führt das von *H. pylori* produzierte Enzym Urease zu einer Spaltung von Harnstoff in Kohlenstoffdioxid und Ammoniak, wobei letzterer den pH in unmittelbarer Umgebung des Bakteriums anhebt (Moblely 1996). Eine Invasion der Epithelzellen erfolgt selten, der Großteil der Bakterien verweilt innerhalb der Mukoschicht des Magens und ca. 20% binden an Magenepithelzellen. Dort führt die Kolonisation mit *H. pylori* letztendlich immer zu der Ausbildung einer aktiven Gastritis, die sich bei einer akuten Infektion meist unspezifisch im Rahmen einer Gastroenteritis äußert. Da eine spontane Remission der Infektion nur sehr selten beschrieben wird, kommt es zu einer lebenslangen Persistenz des Bakteriums. Es entwickelt sich eine meist asymptomatische chronische Gastritis (Kusters et al. 2006). Der klinische Verlauf hängt dabei unter anderem von Bakterien- und Wirtsfaktoren ab.

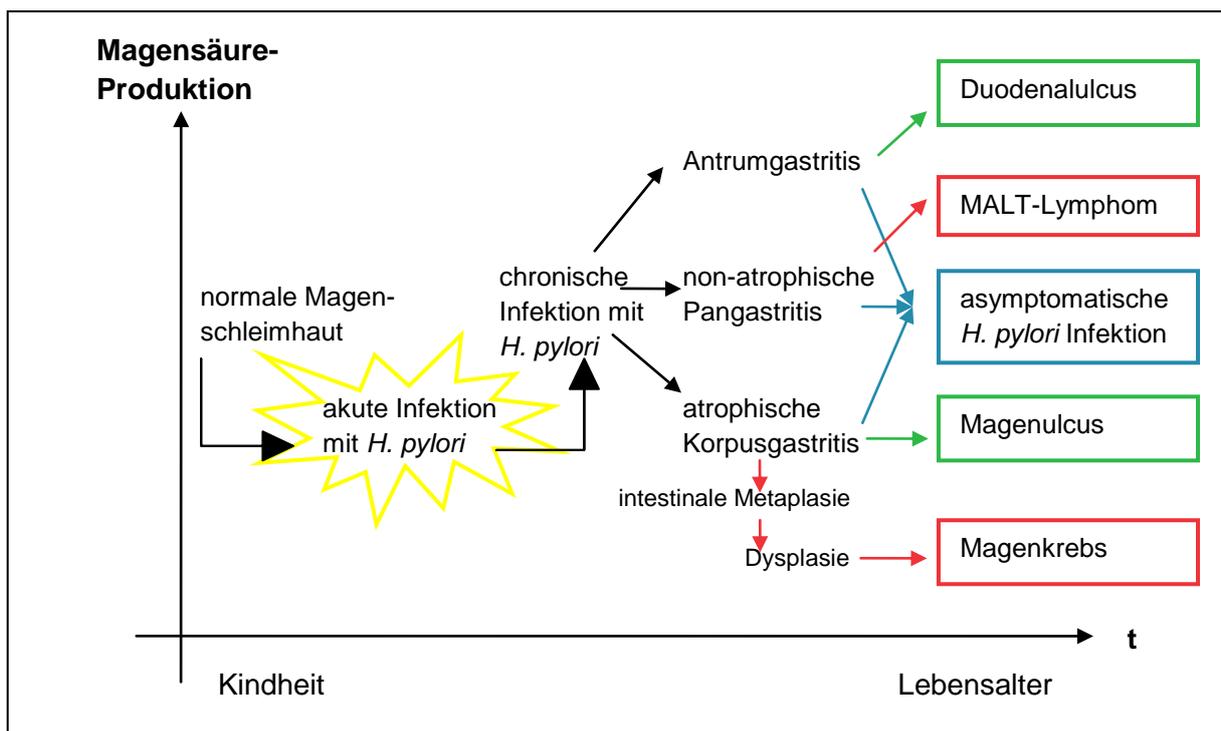


Abbildung 3: *H. pylori* Infektion und ihre Folgeerkrankungen modifiziert nach (Suerbaum 2012)

Meist ist die Gastritis im Bereich des Antrums lokalisiert und führt bei akuter Infektion zunächst zu einer verminderten Magensäuresekretion (Suerbaum 2012). Im Laufe der Zeit kommt es bei einer Antrumgastritis dann wieder zu einer Erhöhung der Magensäuresekretion

durch Hypergastrinämie. Die dadurch resultierenden Schleimhautschäden führen in 10 – 15% zu der Ausbildung eines Ulcus duodeni, einem Geschwür des Zwölffingerdarms, deren Auftreten in nahezu allen Fällen auf eine *H. pylori* Infektion zurückzuführen ist (Konturek et al. 2006). Begünstigend wirkt dabei eine übermäßig gesteigerte Produktion von Magensäure, zum Beispiel ausgelöst durch Nikotin (Zhang et al. 2009). Dadurch kann es zu einer weiteren Schädigung der Magenschleimhaut kommen, die das Auftreten eines Ulcus begünstigt. Im Gegensatz zu einer Antrumgastritis geht die Corpus-dominante Gastritis mit einer niedrigen Säureproduktion einher. Es bildet sich eine meist multifokale atrophische Gastritis aus, die unter anderem zu der Entstehung eines Ulcus ventriculi führen kann. Die Ulzera ventriculi sind nur in ca. 85% der Fälle auf eine *H. pylori* Infektion zurückzuführen, andere Ursachen können beispielsweise Autoimmungastritiden oder NSAR-induzierte Gastritiden sein (Kusters et al. 2006).



Abbildung 4: Endoskopische Sicht auf ein Ulcus ventriculi in der Angulusfalte des Magens

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. B. Birkner

Die Corpus-dominante Gastritis geht außerdem mit einem erhöhten Magenkarzinomrisiko einher, wovon ca. 1 – 2% der *H. pylori* infizierten Menschen betroffen sind (Kusters et al. 2006). Dabei stellt *H. pylori* vor allem einen starken Risikofaktor für die Entwicklung eines nicht cardialen Magenkarzinoms dar, eine inverse Assoziation besteht dagegen für das cardiale Magenkarzinom (Kamangar et al. 2006). Insgesamt existiert ein starker Zusammenhang zwischen nicht cardialen Magenkarzinomen und *H. pylori*: über 90% dieser Karzinome lassen sich auf eine chronische Infektion zurückführen (Enomoto et al. 1998). Durch die chronische Entzündung kommt es zu einer ständigen Produktion reaktiver

Sauerstoffverbindungen, die wiederum DNA Schäden bedingen und die Krebskaskade auslösen können (Kusters et al. 2006). Uemura et al gelang in einer Follow-Up Studie der Nachweis, dass nur *H. pylori* positive Patienten Magenkarzinome entwickelten. Insgesamt waren davon 36 der 1,246 *H. pylori* positiven Teilnehmer betroffen (2,9%). Auffällig war, dass vor allem bei Patienten mit Magenulzera und Atrophie der Magenschleimhaut ein erhöhtes Risiko festgestellt wurde. Die Patienten mit Duodenalen Ulzera sowie alle *H. pylori* negativen Teilnehmer der Kontrollgruppe entwickelten hingegen kein Magenkarzinom (Uemura 2001). Eine weitere langfristige Komplikation der *H. pylori* Infektion ist das MALT-Lymphom, ein Schleimhaut-assoziiertes Non-Hodgkin-Lymphom. Bei einem MALT-Lymphom im Frühstadium kann eine *H. pylori* Eradikation in 80% der Fälle sogar zu einer kompletten Remission des Lymphoms führen (Stolte et al. 2002). Zählt man die *H. pylori* induzierten Erkrankungen zusammen kommt man weltweit auf mehrere hundert Millionen Ulzera und mehrere Millionen Magenkarzinome – *H. pylori* bleibt somit ein ernstzunehmendes humanes Pathogen (Salih 2009).

Das Risiko, eine dieser Krankheiten zu entwickeln, hängt von der komplexen Interaktion mehrerer Faktoren ab. Dabei spielen der Wirt selbst, seine Umweltfaktoren, sowie der Bakterienstamm und dessen Virulenzfaktoren eine Rolle (Alm et al. 1999). Bezüglich wirtsabhängigen Faktoren spielen unter anderem Mangelernährung oder Infektionen in der Kindheit eine Rolle. Diese sind unter anderem mit einer verminderten Säurebildung assoziiert und stellen so eine Prädisposition für atrophische Gastritis und Magenkarzinomen dar. Weitere Faktoren die mit dem Magenkrebsrisiko korrelieren sind eine hohe Salz- und Nitratzufuhr. Protektiv wirken hingegen frisches Obst und Gemüse (Graham 2000; Howson CP et al. 1986; Graham et al. 2009). Zusätzlich zu den Wirtsfaktoren spielen bakterielle Faktoren eine wichtige Rolle. Auf die Virulenzfaktoren, vor allem in Zusammenhang mit der Pathogenität des einzelnen *H. pylori* Stammes, wird im folgenden Unterkapitel näher eingegangen.

1.1.4 Virulenzfaktoren

Diverse Virulenzfaktoren können die Pathogenität eines einzelnen *H. pylori* Stammes erhöhen und letztendlich zu einem gesteigerten Risiko der Karzinogenese führen (Kusters et al. 2006). Grundsätzlich sollte ein Virulenzfaktor folgende Kriterien erfüllen: Krankheitskorrelat, epidemiologische Konsistenz, biologische Plausibilität und verminderte biologische Aktivität durch Gendeletion (Lu et al. 2005).

Eine Übersicht über wichtige Virulenzfaktoren gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: *H. pylori* Virulenzfaktoren und ihre Funktion

Virulenzfaktor	Funktion
Kolonisation	
Flagellen	Motilität (Suerbaum et al. 1993)
Urease	Säureresistenz (Moblely 1996)
OMPs (u.a. BabA, SabA)	Adhäsion (Odenbreit et al. 2009)
Etablierung	
Superoxiddismutase	Schutz vor freien Sauerstoffradikalen (Spiegelhalder et al. 1993)
Katalase	Schutz vor von Phagozyten produziertem Wasserstoffperoxid (Hazell et al. 1991)
Hitzeschockproeine	Chaperonfunktion (Ellis 1990)
Immunevasion	
gGT	Inhibiert T-Zellproliferation (Gerhard et al. 2005)
PgbA, PgbB	Binden humane Plasminogene und fungieren so als „Tarnmantel“ (Jönsson et al. 2004)
Pathogenität	
VacA	Zellschädigung
CagA	Störung zellulärer Funktionen (Wen und Moss 2009)
NapA	Aktivierung Neutrophiler (Evans, JR. et al. 1995)

In der vorliegenden Arbeit wurde die erste Version des recomLine[®] an einer Studienkohorte validiert. Im Folgenden sollen daher die sechs Virulenzfaktoren, CagA, VacA, GroEL, UreA, HcpC und gGT, die sich auf dieser ersten Version des recomLine[®] befinden, näher betrachtet werden.

CagA – Cytotoxin-associated gene A

Das wohl bekannteste *H. pylori* Antigen ist CagA, ein immunogenes, ca. 120 – 145 kDa großes Protein. CagA ist Teil der Pathogenitätsinsel cag PAI, ein 40 kbp Segment der DNA, das insgesamt 31 Gene codiert, der Großteil davon codiert Komponenten eines Typ IV Sekretionssystems (Censini et al. 1996). Während in westlichen Ländern ca. 60% der *H.*

pylori Stämme die *cag* PAI tragen, sind in Ost-Asien nahezu alle Stränge *cag* PAI positiv (Lai et al. 2002; Pan et al. 1997).

Das kodierte Sekretionssystem fungiert als molekulare Spritze, die zur Injektion von bakteriellen Produkten in eukaryontische Zellen dient (Wen und Moss 2009). CagA selbst wird ebenfalls in die Wirtszelle transloziert und im Zytoplasma phosphoryliert. Anschließend induziert CagA in der Zelle eine Reihe von Signalwegen (Suerbaum 2012; Yamaoka 2010). Es kommt zu einer Reorganisation des Zytoskeletts und Zell Elongation (Wen und Moss 2009). Neben der Phosphorylations-abhängigen Aktivität interagiert unphosphoryliertes CagA mit bestimmten Wirtszellproteinen, wie zum Beispiel dem epithelialen Protein Zonulin, dem Zelladhaesions Protein E-Cadherin, dem Hepatozyten Wachstumsfaktor c-Met und dem Cadherin-assoziiertem Protein β -Catenin. Diese CagA-Protein Interaktionen führen zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Schleimhaut: Zell Polarität geht verloren und proinflammatorische und mitogene Antworten werden induziert (Wen und Moss 2009). Insgesamt führen die CagA vermittelten Reaktionen zu einer erhöhten Pathogenität des Bakteriums. So ist es unumstritten, dass Infektionen mit CagA positiven Stämmen mit einem erhöhten Risiko für chronisch atrophische Gastritis, peptischen Ulzera und Magenkarzinomen einhergehen (Gao et al. 2009b; Gao et al. 2009a; Huang et al. 2003).

VacA – Vacuolating cytotoxin

Ein weiteres wichtiges *H. pylori* Antigen ist VacA, ein ca. 95 kDa großes immunogenes Protein, das von etwa 50% aller *H. pylori* Stämme produziert wird (Cover und Blaser 1992). Im Gegensatz zu CagA besitzen alle Stämme das Gen VacA, die Expression des Gens wird über Variationen in der Signalsequenz (s1a, s1b, s2) und mittleren Region (m1, m2) des VacA Gens bestimmt (Atherton et al. 1995). Eine s1 Signalsequenz führt zu der Produktion eines funktionellen VacA Toxins, von s2 Typen geht hingegen nur geringe toxische Aktivität aus. Außerdem ist der Genotyp VacAm1 mit einem ernsteren Verlauf von Gastritis, Atrophie und Metaplasie verbunden (Höcker und Hohenberger 2003). In Asien werden fast ausschließlich s1/m1 Stämme gefunden, die jedoch nicht mit einem spezifischen klinischen Befund assoziiert sind (Wen und Moss 2009). Insgesamt besteht bei der Sekretion von VacA ein erhöhtes Risiko für chronisch atrophische Gastritis, Ulzera und Magenkarzinome (Gao et al. 2009b).

Eine Vielzahl der Funktionen von VacA ist bekannt. Unter anderem unterbricht VacA die endosomale Reifung, was die Bildung großer zytoplasmatischer Vakuolen in den Epithelzellen bedingt (Papini et al. 1994). Außerdem kann VacA die Membranintegrität zerstören und zur Induktion von Apoptose führen (Radin et al. 2011). Darüber hinaus kann

VacA durch Interaktion mit Zellen des Immunsystems die Proliferation von T-Zellen inhibieren (Wen und Moss 2009; Gebert et al. 2003). Schließlich spielt VacA eine wichtige Rolle in den von *H. pylori* induzierten mitochondrialen DNA Mutationen, deren Akkumulation als einer der Grundsteine für die Karzinogenese gesehen wird (Huang et al. 2011).

GroEL – Heat shock protein 60

GroEL ist ein Hitzeschockprotein, das zur Familie der Chaperone gezählt wird und eine wichtige Rolle in der Kolonisation spielt (Gao et al. 2009a; Yamaguchi et al. 1997). Auch für GroEL konnten Gao et al. ein erhöhtes Risiko für chronisch atrophische Gastritis nachweisen und GroEL als einen unabhängigen Prädiktor für Magenkarzinome identifizieren (Gao et al. 2009b; Gao et al. 2009a).

Urease

Die Urease spielt eine essenzielle Rolle in der Kolonisation von *H. pylori* (Andrutis et al. 1995). Um im sauren pH des Magens überleben zu können, produziert *H. pylori* das Enzym Urease. Die Urease ist ein zytoplasmatisches Enzym und macht bei Beginn der Infektion 10 – 15% aller Proteine des Bakteriums aus (Bauerfeind et al. 1997). Das Enzym wird auf einem Gencluster von insgesamt sieben Genen: UreA, UreB, UreI, UreE, UreF, UreG und UreH codiert, die alle für eine aktive Urease benötigt werden (Labigne et al. 1991). Für den recomLine[®] wurde die Untereinheit α (UreA) verwendet. Die aktive Urease führt nach Einstrom von Harnstoff ins Zytoplasma zu einer Spaltung des Harnstoffs in Ammoniak und Kohlenstoffdioxid, dabei bildet sich eine so genannte „Ammoniakwolke“ um das Bakterium, die es mit seinem alkalischen pH vor dem sauren Milieu des Magens schützt (Moblely 1996). Darüber hinaus wird der Urease eine immun protektive Rolle zugeschrieben (Gao et al. 2009a).

HcpC – *Helicobacter* cystein-rich protein C

Das HcpC ist ein 76 kDa großes Protein und gehört zu der Gruppe cysteinreicher Proteine, die spezifisch sind für Proteobakterien der delta/epsilon Subgruppe (Mittl et al. 2003). HcpC verursacht Epithelschäden, fördert die Entzündung der Magenschleimhaut und stellt so ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer chronisch atrophischen Gastritis dar (Gao et al. 2009a; Gao et al. 2009b).

gGT – gamma-Glutamyl Transpeptidase

Die gamma-Glutamyl Transpeptidase ist ein ubiquitäres Protein, dass in allen *H. pylori* Stämmen wieder gefunden werden kann und eine essenzielle Rolle in der Etablierung einer *H. pylori* Infektion spielt (Chevalier et al. 1999). Zunächst liegt die gGT als inaktiver

Präkursor vor (60 kDa), der durch Autoprocessing in einen 40 kDa/ 20 kDa Heterodimer seine volle enzymatische Aktivität erhält (Boanca et al. 2006). Die gGT katalysiert die Abspaltung einer γ -glutamyl-Gruppe und den Transfer dieser Gruppe auf eine andere Aminosäure (Tate und Meister 1981). Im Falle von *H. pylori* wird extrazelluläres Glutamin und Gluthathion zu Glutamat umgewandelt. Glutamat kann anschließend durch die Bakterien aufgenommen werden, wo es für die Glutamin-Synthese benötigt wird oder im Tricarbonsäurezyklus der Energiegewinnung dient. Weiterhin führt die gGT durch einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase zu einer Inhibition der T-Zell Proliferation (Gerhard et al. 2005; Schmees et al. 2007).

Weitere *H. pylori* Proteine, die in der vorliegenden Arbeit im Rahmen der DNA-Analyse ausgewertet wurden, sind:

- BabA: 78 kDa, bindet an das Lewis^b Blutgruppen Antigen auf Magenepithelzellen und dient der Adhäsion an die Magenwand, Konservierung 11 – 50%, assoziiert mit duodenalen Ulzerationen und Magenadenokarzinomen (Yamaoka 2008b; Odenbreit et al. 2009; Gerhard et al. 1999)
- HtrA: 48 kDa, spezifische E-Cadherin Protease (Hoy et al. 2010)
- ICD: 47 kDa, Enzym des Citratzyklus, hoch konserviert, aufgrund weniger Kreuzreaktionen guter Kandidat für immunologische Diagnostik. Die Freisetzung von ICD ist assoziiert mit aktiver *H. pylori* Entzündung (Hussain et al. 2008)
- NapA: 150 kDa, sezerniertes Protein, rekrutiert Neutrophile und führt so zu einer Schädigung der Magenschleimhaut (Evans, JR. et al. 1995; Satin et al. 2000)
- SabA: 70 kDa, bindet an das sialyl-Lewis x Antigen, fungiert als funktionaler Rezeptor für die *H. pylori* Adhäsion, assoziiert mit intestinaler Metaplasie, Atrophie und der Entstehung von Magenkarzinomen (Yamaoka 2008a)
- OMPs verschiedene Proteine der OMP-Familie, deren Funktion zum Teil noch unklar ist, zum Teil mit Adhäsion und Porinen in Verbindung gebracht wird (Carlsohn, E. et al. 2006b; Peck et al. 1999)
- HP0231: 29 kDa, noch unbekannt Funktion, hoch spezifisch für *H. pylori* (Sabarth et al. 2002)

- HpaA: Lipoprotein, 29 kDa, hoch konserviert, an Adhäsion beteiligt, essenziell für Kolonisation, erhöhtes Risiko für chronisch atrophische Gastritis (Carlsohn, E. et al. 2006a; Gao et al. 2009b)

Insgesamt erhöhen die verschiedenen Virulenzfaktoren auf unterschiedliche Weise die Pathogenität eines einzelnen Bakterienstammes. Ist ein Bakterium in der recomLine® Serologie CagA und oder VacA positiv wird es als *H. pylori* Stamm Typ I gewertet und geht mit einem erhöhten Krankheitsrisiko einher. Entsprechend werden CagA und VacA negative Stämme als Typ II gewertet und sind weniger virulent (Xiang et al. 1995).

1.1.5 Immunreaktion auf *H. pylori*

Obwohl bei jeder *H. pylori* Infektion eine angeborene und adaptive Immunantwort beobachtet werden kann, gelingt es dem Bakterium durch zahlreiche Mechanismen einer Elimination durch das menschliche Immunsystem zu entkommen. Dabei wird *H. pylori* vom angeborenen Immunsystem über die Familie der intrazellulären Nod-Rezeptoren und über die Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) erkannt. Die am besten studierten PRR für die Erkennung von *H. pylori* Infektionen sind die sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR). Diese sind an der Zelloberfläche lokalisiert und erkennen verschiedene bakterielle Produkte, wie Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane und Flagella (Mascellino et al. 2009). Die LPS von *H. pylori* lösen im Gegensatz zu anderen gram-negativen Keimen jedoch nur einen geringen proinflammatorischen Effekt aus, weil sie so modifiziert wurden, dass sie vom Immunsystem nur vermindert als Liganden erkannt werden (Khamri et al. 2005). Eine Aktivierung der TLR führt dann zu einer NF- κ B Aktivierung und letztlich zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen und Epithelzellen des Magens. Bei einer chronischen *H. pylori* Infektion wird die angeborene Immunantwort kaum mehr über die TLR vermittelt, sondern über andere Mechanismen, wie beispielsweise die Erkennung des Proteins Hsp60 (Kusters et al. 2006). Bei cag PAI positiven Stämmen erfolgt die Aktivierung der angeborenen Immunabwehr über die Familie der Nod-Rezeptoren. Nod1 erkennt das intrazelluläre, über die cag PAI injizierte Peptidoglykan, wohingegen Nod2 als extrazellulärer Rezeptor fungiert (Kusters et al. 2006).

Insgesamt reicht die angeborene Immunantwort jedoch nicht aus um die Infektion effektiv abwehren zu können. Zeitversetzt kommt es daher weiterhin zu einer ergänzenden adaptiven Immunabwehr; es werden Makrophagen, Neutrophile, Plasmazellen und Lymphozyten in der mit *H. pylori* infizierten Magenschleimhaut gefunden. Neben einer spezifischen lokalen T- und B-Zell Antwort und einer systemischen Antikörperantwort,

induziert *H. pylori* eine lokale Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (Crabtree 1996). Dabei kommt es vor allem zu einer Sekretion von Th1-geprägten proinflammatorischen Zytokinen, wie IFN- γ und IL-12 (Mattapallil et al. 2000). Da Th1-Zellen vor allem gegen intrazelluläre Infektionen gerichtet sind, führt jedoch auch die Th1 gerichtete adaptive Immunantwort nicht zu einer vollständigen Eradikation des Bakteriums. Neben den T-Zellen wird auch die humorale Immunantwort aktiviert, wodurch es zur Produktion von mukosalen und systemischen Antikörpern der Klasse IgA und IgG kommt (Mattsson et al. 1998). Die Ausbildung dieser Antikörperantwort auf das Bakterium wird zum Beispiel für die serologische Diagnostik genutzt.

H. pylori kann die Immunantwort auch direkt beeinflussen: unter anderem führen die Virulenzfaktoren VacA und gGT zu einer Inhibition der T-Zell Proliferation (Gebert et al. 2003; Gerhard et al. 2005). Außerdem fördert CagA die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Segal et al. 1999). In entzündlichen Prozessen spielt neben dem Bakterium immer auch die Genetik des Wirtes eine wichtige Rolle. Zum Beispiel können Polymorphismen in Genen, welche die Immunantwort kontrollieren, die Reaktion auf Entzündungen verstärken oder abschwächen (El-Omar 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *H. pylori* eine Reihe von proinflammatorischen als auch immunsuppressiven Effekten auslöst, die zu einer chronischen Inflammation, gleichzeitig jedoch zu keiner ausreichenden Eradikation führen. Statt Immunität kommt es zu einer Toleranz gegenüber dem Bakterium.

1.1.6 Diagnostik

Die Diagnostik von *H. pylori* gliedert sich in invasive und nicht-invasive Methoden. Zu den invasiven Verfahren zählen der Urease Schnelltest, die Histologie und die Mikrobiologie, wobei jeweils die Durchführung einer Magenspiegelung Voraussetzung ist. Im Fall von nicht-invasiven Methoden, wie dem Atemtest, dem Stuhl-Antigen-Test und der Serologie, wird eine Magenspiegelung hingegen nicht benötigt.

In einer gemeinsam mit dem Nationalen Referenzzentrum für *Helicobacter pylori* durchgeführten Umfrage wurden praktizierende Gastroenterologen zu Diagnostik, Therapie und Impfprävention der *H. pylori* Infektion befragt. Um die Relevanz der Serologie im klinischen Alltag festzustellen, wurden die Umfrageteilnehmer zu ihren Präferenzen in der Diagnostik von *H. pylori* befragt. Die Ergebnisse dieser Umfrage sind in Abbildung 5 dargestellt. Dabei lag die Histologie mit 86,8% (446/514 Antworten) klar an der ersten Stelle, gefolgt von dem Atemtest mit 35,6% (148/416), der Mikrobiologie mit 35,2%, (156/443) und

dem Stuhl-Antigen-Test mit 27,6% (113/410). Von 53,4% (212/397) der befragten Ärzte wurde die Serologie als letzte Präferenz angegeben. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die Serologie in der gegenwärtigen gastroenterologischen Praxis nur selten Anwendung findet.

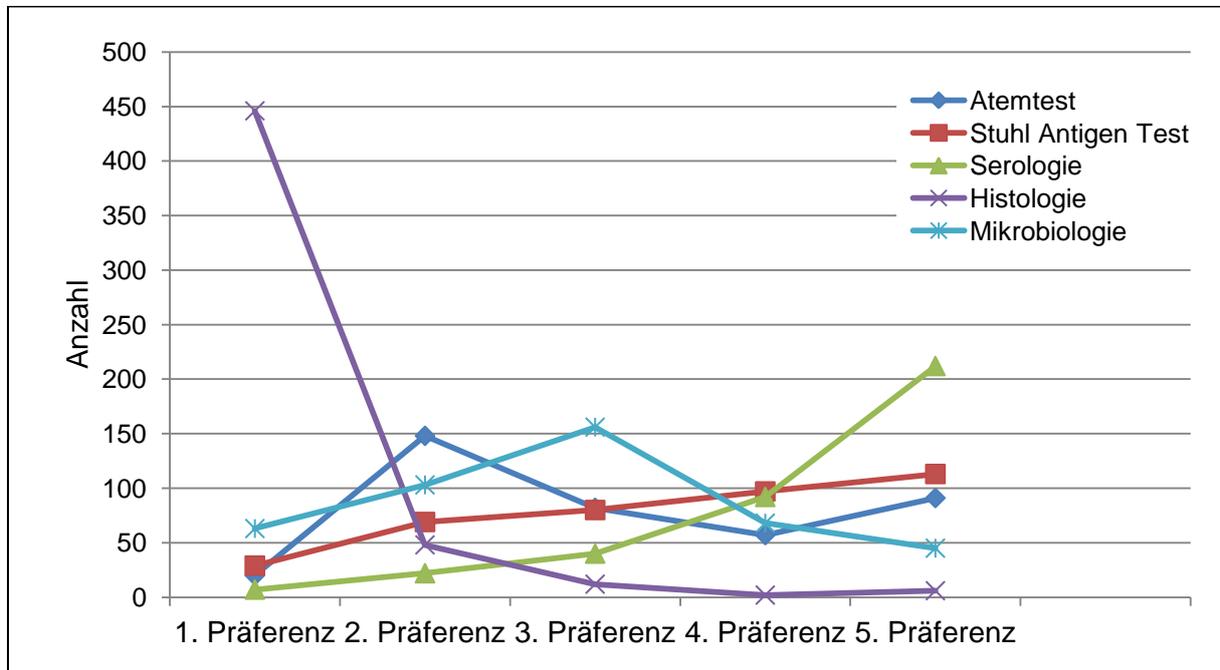


Abbildung 5: *H. pylori* Testverfahren nach Präferenz

Im Folgenden wird nun auf die einzelnen Verfahren näher eingegangen.

1.1.6.1 Invasive Diagnostik

Bei klinischem Verdacht auf eine *H. pylori* Infektion werden im Rahmen einer Magenspiegelung meist Biopsien aus dem Magenantrum entnommen, weil sich hier das Bakterium bevorzugt aufhält. Da *H. pylori* sich außerdem diskontinuierlich fleckenförmig ausbreitet wird eine routinemäßige Entnahme von zwei Biopsien aus dem Antrum und Corpus empfohlen, um die Sensitivität des Tests zu erhöhen (Enomoto et al. 1998). Weiterhin werden aus auffälligen Schleimhautarealen Proben entnommen. Entnommene Proben können direkt durch einen Urease Schnell Test auf *H. pylori* untersucht werden. Der Schnelltest kann einen gesteigerten pH-Wert messen, dieser resultiert aus der von der Urease katalysierten Umsetzung von Harnstoff zu Ammoniak.

Die Histologie ist der aktuelle Goldstandard zur Diagnostik von *H. pylori*. Die Schleimhautproben werden dazu in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend geschnitten. Die Präparate werden nach dem Schema der Updated Sydney Klassifikation

beurteilt (Dixon et al. 1996; Stolte und Meining 2001). Der Grad der Gastritis ist dabei an dem Ausmaß der Schleimhautinfiltration mit Lymphozyten und Plasmazellen erkennbar. Die Aktivität der Entzündung lässt sich über den Umfang der Schleimhautinfiltration mit neutrophilen Granulozyten abschätzen. Es gibt keine spezifische Färbemethode für die Identifikation von *H. pylori*, diverse Spezialfärbungen, wie die Warthin-Starry Färbung, erlauben jedoch eine bessere Darstellung der Bakterien gegenüber der routinemäßig durchgeführten HE Färbung.

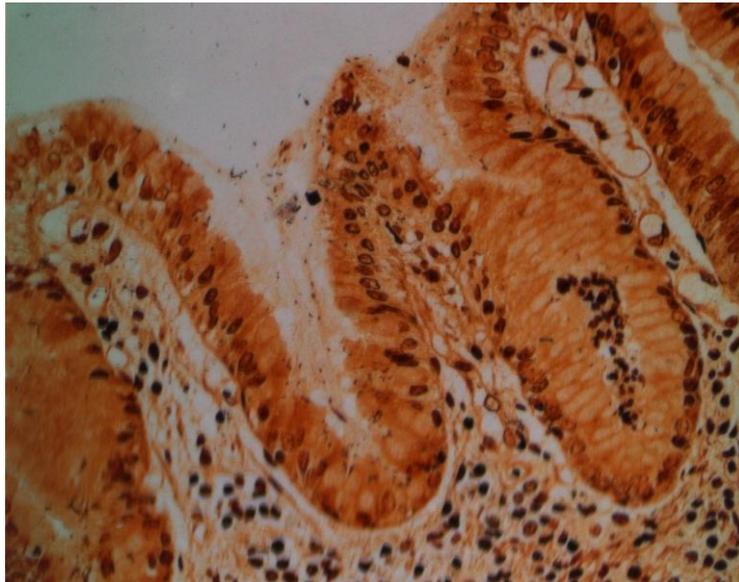


Abbildung 6: Färbeergebnis Warthin-Starry

Helicobacter stellt sich in der Warthin-Starry Färbung braun bis schwarz dar, der Hintergrund – die Magenschleimhaut – färbt sich blass-gelb bis hellbraun. Mit freundlicher Genehmigung von Raquel Mejias Luque (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München)

Neben der Identifikation von *H. pylori* kann die histologische Begutachtung weiterhin mögliche Differenzialdiagnosen gastrointestinaler Symptome, wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Autoimmun- oder NSAR- induzierte Gastritiden, ausschließen (Guarner et al. 2010).

Einen negativen Aspekt der Histologie stellt die in der Praxis zum Teil mangelnde Reliabilität dar. So hängt die Qualität der Ergebnisse immer auch von der Expertise des Pathologen sowie der für die Diagnostik verfügbaren Zeit ab. Vor allem im Fall von Schleimhautatrophie kann es zu falsch negativen Ergebnissen kommen (Testoni et al. 1996). Trotzdem stellt die Histologie unter optimalen Bedingungen eines der sensitivsten und spezifischsten Verfahren in der Diagnostik von *H. pylori* dar (Mégraud und Lehours 2007).

Eine weitere invasive Methode ist die mikrobiologische Kultur. Dazu werden die Probeexzisionen auf einem speziellen Nährboden ausgestrichen und mikroaerophil bebrütet. Kommt es zu einem Wachstum *H. pylori* typischer Kulturen werden diese durch eine positive Oxidase und Katalase Reaktion gesichert. Gegebenenfalls kann weiterhin eine Resistenztestung der angewachsenen Keime erfolgen. Ein positiver Kulturnachweis von *H. pylori* spricht immer für eine *H. pylori* Infektion. Während die Spezifität der Kultur als einziges Verfahren konstant bei 100% liegt, ist die Sensitivität dieser Methode vergleichsweise gering. Dies liegt unter anderem daran, dass das Anwachsen einer *H. pylori* Kultur maßgeblich von der Art und Dauer des Transports der Probeexzision abhängt (Mégraud und Lehours 2007). Die Anlage einer mikrobiologischen Kultur wird vor allem im Rahmen einer Resistenztestung empfohlen, um eine resistenzgerechte Therapie des Keimes zu gewährleisten, insbesondere nach Versagen einer ersten antibiotischen Therapie.

Keine Verwendung in der Routinediagnostik findet hingegen die PCR. Dabei wird bakterielle DNA entweder aus den histologischen Schnittpräparaten oder direkt aus einer Magenschleimhautbiopsie gewonnen. Zwar kann in der PCR das Vorkommen einzelner Virulenzfaktoren in der DNA analysiert werden (Lage et al. 1995), allerdings ist diese Methode für den alltäglichen Gebrauch zu zeit- und kostenintensiv. In Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass in 20% der Histologie falsch negativen Fällen, die PCR diagnostische Vorteile bringt (Zsikla et al. 2006).

1.1.6.2 Nicht-invasive Diagnostik

Im Gegensatz zu der invasiven Diagnostik werden für die nicht-invasive Diagnostik keine Magenschleimhautbiopsien und somit keine Endoskopie benötigt – sie ist daher vergleichsweise kostengünstig, weniger zeitintensiv und einfach zu handhaben (Sabbi et al. 2005). Als Grundlage für die einzelnen Testsysteme dienen die Atemluft, Blut und Stuhl. Ein Nachweis von *H. pylori* kann außerdem im Speichel und im Urin erfolgen, was in der Routinediagnostik jedoch nicht herangezogen wird.

Der Atemtest gilt neben der Histologie als alternativer Goldstandard (Fock et al. 2009). Er basiert auf der Fähigkeit von *H. pylori* durch das Enzym Urease Harnstoff in Ammoniak und Kohlenstoffdioxid zu spalten. Dabei wird dem Patienten zunächst Harnstoff oral zugeführt, in welchem radioaktiv markierter Kohlenstoff (C^{13}) gebunden ist. Nach der Spaltung wird das markierte Kohlenstoffdioxid freigesetzt und über die Atemluft abgeatmet (Atherton und Spiller 1994). Ein Atemtest ist dementsprechend nur dann positiv, wenn das *H. pylori* Enzym Urease auch tatsächlich im Magen vorliegt, also eine aktive Infektion vorliegt. Jedoch muss

auch eine Mindestanzahl von 10^5 Bakterien im Magen vorhanden sein, damit eine ausreichend hohe Urease Antwort detektiert werden kann (Mégraud und Lehours 2007). Die Anzahl an Bakterien kann zum Beispiel bei einer Therapie mit PPI oder nach Magenteilresektion unterhalb dieser Nachweisgrenze liegen (El-Nujumi et al. 1998; Oak et al. 2011). Außerdem ist der Atemtest abhängig von der Mitarbeit des Patienten sowie relativ kostenintensiven Apparaturen (Mégraud und Lehours 2007). Anwendung findet der Atemtest vor allem in der Verlaufskontrolle nach Eradikationstherapie (Marshall und Surveyor 1988). Außerdem stellte er in der *H. pylori* Diagnostik von Kindern eine ähnlich sensitive Alternative zu der Histologie dar (Mégraud 2005).

Der Stuhl-Antigen-Test erkennt *H. pylori* Proteine im Stuhl. Dazu werden Stuhlproben auf Platten aufgetragen, die polyklonale oder monoklonale Antikörper gegen *H. pylori* Proteine enthalten. Die gebundenen Antigene sind anschließend mittels ELISA nachweisbar. Problematisch ist dabei, dass es häufig zu einem starken Abbau der Antigene im gastrointestinalen Trakt kommt, was vermehrt falsch negative Ergebnisse zur Folge hat (Monteiro et al. 2001a).

Im Rahmen von epidemiologischen Screening Ansätzen größerer Populationen ist die Serologie mittlerweile das Mittel der Wahl. Für den Einsatz von serologischen Testverfahren sprechen vor allem deren Kosteneffizienz sowie die einfache Handhabung. Nachteile der Serologie sind unter anderem eine zum Teil geringe Sensitivität, da einige der verwendeten Antigene geringe Prävalenzen aufweisen. Weiterhin erfolgt durch die Serologie – im Gegensatz zum Atemtest – kein Nachweis einer aktiven *H. pylori* Infektion. Bei einem positiven Ergebnis kann also nicht zwischen einer aktiven und einer bereits therapierten Infektion unterschieden werden, weshalb eine weitere Abklärung nötig ist. Auch kann die Serologie nach Eradikation nicht zur Überprüfung des Therapieerfolges herangezogen werden, da die Antikörperantwort meist erst nach einem halben Jahr abfällt und in Einzelfällen auch über Jahre persistieren kann (Mégraud und Lehours 2007; Kosunen et al. 1992). Es sind diverse serologische Testverfahren auf dem Markt, wobei die meisten auf einem ELISA mit einem *H. pylori* Lysat oder rekombinanten Antigenen basieren. Der Fokus liegt hier auf der IgG Immunantwort mit der Möglichkeit, IgA Antikörper bei falsch-negativen IgG Ergebnissen hinzuzuziehen (Jaskowski et al. 1997).

Die vorliegende Arbeit setzt sich nun mit der Validierung eines neuen recomLine[®] Testsystems auseinander, das auf sechs rekombinant hergestellten *H. pylori* Antigenen basiert. Darüber hinaus wurden ein ELISA (recomWell[®]) und ein Lysat blot (Immunoblot[®]) verwendet. Eine genaue Beschreibung der drei serologischen Testsysteme erfolgt im Unterkapitel 3.1.4 (Serologie) des Methoden-Teils. Wie bereits erwähnt besteht ein

wesentlicher Vorteil des recomLine® darin, dass er die Einteilung von *H. pylori* in Typ I und Typ II erlaubt. Im Rahmen der bereits erwähnten Untersuchung, die in Kooperation mit dem Nationalen Referenzzentrum für *Helicobacter pylori* durchgeführt wurde, wurde neben der Präferenz für die einzelnen Testverfahren auch nach dem Einsatz eines serologischen Tests für den Fall gefragt, dass dieser einen prädiktiven Wert besitzt. Dazu gehört beispielsweise die Früherkennung von Patienten mit hohem Magenkarzinomrisiko bei chronischer Infektion mit *H. pylori*. Hier gaben 54,6% (259/474) der befragten Ärzte an, dass sie einen solchen Test einsetzen würden; weitere 35,3% würden dies wahrscheinlich tun. Daraus kann geschlossen werden, dass insgesamt ein großer Bedarf nach einem solchen neuartigen Testsystem besteht.

Die folgende Tabelle gibt abschließend einen Überblick über die einzelnen Gütekriterien der erläuterten diagnostischen Verfahren.

Tabelle 2: Sensitivität und Spezifität der diagnostischen Verfahren zur Detektion einer *H. pylori* Infektion modifiziert nach (Gisbert et al. 2006)

		Sensitivität %	Spezifität %
invasive Methoden	Kultur (3 Studien/ 314 Patienten)	45 (95% CI [39-51])	98 (95% CI [92-100])
	Histologie (10 Studien/ 827 Patienten)	70 (95% CI [66-74])	90 (95% CI [85-94])
	Urease Schnelltest (16 Studien/ 1417 Patienten)	67 (95% CI [64-70])	93 (95% CI [90-96])
	PCR* (1 Studie/ 99 Patienten)	93 (95% CI [88–98])	96 (95% CI [92–100])
nicht-invasive Methoden	Atemtest (8 Studien/ 520 Patienten)	93 (95% CI [90-95])	92 (95% CI [87-96])
	Stuhl-Antigen-Test (6 Studien/ 377 Patienten)	87 (95% CI [82-91])	70 (95% CI [62-78])
	Serologie (9 Studien/ 803 Patienten)	88 (95% CI [85-90])	69 (95% CI [62-75])

*(Monteiro et al. 2001b)

1.1.7 Therapie und Antibiotikaresistenzen

Die Therapie einer *H. pylori* Infektion wird von der European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG) gemäß den Maastricht-Leitlinien bei folgenden Indikationen empfohlen (Malfertheiner et al. 2012):

- Gastroduodenale Ulzera mit positiven *H. pylori* Nachweis (Evidenzgrad 1a)
- MALT-Lymphom, bei frühen Stadien als kurative Therapie (Evidenzgrad 1a)
- Eisenmangelanämie unbekannter Ätiologie (Evidenzgrad 1a)
- Atrophische *H. pylori* Gastritis (Evidenzgrad 1b)
- Positive Familienanamnese eines Magenkarzinoms (Evidenzgrad 1b)
- Vor Dauertherapie mit NSAR zur Ulcus Prophylaxe (Evidenzgrad 1b)
- Idiopatische Thrombozytopenische Purpura unbekannter Ätiologie (Evidenzgrad 1b)
- Zustand nach Magenteilresektion, Resektion eines Magenfrühkarzinoms (Evidenzgrad 1c)
- Vitamin B12 Mangel unbekannter Ätiologie (Evidenzgrad 3b)

Nachgewiesenermaßen verhindert eine Eradikationstherapie das Fortschreiten von Schleimhautatrophien und die Entwicklung von Magenkrebs (Wong et al. 2004). Außerdem werden Ulzerationen geheilt und Rezidive vermindert (Marshall et al. 1988). Neben den gesundheitlichen Vorteilen ist die Eradikationstherapie von *H. pylori* zur Prävention von Ulzerationen und Magenkrebs auch kosteneffizient (Ford et al. 2004; Lee et al. 2007).

Die Behandlung des Bakteriums *H. pylori* erfolgt mit einer antibiotischen Therapie, die auch als Eradikation bezeichnet wird. Es gibt zwei Standard-Therapie Schemata. Zum einen ist dies die französische Triple Therapie bestehend aus einem Protonenpumpeninhibitor (PPI), Amoxicillin und Clarithromycin. Zum anderen ist die italienische Triple Therapie zu nennen, die aus einem PPI, Metronidazol und Clarithromycin besteht. Monotherapien und Dualtherapien werden aufgrund verminderter Wirksamkeit hingegen nicht eingesetzt (Bayerdörffer et al. 1993).

Tabelle 3: Therapie Schemata zur *H. pylori* Eradikationstherapie

französische Triple-Therapie	italienische Triple-Therapie
PPI: 2 x Standarddosis / Tag	PPI: 2 x Standarddosis / Tag
Amoxicillin: 2 x 1000 mg / Tag	Metronidazol: 2 x 400 mg / Tag
Clarithromycin: 2 x 500 mg / Tag	Clarithromycin: 2 x 250 mg / Tag
Therapiedauer: 7 Tage	Therapiedauer: 7 Tage

Im Folgenden wird kurz auf die einzelnen Medikamente sowie ihre Nebenwirkungen eingegangen.

Protonenpumpeninhibitoren sind die effektivsten Hemmer der HCl-Produktion im Magen und im Allgemeinen sehr gut verträglich (Thomson et al. 2010). Gängige Präparate sind Omeprazol (Standarddosierung 20 mg) und Pantoprazol (Standarddosierung 40 mg), es wird zur Erhöhung der Wirksamkeit die doppelte Standarddosis verwendet (Buzás 2010).

Amoxicillin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der β -Lactam Antibiotika und hemmt somit die bakterielle Zellwandsynthese. Wie alle Penicilline kann auch Amoxicillin zu allergischen Reaktionen führen. Weitere Nebenwirkungen sind Arzneimittelfieber, Durchfälle, Übelkeit und Erbrechen. Bei bekannter Allergie kann Amoxicillin durch Rifabutin oder Tetracyclin ersetzt werden.

Metronidazol ist ein Vertreter aus der Gruppe der Imidazole und führt zu DNA-Strangbrüchen der bakteriellen DNA. Es darf aufgrund teratogener Wirkung nicht in der Schwangerschaft und Stillperiode angewandt werden. Nebenwirkungen äußern sich als zentralnervöse oder gastrointestinale Beschwerden. In seltenen Fällen sind außerdem Thrombozytopenien und Agranulozytosen beschrieben.

Clarithromycin ist ein Makrolidantibiotikum, das die Translokation an den bakteriellen Ribosomen hemmt und dadurch die Proteinbiosynthese stört. Clarithromycin inhibiert das Isoenzym CYP3A4 und führt zur Akkumulation von Arzneimitteln, die über dieses Cytochrom P450-Isoenzym abgebaut werden. Davon betroffen sind unter anderem Medikamente wie zum Beispiel Statine, Benzodiazepine, Antiarrhythmika und viele weitere. Eine Anpassung der Dosis muss bei eingeschränkter Nieren- und Leberfunktion erfolgen. Häufige Nebenwirkungen sind gastrointestinale Beschwerden, Störungen des Geruchs- und Geschmackssinns, sowie gelegentliche Überempfindlichkeitsreaktionen. Weiterhin sind bei multimorbiden Patienten auch Todesfälle im Zusammenhang mit Clarithromycin beschrieben.

Generell ist die italienische Triple Therapie besser verträglich als die französische, sollte jedoch nur bis zu einer Resistenz von unter 40% gegenüber Metronidazol angewandt werden (Fischbach et al. 2009). Insgesamt liegen die Erfolgsraten der Triple Therapien bei über 80% (Castro-Fernández et al. 2009). Mögliche Ursachen für ein Versagen der First Line Therapie sind hauptsächlich steigende Resistenzen, aber auch mangelnde Compliance, Nikotin, Polymorphismen von CYP 2C19 und Reinfektion über die orale Plaque (Castro-Fernández et al. 2009; Riggio und Lennon 1999). Laut der S3-Leitlinie „*Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulcuskrankheit“ der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten muss nach Therapieversagen unter Berücksichtigung der First Line Therapie keine Resistenztestung vor Second Line Therapie erfolgen (Fischbach et al. 2009). Jedoch ermöglicht eine Resistenztestung eine testgerechte Therapie mit Antibiotika, die gegen individuelle Stämme wirksam sind und sollte daher spätestens nach erfolgloser Second Line Therapie erfolgen.

Insgesamt sind die Resistenzraten gegenüber *H. pylori* wirksamen Antibiotika steigend. Die folgende Tabelle gibt die primären Antibiotikaresistenzen aus dem Zeitraum 2006 – 2009 an.

Tabelle 4: Antibiotikaresistenzen modifiziert nach (Francesco et al. 2010)

Clarithromycin	Metronidazol	Amoxicillin	Levofloxacin	Tetracyclin	Rifabutin
17,2%	26,7%	11,2%	16,2%	5,9%	1,4%

Amoxicillin induziert in der Regel geringe Resistenzen und kann daher bei einer Second Line Therapie erneut eingesetzt werden. Dahingegen ist die Wahrscheinlichkeit einer Resistenz gegen Imidazole nach Therapieversagen verhältnismäßig sehr hoch; diese sollten daher nicht wiederholt eingesetzt werden. In solchen Fällen können als Reserveantibiotika moderne Chinolone wie Levofloxacin und Moxifloxacin eingesetzt werden. In asiatischen Ländern bietet sich Levofloxacin jedoch nicht an, da hier primäre Resistenzen von um die 15% gefunden werden (Miyachi et al. 2006). Eine erhöhte Resistenzbildung wird auch gegenüber Clarithromycin beobachtet (Sasaki et al. 2010). Die Daten zeigen, dass nicht nur eine genaue Beobachtung der Antibiotika-Resistenzen zur besseren Therapieeinstellung nötig ist, sondern auch eine genaue Abwägung der Therapieindikation erfolgen sollte, um unnötige Resistenzbildungen zu vermeiden.

1.2 Ziele und Fragestellung dieser Arbeit

Über die Hälfte der Weltbevölkerung ist mit dem Bakterium *H. pylori* infiziert, das mit seinen möglichen pathogenen Auswirkungen eines der wichtigsten globalen Gesundheitsprobleme darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurde bereits ausführlich auf möglichen Folgen einer *H. pylori* Infektion, wie beispielsweise Magenkarzinome und MALT-Lymphome, eingegangen. Es ist unumstritten, dass *H. pylori* in diesem pathogenen Zusammenhang eine hohe Anzahl an Todesopfern fordert. Mit der Antibiotika-Therapie gibt es zwar ein probates Mittel um die Infektion mit *H. pylori* zu behandeln, jedoch wurde in den bisherigen Ausführungen mehrfach deutlich, dass eine Eradikation der halben Weltbevölkerung weder aus ökonomischen noch aus gesundheitlichen Aspekten vertretbar ist. Eine weitere Abklärung der *H. pylori* Infektion ist deshalb sinnvoll, weil dadurch unnötige Kosten, Nebenwirkungen und vermehrte Antibiotika Resistenzen vermieden werden können. Die Histologie, der Goldstandard in der Diagnostik von *H. pylori*, erlaubt die Identifikation von den Bakterien sowie eine Beurteilung der Magenschleimhaut. Der Grad und die Aktivität der Gastritis, prä-maligne Veränderungen wie Atrophie und intestinale Metaplasie sowie maligne Veränderungen der Magenschleimhaut können in den histologischen Schnitten analysiert werden. Nachteile dieses Verfahrens sind jedoch die eingeschränkte Verfügbarkeit der für die Histologie notwendigen Magenspiegelung bzw. der damit verbundene Kostenaufwand. Diese moderne Diagnostik der Magenspiegelung ist vor allem in den Entwicklungsländern am seltensten vertreten – wo die Prävalenz der *H. pylori* Infektion am höchsten ist. Dort sind vor allem kosteneffiziente, schnell durchführbare und reliable Tests von großer Wichtigkeit. Da in Bezug auf die herkömmliche Serologie meist eine reduzierte Sensitivität beklagt wird, war das Ziel dieser Arbeit, ein sensitives und spezifisches serologisches Testsystem, den recomLine[®], zu etablieren.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Validierung des recomLine[®] an einer neu etablierten Kohorte von 1350 Studienteilnehmern. Ziel des recomLine[®] ist es dabei, die Patienten anhand der serologischen Immunantwort in Risikogruppen einzuteilen. Dadurch sollen die Patienten identifiziert werden, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinomes haben und die letztendlich von einer Eradikationstherapie profitieren würden. Proteine wie CagA und VacA, die einzeln auf dem recomLine[®] erkannt werden können, tragen dazu bei, diese Risikogruppe zu identifizieren. Die vorliegende Arbeit verfolgt nun das Ziel, erste Hypothesen bezüglich dieser prädiktiven Aussagen des recomLine[®] zu testen. Außerdem sollen Antigenerkennungsmuster der sechs Antigene im recomLine[®] geprüft werden, die für ein erhöhtes Krankheitsrisiko sprechen könnten. Da sich weitere Antigene zurzeit in Testung für eine weitere Version des recomLine[®] befinden, sollen zur

optimierten Anpassung die aktuell vorhandenen sechs Antigene bezüglich ihrer Aussagekraft und Effizienz betrachtet werden. Neben der Beurteilung des recomLine® selbst soll zudem die Vergleichbarkeit des recomLine® in Bezug auf andere serologische Verfahren als auch auf den Goldstandard der Histologie geprüft werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der recomLine® ein vielversprechendes Testverfahren darstellt, das eine Risikoeinteilung von Patienten ermöglicht. Erste Validierungen wurden in dieser Arbeit vorgenommen.

2 Material

2.1 Bakterien

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei *H. pylori* Stämme verwendet. Diese dienen als Positivkontrollen bei der Sequenzierung von PCR Produkten aus *H. pylori* Stämmen, die aus humanen Magenschleimhautproben gewonnen wurden. Als Positivkontrolle der cag-PAI diente der Stamm G27, der unter anderem diese Pathogenitätsinsel codiert.

H. pylori G27 (Baltrus et al. 2008)

Patientenisolat aus Italien

H. pylori 26695 (Tomb et al. 1997)

Patientenisolat aus Großbritannien

2.2 Oligonukleotide

Soweit nicht anders vermerkt wurden die für die PCR Amplifikationen benötigten Oligonukleotide von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Die Auswahl der einzelnen Primer wird in dem Abschnitt 3.2.1 Design der Primer beschrieben. Die Sequenz und die jeweilige Verwendung der Oligonukleotide sind den folgenden Tabellen zu entnehmen.

Tabelle 5: Verwendete Screening Primer sense

No.	Kürzel	n [bp]	T _M [°C]	GC-Gehalt	Sequenz (5'→ 3')
1	gGT	20	59,4	55 %	ATTCGCATCGCCCCCTACTA
2	BabA	19	45,9	26 %	AATCCAAAAAGGAGAAAA
3	HcpC	21	59,8	52 %	TATATTACAGCGGGCAAGGCG
4	CagA	29	63,9	41 %	CTGCAGTAGTGACTAACGAAACCATTAAC
5	VacA	21	52,0	33 %	ATGGAAATACAACAAACACAC
6	UreA	23	59,2	39 %	ATGAAACTCACCCCAAAGAGTT
7	HtrA	23	59,2	39 %	GTGGGGATTAATACCGCTATTAT
8	ICD	20	59,4	55 %	GCAGCGGCATAGGGGTAAAA
9	NapA	20	59,4	55 %	TTTGCAAGCGGATGCGAT

10	SabA	20	59,4	55 %	GGCTATCAAATCGGCGAAGC
11	Omp1	20	57,3	50 %	AATCGGTGAAGCCGCTCAA
12	Omp15	36	70,9	36 %	ATAGGATCCATGAAAAAGTTTGTAGCTTTA GGGCTT
13	HP0231	29	63,3	31 %	TCTCTATTCTTGAAAAGATTTATTCCACC
14	GroEL	20	55,3	45 %	GAAGGCATTATTGACCCCTT
15	HpaA	22	58,4	46 %	ATTAAACCACACAGAGCCTGAG

Tabelle 6: Verwendete Screening Primer antisense

No.	Kürzel	n [bp]	T _M [°C]	GC- Gehalt	Sequenz (5' → 3')
1	gGT	20	59,4	55 %	GAAGCGATGCGTCAGGCTTA
2	BabA	18	58,2	61 %	CTTTGAGCGCGGGTAAGC
3	HcpC	20	59,4	55 %	CACCCCGGGCTGTCTTTTAA
4	CagA	30	65,4	43 %	CCCGGGTTATCCATTTTTTTCTGCTTCTTG
5	VacA	19	56,7	53 %	CTCCAGAACCCACACGATT
6	UreA	29	59,9	25 %	TTACTCCTTAATTGTTTTTACATAGTTG
7	HtrA	21	63,2	57 %	ATCTTGCAAGCCCACGCCCAA
8	ICD	20	59,4	55 %	GCCGCTAACGCATCAGAGAT
9	NapA	22	60,3	50 %	ATCGTCCGCATAAGTTACGGTG
10	SabA	19	50,2	37 %	TAGTTGTTGTTGGTAAAGC
11	Omp1	20	59,4	55 %	GCCGCTAACCCCGTTGTTAT
12	Omp15	35	68,2	31 %	TATCTCGAGAAAAGTGTAGTTATACCCCAA ATAAA
13	HP0231	23	60,9	43 %	CCCTTAATCACGCCAGATTCAA
14	GroEL	20	57,3	50 %	TTACATCATGCCACCCATGC
15	HpaA	25	58,1	36 %	GTGTTGCGTTTTCAAGATGAAAAAG

2.3 Chemikalien und Kits

Soweit nicht anders gekennzeichnet, stammen alle in dieser Doktorarbeit verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen).

Bench top ladder	Promega, Mannheim
Green Taq Ready Mix	Promega, Mannheim
Immunoblot® <i>Helicobacter</i> IgG	Mikrogen, Neuried
PureLink Genomic DNA Mini Kit	Invitrogen, Darmstadt
RecomLine® <i>Helicobacter</i> IgG	Mikrogen, Neuried
RecomWell® <i>Helicobacter</i> IgG	Mikrogen, Neuried

2.4 Lösungen, Puffer und Nährmedien

Agarosegel	Agarose 1% in TAE gelöst
BHI-Medium	3,7% (w/v) BHI Broth (ICN) autoklavieren, auf ca. 60°C abkühlen, mit Dent Antibiotikum versetzen, bei 4°C lagern
Dent (<i>H. pylori</i> -Selekt-Supplement)	5 mg Vancomycin 2,5 mg Trimethoprim 2,5 mg Cefsulodin 2,5 mg Amphotericin B ad 500 ml Aqua dest.
Einfriermedium für <i>H. pylori</i>	BHI-dent Medium 20% Glycerin (Appli Chem, Darmstadt) 10% FCS
LB-Agar	0,5% (w/v) NaCl 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1,0% (w/v) Trypton 1,5% (w/v) Agar pH 7,4 (NaOH) autoklavieren, auf ca. 60°C abkühlen, mit Antibiotikum versetzen, in Kulturschalen

	gießen, erkalten lassen, bei 4°C lagern
TAE	40 mM Tris Base 1 mM EDTA (Appli Chem, Darmstadt) 0,7% (v/v) Essigsäure (100%) pH 7,0 (NaOH)
Wilkins-Chalgren-Agar (WC)	4,3% (w/v) WC Agar (Oxoid) siehe LB-Agar (oben), als Antibiotikum Dent Supplement verwenden

2.5 Hilfsmittel

Autoklaven-Indikatorband	3M
Bakterienkulturschalen	BD Falcon
Gestopfte Pipetten-Spitzen (TipOne)	Starlab
Glasgeräte (Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Messzylinder, Schraubverschlussflaschen etc.)	Schott, Duran
Kryoröhrchen (1,5 ml)	Nalgene; Sarstedt
Multipipette und Spitzen	Eppendorf
Parafilm	Parafilm, Bemis, USA
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Biozym
Plastik-Drygalskyspatel (steril)	VWR
Safe Lock Reaktionsgefäße (0,5, 1, 2 ml)	Eppendorf
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	BD Labware
Serum-Monovette (9 ml)	Sarstedt
Stieltupfer (steril)	Lohmann & Rauscher; Raucotupf
Stickstofftank	KGW Isotherm
Untersuchungshandschuhe (Latex, Nitril)	Meditrade
Waagen Precisa	Pesa Waagen
Zellstofftücher fusselfrei	Kimberly-Clark

2.6 Geräte

Brutschrank	Mytron; Shimaden (Esters)
Eagle-Eye (Geldokumentation)	Biorad, München
Gelelektrophoresekammer	Amersham Pharmacia, Dübendorf; Biorad
Gefrierschrank -20°C	Gorenje, Velenje
Gefrierschrank -80°C	Thermo Scientific, Osterode
Heizblock/Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Kühlschrank 4 – 8°C	Liebherr, Kirchdorf
Mikrowelle 1100W	Panasonic, Hamburg
PCR-Cycler, iCycler	Biorad, München
pH-Meter (pH720)	InoLab, Singapur
Powersupply PowerPac 300	Biorad, München
ProfiBlot 48	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Spectrophotometer NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific, Osterode
Spektrometer Sunrise TECAN	MediTech, Wedemark
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Vortex Schüttler	Bender & Hobein AG, Bruchsal; Heidolph, Schwabach
Zentrifuge, Biofuge primo	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Centrifuge5424	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Megafuge 1.0 RS	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, 3SR	Heraeus, Hanau

2.7 Software und Datenbank

Die Datenbank wurde in Microsoft Excel 2007 angelegt und gepflegt. Die statistische Auswertung erfolgte über IBM SPSS Statistics 19.

Für die Auswertung des ELISA wurde die Software Magellan3 verwendet.

3 Methoden

3.1 Erstellung des Patientenkollektivs

Für die Studie wurden Patienten aus dem Klinikum Rechts der Isar, München, der gastroenterologischen Praxis Dr. med. B. Birkner, München sowie dem Magen-Darm-Zentrum, Bayreuth eingeschlossen. Somit handelt es sich um eine trizentrische Untersuchung, im folgenden Verlauf wird jedoch der Übersichtlichkeit her nur auf die Bayreuther oder die Münchener Untergruppe verwiesen.

Insgesamt wurden 1424 Patienten in die Studie aufgenommen, bei denen jeweils eine ambulante Spiegelung des oberen Magen-Darm-Traktes durchgeführt wurde. Bei 49 Patienten wurde keine Biopsie entnommen, diese sind somit aus dem Patientenkollektiv heraus gefallen. Des Weiteren wurden 15 Patienten zur Verlaufskontrolle erneut endoskopiert und weitere 10 Patienten im Nachhinein aufgrund aktiver Immuntherapien oder Tumorleiden von der Studie ausgeschlossen. Somit blieben 1350 Fälle zur weiteren Untersuchung.

Für die Patientenstudie wurde im Jahr 2009 unter dem Studientitel „Evaluation von *Helicobacter pylori* Subtypen, entzündungsassoziierten Polymorphismen und (prä)kanzerösen Veränderungen in der Magenschleimhaut“ ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München eingeholt.

3.1.1 Studienteilnehmer

Die Patienten kamen zur Spiegelung des oberen Magen-Darm-Traktes in eine der oben genannten Einrichtungen. Patienten mit folgenden Beschwerden wurden in die Studie eingeschlossen:

- Unklare Oberbauchschmerzen, Dyspepsie
- Hämatemesis
- Unklare Gewichtsabnahme
- V.a. Gastritis, Ulcus ventriculi/ duodeni, Karzinom
- Karzinomvorsorge

Ausschlusskriterien waren:

- Gerinnungsstörungen, Einnahme gerinnungshemmender Substanzen

- Bekanntes Tumorleiden
- Einnahme von Immunsuppressiva

Es erfolgte die Aufklärung und schriftliche Einwilligung der Patienten in die Studie.

Für die Studie wurden während der Routineuntersuchungen zusätzlich zu den regulär abgenommenen Magengewebeprobe weitere 2 – 4 Gewebeprobe aus dem Bereich des Antrum und ggf. Corpus entnommen. Des Weiteren wurde jeweils 1 Serum-Röhrchen (ca. 10ml) venöses Blut abgenommen.

Folgende Punkte der Befunde wurden erfasst:

- Patientenstammdaten (Initialen, Geburtsdatum, Alter, Geschlecht)
- Ggf. Beschwerden/ Indikation zur Untersuchung
- Ggf. Vorerkrankungen
- *H. pylori* Status in Histologie und ggf. Mikrobiologie, Serologie

Die gesamte Liste der Daten findet sich im Anhang in Tabelle 22.

3.1.2 Gewinnung und Lagerung der Magenbiopsien

Die Magenbiopsien wurden während der Magenspiegelung gewonnen. Die Endoskopie erfolgte bei einem Teil der Patienten unter lokaler Betäubung des Rachenrings oder unter Sedierung mit ca. 30 – 60 ml Propofol i.v. als Bolus. Nach Einführung des Endoskops erfolgte die Inspektion des Duodenums und des Magens.



Abbildung 7: Endoskopische Sicht auf eine unauffällige Magen Antrum Schleimhaut

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. B. Birkner

Anschließend erfolgte die Biopsie. Bei unauffälligem Befund wurden 2 Proben aus dem Antrum entnommen, ansonsten wurden weitere Proben aus suspekten Arealen gewonnen. Die entnommenen Gewebeproben wurden in 10%igem Formalin konserviert an das jeweilige Pathologische Institut (Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München und Institut für Pathologie des Klinikum Bayreuth) zur histologischen Begutachtung geschickt.

Bei den Münchener Patienten wurden zwei zusätzliche Magenbiopsien für die Studie entnommen. Eine Gewebeprobe davon wurde sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Eine weitere Gewebeprobe wurde in BHI-dent Medium zwischengelagert, um am selben Tag als mikrobiologische Kultur angelegt zu werden.

3.1.3 Bestimmung des *H. pylori* Infektionsstatus

Es erfolgte die Einteilung der Studienteilnehmer in *H. pylori* positive, negative und eradizierte Fälle. Die negativen und positiven *H. pylori* Fälle wurden über die Histologie und falls vorhanden auch über die Kultur definiert. Die eradizierten *H. pylori* Fälle wurden zum einen über die Histologie (Befund oder Vorbefund einer Ex-*H. pylori* Gastritis) und zum anderen über eine bekannte Eradikationstherapie bei den behandelnden Gastroenterologen oder Hausärzten definiert. Hierfür wurden bei unklaren Fällen (Histologie negativ und Serologie positiv) die behandelnden Ärzte telefonisch kontaktiert. Des Weiteren wurde bei den eradizierten Fällen, falls bekannt, das Jahr der Eradikationstherapie festgehalten. Dieses wurde festgelegt als das von den behandelnden Ärzten angegebene Jahr der Therapie oder als das Jahr mit dem letzten *H. pylori* positiven Histologie Befund.

3.1.3.1 Histologie

Die in Formalin fixierten Magengewebeproben wurden in Paraffin eingebettet und in 4 µm dicke Präparate geschnitten. Diese wurde zur Graduierung der Gastritis mit Hämatoxylin & Eosin (HE) gefärbt, die Identifizierung von *H. pylori* erfolgte gegebenenfalls in der Giemsa-Färbung. Die Graduierung der *H. pylori* Gastritis erfolgte gemäß der Updated Sydney Klassifikation (Dixon et al. 1996). Betrachtet wurde die Dichte der *H. pylori* Besiedlung, der Grad der Gastritis (= lymphozytäre, bzw. plasmazelluläre Infiltration), der Grad der Aktivität (= Infiltration der Mukosa mit neutrophilen Granulozyten) und das Vorhandensein von intestinaler Metaplasie und Drüsenkörperatrophie. Die Einteilung des Grades der Gastritis und des Grades der Aktivität erfolgte in keine, geringgradig, mäßiggradig und hochgradig.

Bei den mitgeteilten Befunden handelt es sich um Routinebefunde des Pathologischen Instituts der TU München und des Klinikums Bayreuth.

Bei unklaren Fällen wurde zur sicheren Identifizierung von *H. pylori* eine Warthin-Starry Färbung durchgeführt. Diese auf Silbernitrat basierende Färbung dient zum Nachweis von Spirochäten. Im Gegensatz zur routinemäßig durchgeführten HE-Färbung lässt sie die Bakterien größer erscheinen, sie ist jedoch zeitaufwendig, teuer und mit Artefakten belastet (Remmele et al. 1996). Letztendlich ist keine der genannten Färbungen für *H. pylori* spezifisch.

3.1.3.2 Kultur

Die Antrumbiopsien wurden sofort nach Entnahme in BHI-dent Medium gelagert und in das Institut für Medizinische Mikrobiologie der TU München transportiert. Dort erfolgten die Entnahme der Biopsie mit einem sterilen Wattestäbchen und die fraktionierte Beimpfung von Wilkins-Chalgren-Dent-Nährboden mit dem Wattestäbchen und unter Zuhilfenahme eines Drygalsky-Spatels. Die Platten wurden unter mikroaerophilen Bedingungen (9% CO₂, 11% O₂ und 80% N₂) bei 37°C inkubiert. Nach jeweils drei Tagen erfolgte eine erste Sichtung der Platten. Lagen *H. pylori* typische kleine transparenten Kolonien vor, wurden diese mit Hilfe eines Oxidase Tests gesichert. Bei geringen Keimzahlen erfolgte eine Überimpfung mit einer sterilen Öse auf neue Nährböden und eine erneute Bebrütung. Zur Langzeitlagerung der Keime wurden die Kolonien in ausreichender Menge mit einer Öse geerntet und durch schnelles Drehen in *H. pylori* Einfriermedium suspendiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Hierzu wurden nur junge Kulturen von 2 – 3 Tagen mit beweglichen Bakterien verwendet.

Negative Kulturen wurden weitere 7 Tage inkubiert, falls in dieser Zeit kein *H. pylori* typischer Stamm angewachsen ist wurde die Kultur als *H. pylori* negativ gewertet.

Bei positiven Kulturen wurde ggf. eine Resistenztestung auf Metronidazol, Clarithromycin, Amoxicillin, Ciprofloxacin und Tetracyclin durchgeführt.

3.1.4 Serologie

Die Blutabnahme erfolgte vor oder nach der Magenspiegelung durch den behandelnden Anästhesisten (Entnahme venösen Blutes aus dem peripher venösen Zugang für die Narkose vor der Injektion von Anästhetika), durch das Sprechstundenpersonal oder durch die Verfasserin dieser Arbeit. Aus dem entnommenen Blut wurde durch Zentrifugation in

einer Standard Laborzentrifuge bei 1000 rpm für 5 Minuten Serum gewonnen. Das Serum wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäßen pipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Bei einer Infektion mit *H. pylori* kommt es zur Bildung spezifischer Antikörper gegen das Bakterium. Diese können dann im Serum mit immunologischen Verfahren nachgewiesen werden. Die einzelnen Testverfahren beruhen jeweils auf dem Nachweis spezifischer Antikörper-Antigen-Komplexe. Zur Analyse der Serumantwort auf *H. pylori*-Proteine wurden verschiedene serologische Testverfahren durchgeführt und miteinander verglichen. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag dabei auf der Durchführung und Analyse des neuen recomLine® Testsystems.

3.1.4.1 RecomWell® *Helicobacter* IgG

Der recomWell® (ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. In einem ersten Schritt binden spezifische Antikörper an ein nachzuweisendes Antigen. Ungebundene primäre Antikörper werden durch mehrfache Waschschrte entfernt. In einem zweiten Schritt binden sekundäre Anti-human-Antikörper (Konjugat) an den primären Antikörper. Dieser zweite Antikörper ist mit einem Enzym markiert, z.B. der Peroxidase, das die Umwandlung eines farblosen Substrats in ein farbiges katalysiert. Das heißt, falls spezifische Antikörper gegen das gesuchte Antigen vorhanden sind kommt es zu einer Verfärbung der betroffenen Probe.

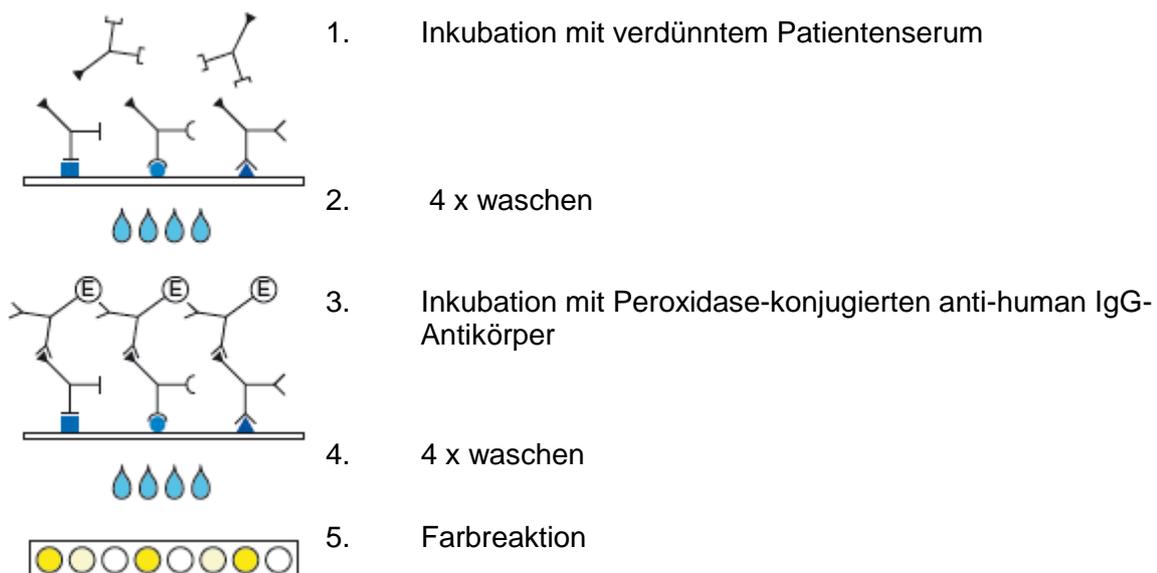


Abbildung 8: Testprinzip und -durchführung recomWell® *Helicobacter* IgG (Mikrogen, Neuried)

Die Bestimmung der spezifischen IgG-Antikörper erfolgte mit kommerziellen ELISA Kits der Firma Mikrogen. Die IgG Antikörper richten sich gegen die rekombinant hergestellten *H. pylori* Antigene CagA und GroEL. Die manuelle Durchführung erfolgte gemäß des von der Firma angegebenen Testprotokolls. Die Serumproben wurden hierzu gemäß Protokoll 1:100 verdünnt. Es wurden je Mikrotiterplatte eine positiv, eine negativ und zwei Cutoff Kontrollen mitgeführt. Die Extinktion wurde durch das Spektrometer Sunrise TECAN bei 450nm gemessen. Die Validierung und Auswertung erfolgte ebenfalls nach Protokoll. Die Cutoff Kontrolle wird aus dem Mittelwert der beiden Cutoffs berechnet. Alle Proben mit Extinktionswerten über dem Graubereich (untere Grenze Cutoff und obere Grenze Cutoff + 20%) wurden als positiv gewertet, Proben darunter als negativ. Proben mit Extinktionswerten im Graubereich wurden erneut getestet und bei wiederholten Extinktionswerten im Graubereich als fraglich gewertet. Zur quantitativen Auswertung erfolgte die Umrechnung der Extinktionswerte in die entsprechende Antikörperaktivität in Units pro ml. Proben mit > 24 U/ml waren positiv, < 20 U/ml negativ und ≥ 20 U/ml und ≤ 24 U/ml grenzwertig.

$$U/ml\ Probe = \left(\frac{Extinktion\ Probe}{Extinktion\ Cutoff} \right) \times 20$$

Formel 1: Berechnung der Antikörperaktivität aus den Extinktionswerten

Es wurden alle 1350 Serumproben mit dem recomWell® getestet.

3.1.4.2 RecomLine® *Helicobacter* IgG

Der recomLine® ist ein neuartiger Line assay zur Bestimmung von *H. pylori* Antikörpern im Serum. Im Gegensatz zum recomWell® sind hier rekombinant hergestellte *H. pylori* Antigene auf Nitrocellulose Membran Teststreifen aufliniert und somit auf dieser immobilisiert. Dies ermöglicht eine Identifikation der einzelnen Antigene in dem jeweiligen Patientenserum.

Der recomLine® wurde von der Firma Mikrogen in Kooperation mit der Technischen Universität München entwickelt. Der zurzeit im Handel erhältliche recomLine® beinhaltet die folgenden sechs Antigene:

- CagA Cytotoxin-associated gene A
- VacA Vacuolating cytotoxin
- GroEL GroEL (Heat shock protein 60)
- UreA Urease α subunit A
- HcpC *Helicobacter* cystein-rich protein C
- gGT gamma-Glutamyl Transpeptidase

Es wurden unter anderem typspezifische Antigene für den recomLine® ausgewählt. Dies ermöglicht eine Einteilung der positiven Fälle in *H. pylori* Typ I (CagA und/ oder VacA positiv) und Typ II (CagA und VacA negativ).

Die Testdurchführung gliederte sich analog zum recomWell® in Probeninkubation, Waschen, Inkubation mit Konjugat, Waschen, der Substratreaktion und Abstoppen der Reaktion. Die Verdünnung des Humanserums betrug gemäß Protokoll 1:100.

Neben den auflinierten Antigenen sind auf dem Teststreifen verschiedene Kontrollbanden enthalten: eine Reaktionskontrolle (bei jeder Serumprobe positiv), eine Konjugatkontrolle (entsprechend bei IgG oder IgA Antikörpern positiv) und eine Cutoff-Kontrolle.

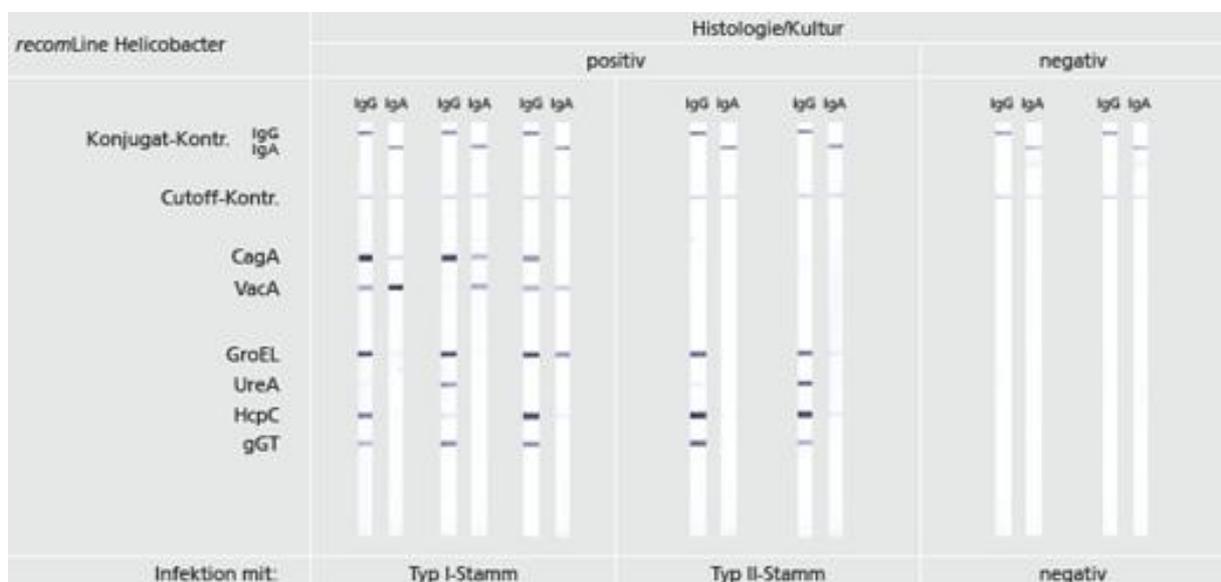


Abbildung 9: RecomLine® *H. pylori* Austestung von klinisch definierten Patientenseren (Mikrogen, Neuried)

Die Bewertung der Bandenintensität erfolgte in:

- Keine Reaktion -
- Sehr schwache Intensität (geringer als Cutoff-Bande) +/-
- Schwache Intensität (entsprechend Cutoff-Bande) +
- Starke Intensität ++
- Sehr starke Intensität +++

Die Auswertung erfolgte visuell. Alle Banden über der Cutoff Kontrolle wurden als positiv gewertet. Für Banden der Antigene CagA, VacA und GroEL gab es jeweils zwei Punkte und für Banden der anderen drei Antigene jeweils einen Punkt. Somit ergab sich eine Höchstpunktzahl von neun Punkten. Proben mit null Punkten wurden als negativ, mit einem

Punkt als fraglich und mit mindestens zwei Punkten als positiv gewertet. Des Weiteren wurden Banden sehr schwacher Intensität („0,5“ Punkte) in einer eigenständigen Auswertung zur Beurteilung des Cutoff betrachtet. 929 der 1350 Serumproben wurden mit dem recomLine® auf IgG Antikörper getestet. Die Testdurchführung erfolgte zum Teil manuell sowie mit dem ProfiBlot 48 (Tecan, CH-Männedorf).

3.1.4.3 Immunoblot® *Helicobacter* IgG

Der Immunoblot® ist das alte Testsystem der Firma Mikrogen, Neuried, welches mittlerweile durch das neuere Testverfahren recomLine® abgelöst wurde. Der Immunoblot® beruht auf gelelektrophoretisch aufgetrenntem *H. pylori* Lysat, das auf einer Nitrocellulose-Membran präsentiert wird. Somit ist hier im Gegensatz zum recomLine® eine spezifische Zuordnung von Antikörpern schwierig. Da es sich um ein komplettes *H. pylori* Lysat handelt kommt es im Gegensatz zum recomLine®, wo hochgereinigte rekombinante Antigene aufgetragen sind, zu Hintergrundfärbungen und ungenauen Aussagen.

Die Durchführung erfolgte gemäß Protokoll und analog zu recomWell® und recomLine®. Die Verdünnung des Humanserums betrug 1:100. Unabhängig von der Anzahl der Proben wurde bei jeder Testdurchführung eine Positiv und eine Negativ Kontrolle mitgeführt, auf der Positiv Kontrolle sollten alle Banden sichtbar sein, auf der Negativ Kontrolle können evtl. 1 oder 2 Banden sichtbar sein. Es liegt für jedes Kit ein spezifischer Kontrollstreifen vor, dieser stammt aus demselben Nitrocellulose-Block wie die Teststreifen aus demselben Kit. Auf diesem Kontrollstreifen sind die Molekulargewichte der Banden markiert und erlauben so eine Zuordnung der auf dem Teststreifen erkannten Banden. Insgesamt wurden 11 Banden beurteilt. Zum Teil konnte eine Zuordnung zwischen den erkannten Banden und einzelnen Proteinen gemacht werden. Für die Auswertung interessant war der Bandenkomplex 120kDa / 87 kDa, diese beiden Banden stellen die Proteine CagA und VacA da und erlauben somit den Vergleich mit den erkannten Antigenen im recomLine®. Den einzelnen Banden sind Punktwerte von einem bis zu fünf Punkten zugeordnet. Die Punkte wurden addiert und Summen von weniger oder der gleich 10 Punkten wurden als negativ, 11 – 12 Punkten als fraglich und über oder gleich 13 Punkten wurden als positiv gewertet. Negative Befunde (≤ 10 Punkte) wurden bei Vorhandensein von CagA Antikörpern als fraglich bewertet.

Zum Vergleich der beiden Testsysteme Immunoblot® – recomLine® wurden 338 Seren mit dem Immunoblot® auf IgG Antikörper untersucht. Die Testdurchführung erfolgte zum Teil manuell sowie mit dem ProfiBlot 48 (Tecan, CH-Männedorf).

3.1.4.4 Luminex

In Kooperation mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg wurden 180 Serumproben im DKFZ mit dem Multiplex Verfahren auf insgesamt 17 *H. pylori* Proteine getestet, einschließlich fünf Proteinen (CagA, VacA, GroEL, UreA und HcpC), die durch den recomLine® erkannt werden. Das Multiplex Verfahren basiert auf rekombinant hergestellten Glutathion-S-Transferase Fusionproteinen, die als Antigene auf einem Suspensions-Array von farbkodierten Polystyrolbeads fungieren. Diese können dann in einem Durchflusszytometer unterschieden werden und erlauben somit eine schnelle Charakterisierung der einzelnen Sera (Michel et al. 2009). Seren wurden als positiv eingestuft wenn mindestens vier Proteine erkannt wurden. Mit drei oder weniger reaktiven Proteinen wurden die Seren als seronegativ eingestuft. Die Ergebnisse des Luminex Verfahrens wurden mit den Testergebnissen aus recomLine®, recomWell® und Immunoblot® verglichen.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Design der Primer

Insgesamt wurden 15 Proteine zum PCR Screening ausgewählt. Es handelt sich zum einen um die sechs Proteine, die auf dem recomLine® zu finden sind, sowie weitere Proteine die für einen weiteren recomLine® Prototypen in Frage kommen. Dafür wurden jeweils Proteine ausgewählt, die stark immunogen, virulent und zwischen den verschiedenen *H. pylori* Stämmen konserviert sind. Die Sequenzen der Proteine wurden über die Datenbank NCBI eingeholt.

Für die Proteine UreA und Omp15 waren in der Arbeitsgruppe Gerhard bereits Full-Length Primer vorhanden, ebenso wie Primer für das Protein BabA. Die Primer für CagA wurden durch die Arbeitsgruppe Vogelmann der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt. Die Primer für das Protein VacA wurden aus der Literatur entnommen (Bebb et al. 2003).

Für die anderen Proteinprimer wurden etwa 20 bis 30 bp lange Sequenzen ausgewählt. Es wurde darauf geachtet, dass die Sequenzen der Primer jeweils in einem zwischen den verschiedenen *H. pylori* Stämmen konservierten Bereich liegen. Somit sollte sichergestellt werden, dass die Screening Primer die verschiedenen Varianten eines Proteins möglichst vieler *H. pylori* Stämme erkennen. Die PCR-Produkte sollten wenn möglich zwischen 200 –

500 bp enthalten. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Primer sich nicht an humane DNA anlagern können, was zu falsch positiven Ergebnissen führen würde.

Die Oligonukleotid Primer wurden mit den Programmen NEBcutter und Oligocalc auf ihre Eigenschaften hin untersucht. Dabei wurden unter anderem die ausgewählten Schnittstellen überprüft und die Schmelztemperatur T_M berechnet. Die Schmelztemperatur hängt von der Länge (n) und Zusammensetzung (GC-Gehalt) eines Primers ab. Je höher der GC-Gehalt desto höher ist auch die Schmelztemperatur, da die G-C Basenpaarung im Gegensatz zu der T-A Basenpaarung durch drei statt zwei Wasserstoffbrücken stabilisiert wird und somit stabiler ist.

$$T_M = 69,3 + 0,41 \times (\%GC) - \left(\frac{650}{n}\right)$$

Formel 2: Berechnung der Schmelztemperatur T_M [°Celsius]

In der Regel lag T_M zwischen 50 und 65°C, die genauen Angaben sind den Tabellen 5 und 6 im Abschnitt 2.2 Oligonukleotide zu entnehmen. Des Weiteren wurden mit den oben genannten Programmen self-*Annealing* und Hairpin-Formationen ausgeschlossen.

Wurden die Ansprüche an die Oligonukleotide nicht erreicht, wurde ein anderer Teil der Sequenz betrachtet und wie oben beschrieben untersucht.

Tabelle 7: Verwendete Proteine zum Design der Primer

Nr.	Kürzel	Name	Stamm	NCBI_Nr	PCR-Produkt
1	gGT	gamma-Glutamyl transpeptidase	26695	NP_207909.1	375 bp
2	BabA	Blood group antigen binding	26695	NP_208035.1	605 bp
3	HcpC	Cysteine-rich protein C	P12	YP_002301695.1	307 bp
4	CagA	Cytotoxin-associated protein A	G27	ACI27269.1	600 bp
5	VacA	Vacuolating cytotoxin VacA	P12	YP_002301516.1	631 bp
6	UreA	Urease A	26695	YP_002265705.1	718 bp
7	HtrA	High temperature requirement A	26695	NP_207809.1	150 bp
8	ICD	Isocitrate dehydrogenase	G27	ACI26800.1	367 bp
9	NapA	Neutrophil activating protein	G27	ACI26990.1	355 bp

10	SabA	Sialic acid binding adhesion	G27	ACI27435.1	194 bp
11	Omp1	HopZ	G27	YP_002266301.1	391 bp
12	Omp15	HopE	G27	ACI27420.1	812 bp
13	HP0231	Hypothetical protein 0231	26695	NP_207029.1	125 bp
14	GroEL	HSP60	26695	NP_206812.1	180 bp
15	HpaA	Flagellar sheath adhesin HpaA	P12	YP_002301436.1	180 bp

Die Primer wurden in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt.

3.2.2 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte aus den in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Antrumbiopsien mit dem Invitrogen PureLink™ Genomic DNA Kit. Die Isolierung erfolgte nach dem Invitrogen Protokoll. Dafür wurden zunächst die Probeexzisionen in 180 µl PureLink™ Genomic Digestion Buffer und 20 µl Proteinase K über Nacht bei 55°C im Schüttler aufgelöst. Es folgte das Binden, Waschen und die Elution (100 µl) der DNA gemäß Protokoll. Die aufgereinigte DNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.2.3 Bestimmung der DNA Konzentration

Die DNA Konzentration in einer wässrigen Lösung wird bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt. Zur Bestimmung der DNA Konzentration nach der DNA-Isolierung (3.2.2) wurde das Spectrophotometer NanoDrop ND-1000 (Fa. Thermo Scientific) verwendet. Es wurde ein Volumen von 1,5 µl gemessen, als Referenz dazu diente der zur Elution verwendete PureLink™ Genomic Elution Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 0,1 mM EDTA). Die Reinheit der DNA Präparation wurde aus dem Verhältnis der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm errechnet, proteinfreie DNA Proben weisen ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 auf.

3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion dient seit ihren Anfängen 1985 (Saiki et al. 1985) zum spezifischen Nachweis von DNA- und RNA-Fragmenten. Die PCR ermöglicht weiterhin die

Amplifikation eines DNA-Templates aus einem komplexen DNA-Gemisch heraus, in der vorliegenden Arbeit bestehend aus genomischer und bakterieller DNA.

Die PCR gliedert sich im Wesentlichen in 3 Schritte: in einem ersten Schritt wird die Template DNA bei 94°C denaturiert, das heißt die Stränge trennen sich von Doppel- in Einzelstränge auf. Im zweiten Schritt kommt es bei reduzierter Temperatur (55°C) zur Anlagerung der Oligonukleotidprimer an die passende Sequenz der Template DNA (*Annealing*). Dabei flankieren zwei Oligonukleotid-Primer die zu amplifizierende Zielregion auf den gegenüberliegenden Strängen in entgegengesetzter Richtung. Im Elongationsschritt verlängert dann die Taq-Polymerase den Primer bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Dieser Schritt findet bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase statt. Die drei Schritte werden insgesamt 35 Mal wiederholt, am Ende liegt ein Vielfaches der von den beiden Primern flankierten zu amplifizierenden Sequenz vor.

Die PCR diente in vorliegender Arbeit zum Nachweis 15 verschiedener *H. pylori* Proteine in der aus Magenantrumbiopsien isolierten DNA. Somit konnten quantitative Aussagen über das Vorliegen *H. pylori* spezifischer DNA und qualitative Aussagen bezüglich den vorliegenden *H. pylori* Antigenen gemacht werden.

Für einen PCR Ansatz wurde ein Gesamtvolumen von 15 µl gewählt; dies beinhaltete 1 µl Template-DNA, 4,5 µl H₂O, 2 µl Primer und 7,5 µl Green Taq (enthält thermostabile DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und Puffer). Insgesamt mussten so pro Biopsie 15 Ansätze für die einzelnen Antigene pipettiert werden. Es lagen nur bei der Münchener Untergruppe zusätzliche Biopsien für die genetische Untersuchung vor. Davon wurde für alle in der Serologie *H. pylori* positiven Studienteilnehmer (Histologie positiv oder negativ) eine PCR durchgeführt. Dies waren 63 Fälle. Mit den vorhandenen DNA Proben wurden außerdem Positivkontrollen mit den *H. pylori* Stämmen G27 und 26695, sowie Negativkontrollen ohne Template DNA (Wasser) und mit *H. pylori* negativen DNA Isolaten mitgeföhren. Die PCR Bedingungen wurden festgelegt entsprechend der Länge der zu amplifizierenden Sequenz und dem GC-Gehalt der jeweiligen Primer. Die pipettierten Proben wurden bei folgenden Temperaturen inkubiert:

- | | | | | |
|----|------|-----------|------------------------|-------------|
| 1. | 94°C | 4:30 min | initiale Denaturierung | |
| 2. | 94°C | 0:30 min | Denaturierung | } 35 Zyklen |
| 3. | 55°C | 1:00 min | Annealing | |
| 4. | 72°C | 1:30 min | Elongation | |
| 5. | 72°C | 10:00 min | finale Elongation | |
| 6. | 4°C | ∞ | | |

Generell erfolgte die Bestimmung der *Annealing*-Temperatur T_A mit folgender Formel:

$$T_A = \left[\frac{T_{M1} + T_{M2}}{2} \right] - 3^\circ C$$

Formel 3: Berechnung der *Annealing*-Temperatur T_A [$^\circ$ Celsius]

Um PCR-Artefakte aufgrund der genomischen DNA zu reduzieren wurde zum Teil versucht die *Annealing* Temperatur auf 57 – 59°C zu erhöhen.

3.2.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegele dienen zur Trennung und Identifikation der während der PCR gewonnenen DNA-Fragmente. Zur Herstellung der Gele wurde 1% (w/v) Agarose in 0,5x TAE Puffer aufgekocht bis die Agarose gelöst war. Daraus wurde unter Zuhilfenahme eines Gelschlittens und eines Kammes ein Gel mit einer beliebigen Anzahl an Taschen gegossen, es entsteht ein vernetztes Gel mit Poren von mehreren Hundert nm Durchmesser. Zur besseren Darstellung kleinerer DNA-Fragmente wurde unter Umständen eine Agarose-Konzentration von 1,5% gewählt. War das Gel erkaltet wurde es in eine Elektrophorese Kammer gegeben und mit TAE Puffer überschichtet. Die DNA-Lösungen wurden jeweils in eine Tasche pipettiert. Anschließend legte man eine Spannung von ca. 85 – 95 Volt an und wartete bis die DNA ausreichend weit gelaufen war. Die einzelnen PCR-Fragmente wandern aufgrund ihrer negativen Ladung vom Minus- zum Plus-Pol und werden so entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die fertigen Gele wurden unter UV-Licht (Eagle-Eye, Biorad) bei einer Wellenlänge von 302 nm betrachtet und dokumentiert.

Um die DNA Fragmente im Gel sichtbar zu machen wurden zwei Färbstoffe verwendet. Zum einen erfolgte die Färbung mit Ethidiumbromid. Dafür wurde der bereits geschmolzenen Agarose bei einer Temperatur von ca. 50°C 0,1 µg/ml der Ethidiumbromidstammlösung (ROTH, Karlsruhe) zugegeben. Im Laufe der Laborarbeiten wurden die Arbeiten mit Ethidiumbromid auf Grund des Gefahrenpotentials eingestellt und es wurde auf GelRed™ (Phenix Research Products, Candler) umgestellt. Hierzu wurde das 10.000x konzentrierte GelRed™ in einem Verhältnis von 1:10.000 der flüssigen Agarose zugesetzt.

Als Größenmarker wurde jeweils ein BenchTop Ladder (Promega) der Größe 1 kbp oder 100 bp mit gefahren.

3.3 Statistische Analyse

Die Zusammentragung, Eingabe und Auswertung der Daten erfolgte durch die Verfasserin dieser Arbeit mit Unterstützung durch das Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München.

Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha = 0,05$ festgelegt. Die Auswertung qualitativer unverbundener Merkmale erfolgte über den Pearson χ^2 (Chi-Quadrat) Test. Quantitative Merkmale bei gegebener Normalverteilung wurden über den t-Test ausgewertet, bei einer beliebigen Verteilung wurde der Wilcoxon (Mann-Whitney) Test verwendet. Der Kruskal-Wallis-Test wurde bei einem Vergleich von mehr als zwei Gruppen quantitativer Merkmale beliebiger Verteilung angewandt.

Zusammenhänge zwischen den einzelnen Variablen wurden mit dem Spearman Korrelationskoeffizienten berechnet.

Für die qualitativen Eigenschaften (Validität) der einzelnen *H. pylori* Diagnostik Methoden wurden die Sensitivität und Spezifität und gegebenenfalls der Prädiktive Wert des positiven und negativen Testergebnis berechnet. Des Weiteren wurde die Übereinstimmung der einzelnen Verfahren überprüft (Reliabilität).

Für quantitative Merkmale erfolgte zum Teil die Berechnung der Lokalisationsmerkmale und der Streuungsmaße. Die graphischen Darstellungen wurden mit Excel oder SPSS ausgearbeitet.

4 Ergebnisse

4.1 Prävalenzen und Diagnostik der *H. pylori* Infektion

4.1.1 Demographische Daten der Studienteilnehmer

Das Durchschnittsalter der Studienteilnehmer betrug $51,7 \pm 16,5$ Jahre. Die Altersspannweite lag in einem Bereich von 11 bis 88 Jahren. Es zeigte sich, dass die *H. pylori* negativen Patienten im Durchschnitt signifikant ($p < 0,01$) jünger ($\bar{x} 48,2 \pm 16,2$ Jahre) als die *H. pylori* positiven ($\bar{x} 52,1 \pm 16,3$ Jahre) und eradizierten Patienten ($\bar{x} 56,4 \pm 15,8$ Jahre) waren. In die Studie wurden mehr Frauen (53,9%) als Männer (46,1%) eingeschlossen. Ein signifikanter Unterschied in der Histologie konnte zwischen den Geschlechtern nicht festgestellt werden ($p = 0,178$).

Tabelle 8: Charakteristika der 1350 in die Studie eingeschlossenen Patienten

	<i>H. pylori</i> Histologie			Gesamt
	negativ	positiv	eradiziert	
Gesamt	646 (47,9%)	265 (19,6%)	439 (32,5%)	1350 (100%)
Alter [Jahre]				
Mittelwert	48,2	52,1	56,4	51,7
SD	16,2	16,3	15,8	16,5
Minimum	11,0	16,0	14,0	11,0
Maximum	86,0	85,0	88,0	88,0
Geschlecht				
weiblich	346 (53,6%)	132 (49,8%)	250 (56,9%)	728 (53,9%)
männlich	300 (46,4%)	133 (50,2%)	189 (43,1%)	622 (46,1%)
Herkunft				
Deutschland	578 (51,1%)	181 (16,0%)	372 (32,9%)	100%
Ost Europa	14 (23,3%)	26 (43,3%)	20 (33,3%)	100%
Türkei	14 (28,6%)	21 (42,9%)	14 (28,6%)	100%
Andere	40 (36,4%)	37 (33,6%)	33 (30,0%)	100%

Es wurde außerdem versucht, die Patienten anhand des Vor- und Nachnamens ihrer Herkunft zuzuordnen. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass es sich dabei um ein Verfahren handelt, das wissenschaftlichen Kriterien nur in sehr eingeschränktem Maß gerecht wird. Es wurde trotzdem in explorativer Weise verwendet um eventuelle Tendenzen oder Ansatzpunkte für weitere Studien erkennen zu können. Es zeigte sich, dass Studienteilnehmer nicht deutscher Herkunft zu einem höheren Prozentsatz *H. pylori* positiv waren als Studienteilnehmer deutscher Herkunft (χ^2 -Test, $p < 0,01$).

4.1.2 *H. pylori* Infektionsstatus der Studienteilnehmer

Der Infektionsstatus wurde über die Histologie, bzw. in zwei Fällen über die Kultur definiert (s. Tabelle 9). Bei den 147 Patienten des Münchner Kollektivs ist zusätzlich zur Histologie die Anzucht einer Kultur erfolgt. Insgesamt konnten davon 50 Fälle als *H. pylori* positiv identifiziert werden. Von diesen waren 35 in der Kultur positiv (davon 2 in der Histologie negativ) und 48 in der Histologie positiv (davon 15 in der Anzucht negativ). Somit zeigte die Histologie eine bessere Sensitivität (96%, 48/50) als die Kultur (70%, 35/50).

Im Folgenden wird der Einfachheit halber Bezug auf das in der „Histologie“ *H. pylori* positive / negative / eradizierte Kollektiv verwiesen, auch wenn zum Teil die *H. pylori* Zuordnung über die Kultur (für *H. pylori* positive Fälle) und über die Patientengeschichte (für *H. pylori* eradizierte Fälle) erfolgt ist.

Tabelle 9: Übereinstimmung zwischen Histologie und Kultur im Münchner Kollektiv

		<i>H. pylori</i> Kultur		Gesamt
		negativ	positiv	
Histologie	negativ	97	2	99
	positiv	15	33	48
Gesamt		112	35	147

Insgesamt waren von allen 1350 eingeschlossenen Studienteilnehmern 646 (47,9%) *H. pylori* negativ, 265 (19,6%) positiv und 439 (32,5%) eradiziert. Somit beträgt die Prävalenz der Probanden, die zu irgendeinem Zeitpunkt ihres Lebens *H. pylori* infiziert waren 52,1% (*H. pylori* positive und eradizierte Patienten). Wie bereits erwähnt waren die *H. pylori* negativen Patienten im Durchschnitt signifikant ($p < 0,01$) jünger als die *H. pylori* positiven und eradizierten Patienten. Dies zeigte sich auch an Hand der Prävalenz: bei den älteren

Studienteilnehmern lag eine deutlich höhere *H. pylori* Prävalenz als bei den jüngeren Teilnehmern vor. Vor allem die Anzahl an *H. pylori* eradizierten Menschen stieg, zum Beispiel von 13,8% in der Gruppe der unter 20 Jährigen auf 57,1% in der Gruppe der 81 – 90 Jährigen.

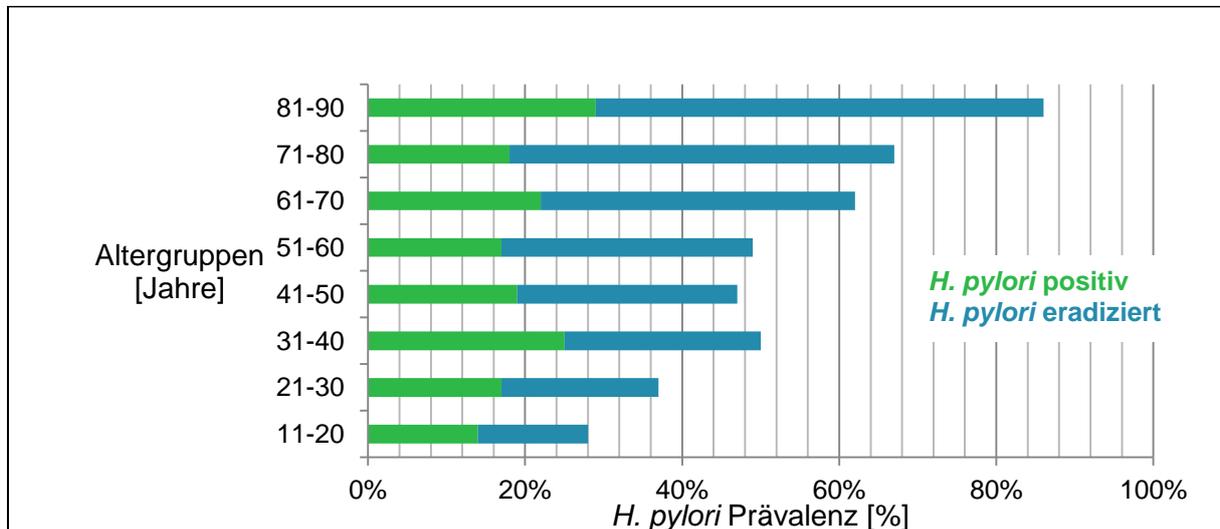


Abbildung 10: Altersentsprechende *H. pylori* Prävalenz

Wie bereits erwähnt wurde versucht die Patienten anhand des Namens ihrer Herkunft zuzuordnen. Dabei bestätigte sich die Annahme, dass Patienten mit Migrationshintergrund höhere *H. pylori* Prävalenzen aufweisen.

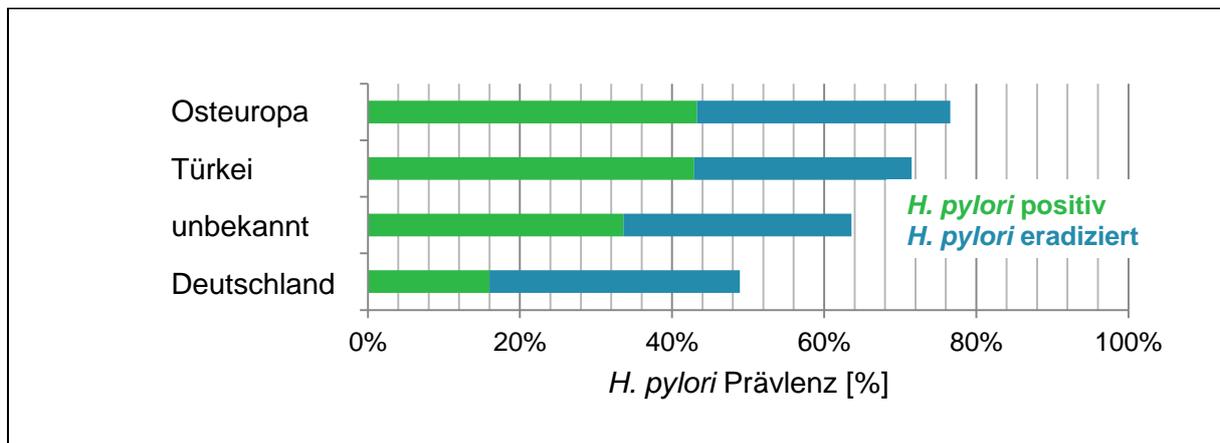


Abbildung 11: *H. pylori* Prävalenz nach Herkunftsland der Studienteilnehmer

Für die verschiedenen Untergruppen der Herkunftsländer gab es keine nennbaren Unterschiede bezüglich der Histologiebefunde, zum Beispiel bezüglich Grad oder Aktivität der Entzündung.

4.1.3 Serologie der humanen Serumproben

Alle 1350 Fälle wurden mit dem recomWell® getestet, davon waren 864 Fälle recomWell® negativ, 481 recomWell® positiv und 5 fraglich. Im eradizierten Kollektiv war etwa die Hälfte der Fälle Serologie positiv. Auf einen Zusammenhang zwischen der Zeit seit Eradikationstherapie und positiver Serologie Antwort wird im weiteren Verlauf der Arbeit noch eingegangen. Die genaue Austestung des recomWell® wird in folgender Tabelle gezeigt:

Tabelle 10: Übereinstimmung zwischen Histologie und recomWell®

	<i>H. pylori</i> Histologie			Gesamt
	negativ	positiv	eradiziert	
recomWell® (N)				
negativ	606	32	226	864
positiv	40	231	210	481
fraglich	0	2	3	5
Gesamt	646	265	439	1350

In einem nächsten Schritt wurden 929 der recomWell® vorgescreenten Fälle zusätzlich mit dem recomLine® getestet. Alle recomWell® positiven und fraglichen Seren sowie eine Auswahl an negativen Fällen wurden hierbei untersucht. Aus dem eradizierten Kollektiv wurde der recomLine® dabei vor allem bei recomWell® positiven Fällen durchgeführt. Nachstehend werden einige recomLine® Testergebnisse gezeigt:

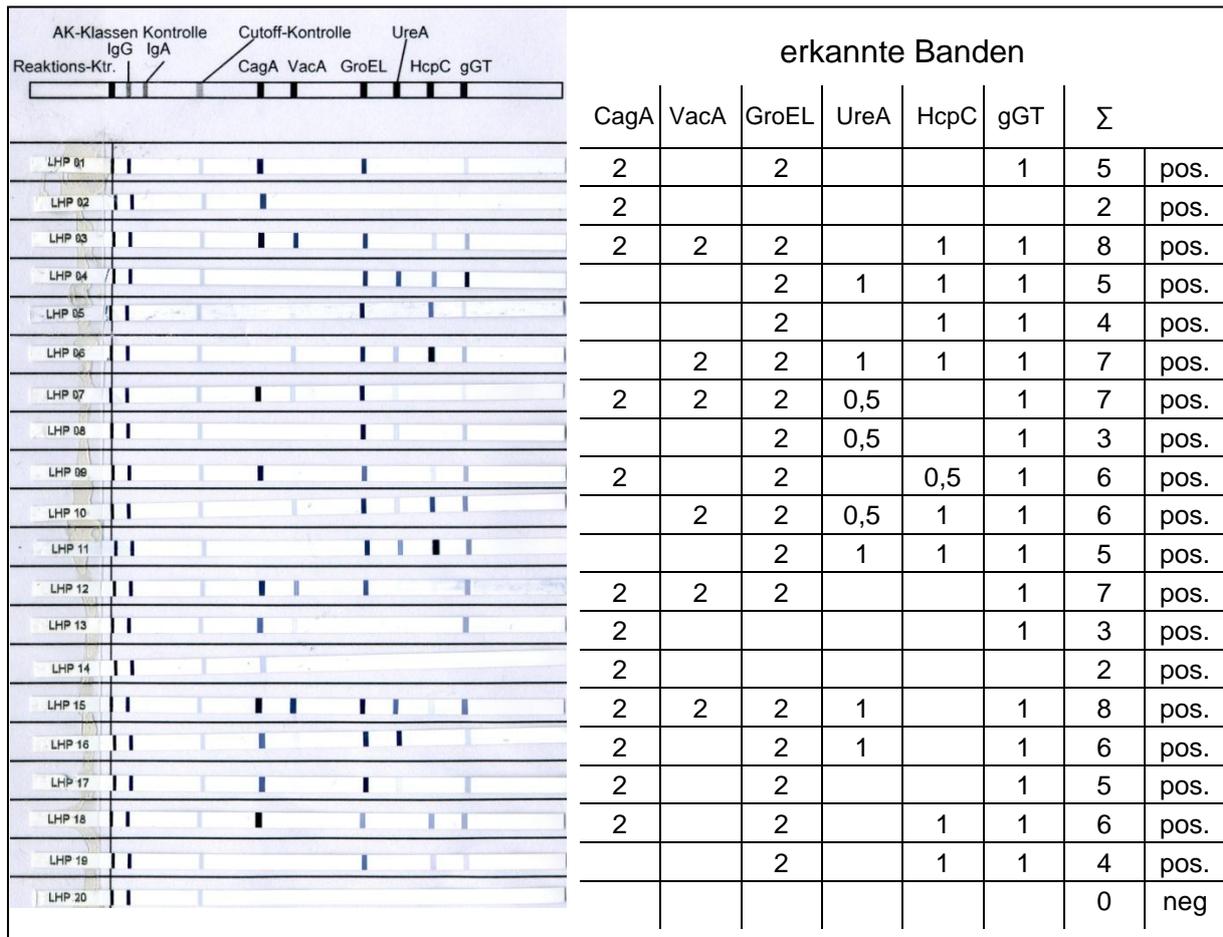


Abbildung 12: Beispiele recomLine® Testergebnisse

Insgesamt waren im recomLine® 489 Fälle *H. pylori* seropositiv, 433 seronegativ und 7 Fälle fraglich. Folgende Tabelle zeigt die recomLine® Ergebnisse in Bezug auf den *H. pylori* Status in der Histologie:

Tabelle 11: Übereinstimmung zwischen Histologie und recomLine®

	<i>H. pylori</i> Histologie			Gesamt
	negativ	positiv	eradiziert	
recomLine® (N)				
negativ	399	5	29	433
positiv	35	258	196	489
fraglich	3	2	2	7
Gesamt	437	265	227	929

4.2 Auswertung recomLine® und recomWell® im positiven und negativen *H. pylori* Kollektiv

Im folgenden Abschnitt beziehen sich die Analysen auf das *H. pylori* positive Kollektiv. Als Absicherung und zur Kontrolle wurden außerdem die Histologie-negative Fälle herangezogen. Die in der Serologie als fraglich klassifizierten Ergebnisse wurden dabei als positiv gewertet. Um die beiden Serologieverfahren miteinander vergleichen zu können wurden außerdem nur Fälle eingeschlossen, die sowohl mit recomWell® als auch mit recomLine® getestet wurden. Insgesamt wurden somit 702 Patienten betrachtet (437 Histologie-negative und alle 265 Histologie-positiven).

Für die beiden Serologieverfahren wurde jeweils die Sensitivität und Spezifität berechnet, die Werte sind in nachstehender Tabelle 12 dargestellt. Der neue recomLine® Test besitzt eine deutlich höhere Sensitivität als der recomWell®: 98,1% im Vergleich zu 87,9%. Somit erkennt der recomLine® mehr *H. pylori* positive Patienten als der recomWell®: von den insgesamt 265 in der Histologie *H. pylori* Fällen erkennt der recomLine® 258 Fälle, der recomWell® jedoch nur 231. Die Spezifität, also die Richtig-Negativ-Rate, liegt bei beiden Verfahren um die 90%. Liegt im recomLine® ein positives Ergebnis für *H. pylori* Antikörper vor, so beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass es sich tatsächlich um einen positiven *H. pylori* Befund handelt 87,2% (PPV). Zu beachten ist hier jedoch, dass bei eradizierten Patienten eine Serumnarbe verbleiben kann, die der recomLine® nicht von einer noch aktiven *H. pylori* Infektion unterscheiden kann. Im Gegensatz dazu ist bei einem negativen Testergebnis die Wahrscheinlichkeit, dass keine *H. pylori* Infektion vorliegt mit 98,8% (NPV) sehr hoch.

Tabelle 12: Statistische Gütekriterien von recomLine® und recomWell®

	recomLine® mit 95%-KI		recomWell® mit 95%-KI	
Sensitivität	98,1% (260/265)	[95,7;99,4]	87,9% (233/265)	[83,4;91,6]
Spezifität	91,3% (399/437)	[88,3;93,8]	90,8% (397/437)	[87,7;93,4]
korr. Spez.	97,1% (399/411)	[95,0;98,5]	96,6% (397/411)	[94,4;98,1]
PPV	87,2% (260/298)		85,3% (233/273)	
korr. PPV	95,6% (260/272)		94,3% (233/247)	
NPV	98,8% (399/404)		92,5% (397/429)	

PPV = positiver Vorhersagewert; NPV = negativer Vorhersagewert; KI = Konfidenzintervall

korr. Spez. = korrigierte Spezifität, ergibt sich, da 26 recomWell® und recomLine® „falsch positive“ (s. Tab. 13) aufgrund von Antigen Erkennungsmustern, die dem Muster des eradizierten Kollektiv entsprechen, als eradiziert gewertet wurden und somit von den Analysen ausgeschlossen wurden.

korr. PPV = korrigierter PPV, ergibt sich aus demselben Hintergrund wie die korrigierte Spezifität.

Im Durchschnitt erkannte der recomLine® im positiven Kollektiv von 6 möglichen Antigenen $2,89 \pm$ (SD) $1,27$ Antigene. Der mittlere Punkte Score im recomLine® lag bei $4,58 \pm 1,89$. Im negativen Kollektiv konnten dementsprechend Werte im Bereich von $0,12 \pm 0,52$ Antigenen und einem Punkte Score von $0,23 \pm 0,87$ festgestellt werden.

Beim recomWell® lag der Mittelwert der Extinktion im positiven Kollektiv bei $2,63 \pm 2,30$ und im negativen Kollektiv bei $0,21 \pm 0,31$.

4.2.1 Diskrepante Fälle

Die Histologie gilt in der Routinediagnostik als Goldstandard, da sie eines der sensitivsten und spezifischsten Verfahren ist. Jedoch können auch bei der Histologie falsch negative Fälle auftreten, beispielsweise im Rahmen von Schleimhautatrophien. Auch die Expertise des Pathologen kann eine Rolle spielen. Es erfolgte daher im Folgenden eine nähere Betrachtung der in Serologie und Histologie diskrepanten Fälle, insgesamt stimmte in 84 Fällen die Serologie nicht mit der Histologie überein.

Tabelle 13: Diskrepante Fälle zwischen Serologie und Histologie

	<i>H. pylori</i> Histologie				diskrepante Fälle recomWell®
	negativ		positiv		
	recomLine®		recomLine®		
	negativ	positiv	negativ	positiv	
recomWell®					
negativ	0	12	5	27	32
positiv	14	26	0	0	40
diskrepante Fälle recomLine®		38	5		

Der recomWell® war in 32 Fällen falsch negativ, davon war in 5 Fällen ebenfalls der recomLine® falsch negativ. Zur genaueren Differenzierung wurden bei 19 Proben die Histologie Schnitte mit Warthin-Starry Färbung nachgefärbt, es wurde jeweils die Diagnose einer *H. pylori* positiven Gastritis bestätigt. In 27 der 32 recomWell® falsch negativen Fälle war der recomLine® positiv, hier wurde näher auf die verschiedenen Antigenantworten im recomLine® geschaut. 6 Fälle waren weder CagA noch GroEL positiv. Die Antigene, die von dem recomWell® erkannt werden, waren folglich nicht vorhanden, daher ist davon auszugehen, dass der recomWell® diese Fälle aufgrund fehlender Antigentiter nicht erkannt hat. Die anderen 21 Proben hätten jedoch erkannt werden sollen, in 8 Fällen waren CagA und GroEL positiv, in den anderen 13 Fällen jeweils eines der beiden. Die Bandenintensität im recomLine® dieser betroffenen Fälle lag hauptsächlich zwischen starker und sehr starker Intensität.

In 40 Fällen war der recomWell® falsch positiv, d.h. die Histologie war negativ und die Serologie im recomWell® positiv. Es zeigte sich, dass der Mittelwert der recomWell® Extinktion bei den falsch positiven Proben von \bar{x} 1,12 signifikant ($p < 0,01$) geringer ist als der Mittelwert von \bar{x} 2,96 bei den richtig positiven Fällen. Entsprechend liegt der Mittelwert des positiven recomWell® Scores im eradizierten Kollektiv bei \bar{x} 1,36. Einige Fälle wurden ebenfalls Warthin-Starry nachgefärbt, alle 23 gefärbten Schnitte waren Histologie negativ. Somit lieferte die Warthin-Starry Färbung keine neuen Erkenntnisse zusätzlich zur normalen Histologie Färbung. 26 der 40 recomWell® falsch positiven waren ebenfalls recomLine® positiv, hier waren alle 26 entweder CagA und/oder GroEL positiv, d.h. der recomWell® bietet hier keine zusätzliche Entscheidungshilfe.

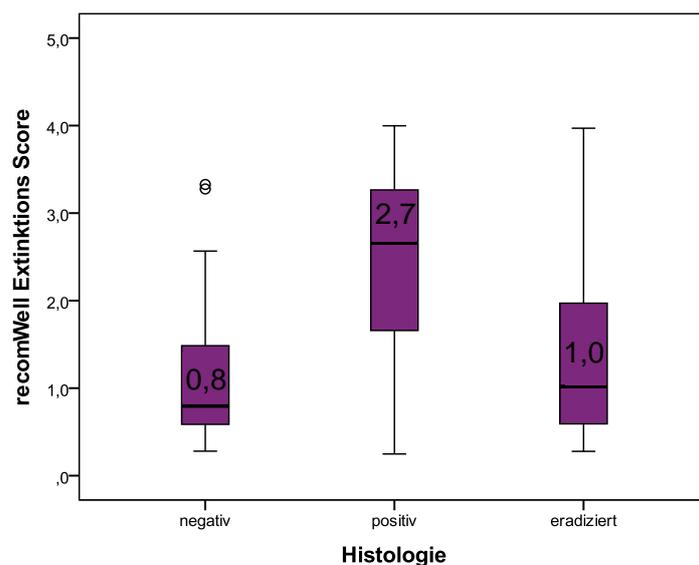


Abbildung 13: RecomWell® Extinktions Score der recomWell® positiven und Histologie *H. pylori* negativen, positiven und eradizierten Fälle

Bei den falsch positiven recomLine® Fällen zeigte sich, ebenso wie bei dem recomWell® Score, eine signifikante Differenz zwischen dem recomLine® Score richtig positiver (Ø 4,67, Median 4,5) und dem falsch positiver (Ø 2,68, Median 2) Proben, sowie eine signifikante Differenz zwischen dem Score richtig positiver und eradizierter Proben (Ø 3,2, Median 3). Zwischen dem recomLine® Score falsch positiver und eradizierter Proben zeigte sich ebenfalls eine signifikante Differenz ($p = 0,03$). Das Verhältnis des Scores im recomLine® und recomWell® zu den Histologie Kategorien wird in Abbildung 13 und 14 dargestellt. Markiert sind jeweils die Mediane.

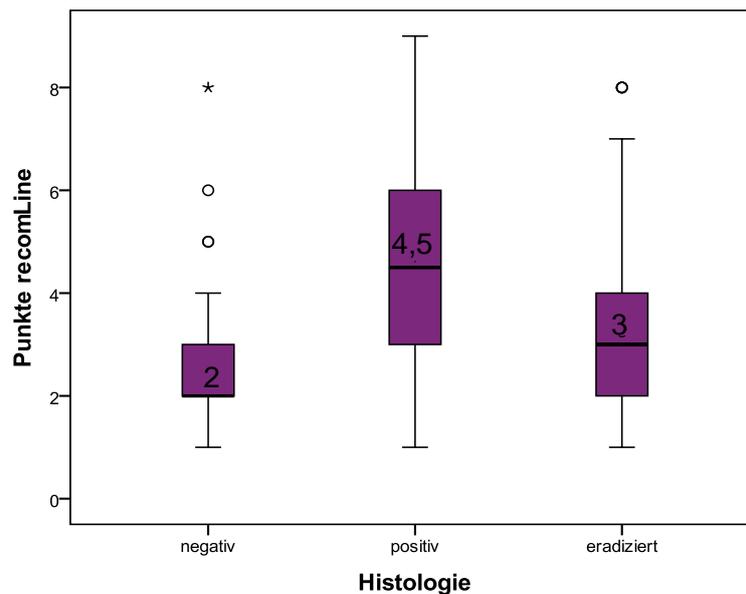


Abbildung 14: RecomLine® Punkte Score der recomLine® positiven und Histologie *H. pylori* negativen, positiven und eradizierten Fälle

Zusätzliche 12 Fälle waren nur recomLine® falsch positiv und im recomWell® richtig negativ. In diesen Fällen waren 8 entweder CagA und/oder GroEL positiv, d.h. auch hier kam es zu Diskrepanzen zwischen recomLine® und recomWell® auf Antigenebene. Da der recomWell® die Antigene CagA und GroEL enthält hätte er diese erkennen sollen, auch wenn hier, im Gegensatz zu den falsch negativen Fällen, die Bandenstärken im recomLine® für die betroffenen Banden eher schwach, das heißt auf Cutoff Niveau lagen. Die negative Reaktion des recomWell® könnte daher, geht man von einer abgelaufenen Infektion aus, beispielsweise durch zu niedrige Antigentiter bedingt sein, die der recomLine® erkennt, der recomWell® jedoch nicht.

Insgesamt sind 18 der 38 falsch positiven recomLine® Fälle nur CagA positiv. Der prozentuale Anteil an nur CagA positiven liegt bei 47,4%, dies entspricht dem Anteil an nur CagA positiven im eradizierten Kollektiv von 37,9% (75/198). Als Gegenüberstellung

besitzen im positiven *H. pylori* Kollektiv nur 11 Fälle, also 4,2%, alleinig Antikörper gegen das Antigen CagA. Ist nur die CagA Bande positiv liegt die Wahrscheinlichkeit für einen *H. pylori* positiven Befund bei 10,6% (11/104) und die Wahrscheinlichkeit für eine bereits eradizierte *H. pylori* Infektion bei 72,1% (75/104).

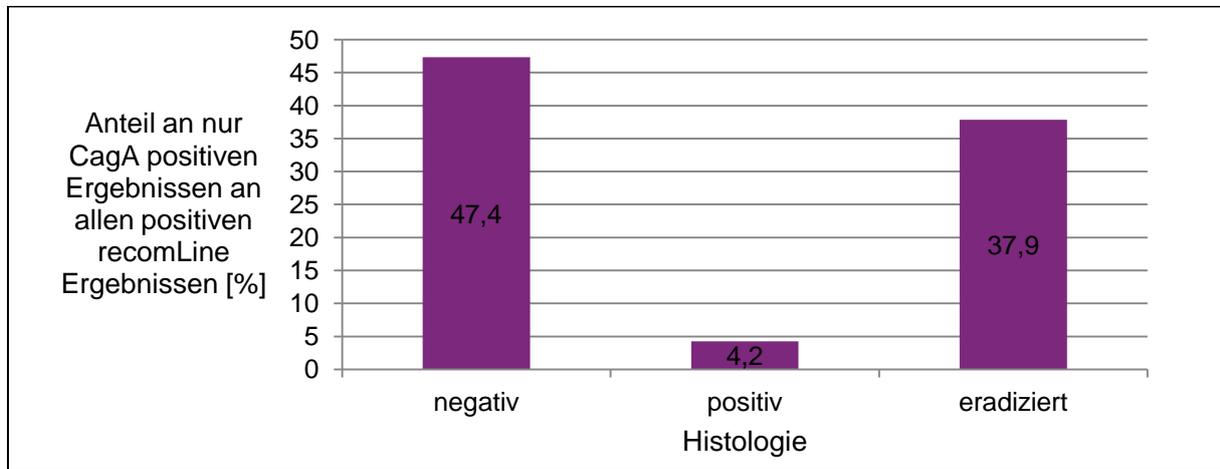


Abbildung 15: Anteil an nur CagA positiven recomLine® Ergebnissen an allen positiven recomLine® Testergebnissen

Es wurde im weiteren Verlauf davon ausgegangen, dass die 26 Proben, die im recomWell® und im recomLine® positiv sind, aber in der Histologie negativ, eradiziert worden sind. Weitere Informationen zu dem *H. pylori* Status konnten durch Befragung der behandelnden Gastroenterologen oder Hausärzte nicht eingeholt werden. Wenn die 26 „falsch positiven“ Proben entsprechend dem Bandenmuster als eradiziert gewertet werden ergeben sich korrigierte Spezifitäten für den recomLine® und recomWell®, wie bereits in Tabelle 12 aufgeführt.

4.2.2 Häufigkeit der erkannten recomLine® Antigene

Im gesamten Kollektiv, dass mit dem recomLine® getestet wurde (n = 929), wurden GroEL und CagA am häufigsten detektiert. Es waren 254 der 260 recomLine® und Histologie-positiven Fälle entweder CagA und / oder GroEL positiv, d.h. bei dem Großteil der Fällen spielten für die Festlegung der Positivität nur die beiden Antigene CagA und GroEL eine wichtige Rolle. Die restlichen 6 Fälle, die weder CagA noch GroEL positiv waren, waren alle HcpC positiv, davon wiederum waren nur 3 gGT und nur 1 Fall jeweils VacA und UreaseA positiv. Zusammenschauend überwog GroEL im positiven Kollektiv und das Antigen CagA war prozentual signifikant ($p < 0,01$) häufiger positiv im eradizierten Kollektiv als im positiven Kollektiv. Alle anderen Antigene waren im eradizierten Kollektiv im Vergleich zu ihrem

Auftreten im positiven Kollektiv seltener vorhanden, d.h. die Immunantwort sank nach erfolgreicher Eradikation für alle Antigene, außer für das Antigen CagA. Die folgende Abbildung 16 veranschaulicht diesen Zusammenhang. Es werden die Positivitätsraten der sechs auf dem recomLine® präsentierten Antigene für die drei Histologie Kategorien *H. pylori* negativ, positiv und eradiziert gezeigt. Die Positivitätsraten (%) wurden berechnet aus der Anzahl der positiven Fälle des jeweiligen Antigens bezogen auf die Anzahl der positiven recomLine® Fälle im entsprechenden Kollektiv.

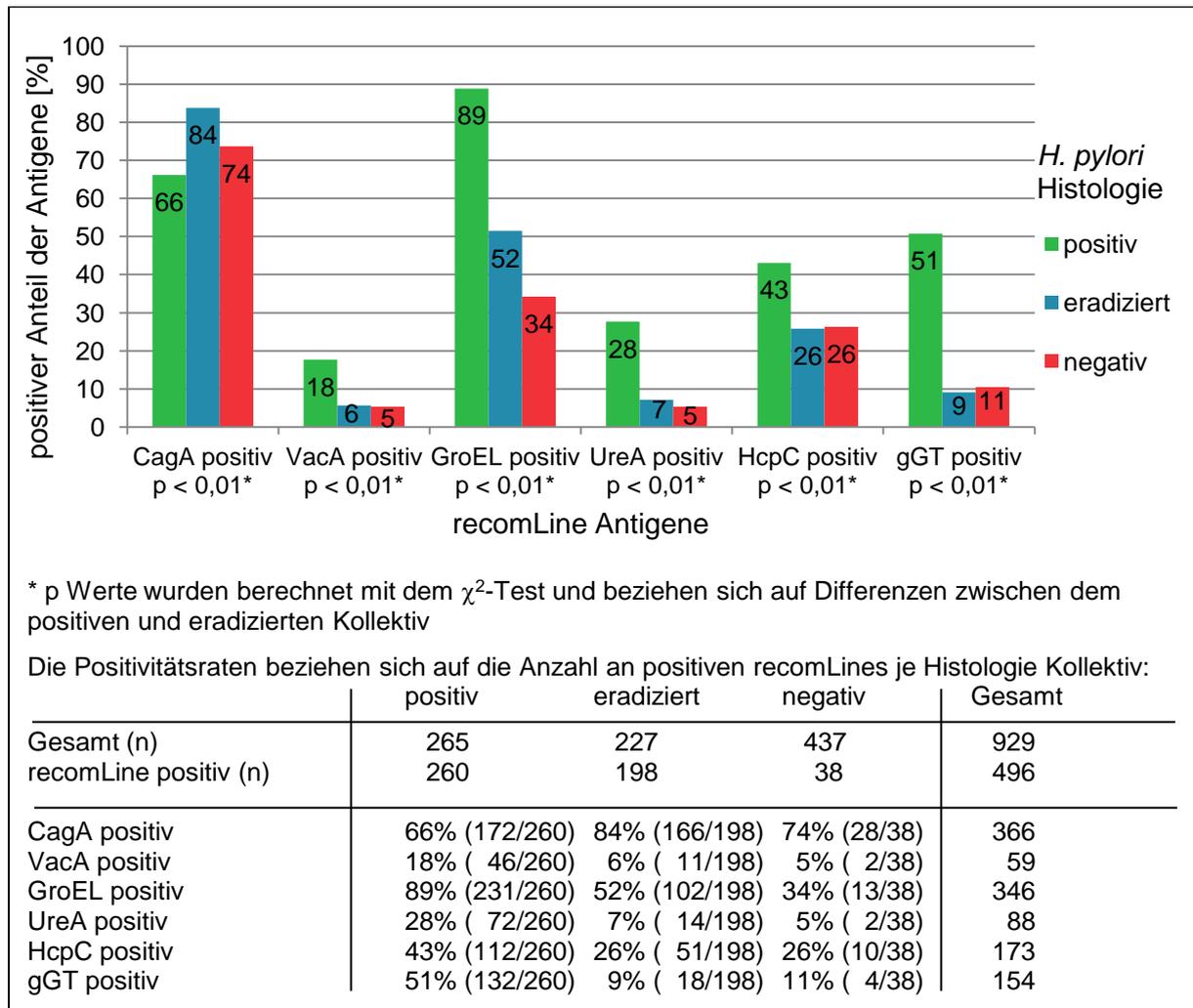


Abbildung 16: Positive recomLine® Antigene bezogen auf die einzelnen Histologie Kategorien

Des Weiteren wurde die Verteilung von CagA in Bezug auf die Herkunft der Patienten untersucht. Wie bereits gezeigt wurde, weisen die Studienteilnehmer mit Migrationshintergrund höhere *H. pylori* Prävalenzen auf (Vgl. Abb. 11). Um Hinweise auf mögliche Unterschiede in der Pathogenität der *H. pylori* Stämme zu erlangen wurde daher in einem weiteren Schritt die Prävalenz von CagA analysiert. Bezüglich CagA zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung zwischen den Herkunftsgruppen; die als „deutsch“

klassifizierte Gruppe war mit 35% signifikant ($p < 0,01$) seltener CagA positiv als die Gruppe anderer Herkunft mit 59 – 63% CagA Positivität.

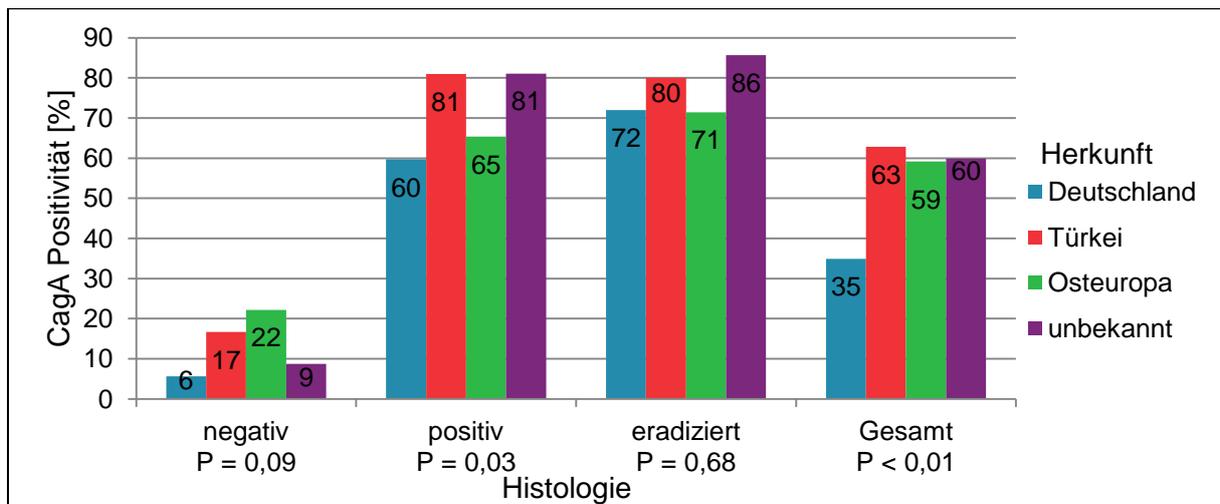


Abbildung 17: Anteil von CagA in Bezug auf die Histologie und Herkunft

4.2.3 Korrelation der Serologie mit den Krankheitsgruppen Gastritis, Ulcus und Karzinom

Zunächst wurde die Verteilung der einzelnen Histologiebefunde im gesamten Kollektiv betrachtet:

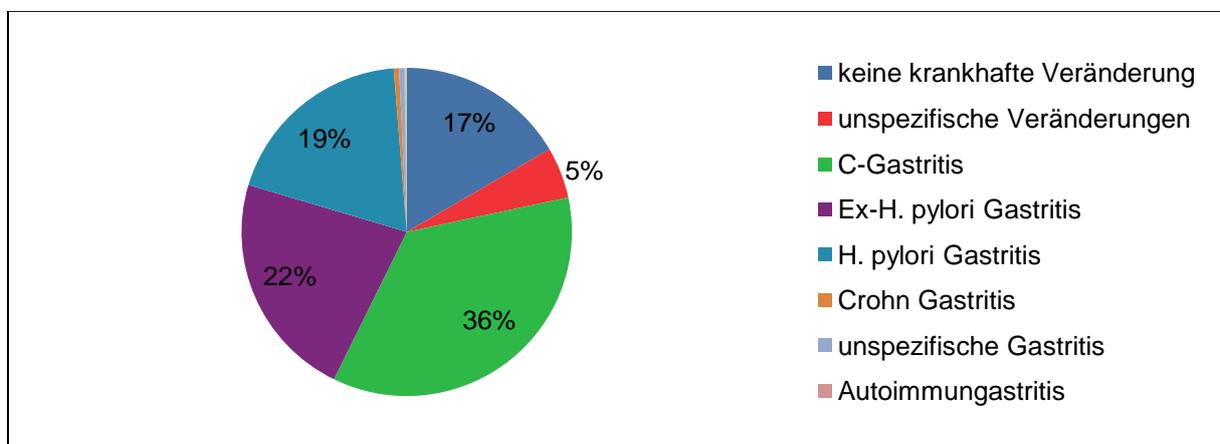


Abbildung 18: Verteilung der Histologiebefunde im gesamten Kollektiv (n = 1350)

Die *H. pylori* positiven Histologiebefunde wurden anschließend nach ihren verschiedenen Merkmalsgruppen aufgeteilt. Es wurden folgende einzelne Kategorien betrachtet.

- Grad der Entzündung (n = 258)
 - geringgradig n = 37
 - mittelgradig n = 198
 - hochgradig n = 23

- Aktivität der Entzündung (n = 257)
 - keine Aktivität n = 6
 - geringe Aktivität n = 144
 - mäßige Aktivität n = 89
 - hohe Aktivität n = 18

- Ulcus, prämaligne und maligne Veränderungen (n = 258)
 - keine n = 188
 - vorhanden n = 70

Die Gruppe Ulcus, prämaligne und maligne Veränderungen beinhaltet 24 Fälle von Atrophie (davon wurde bei 3 Fällen zusätzlich eine intestinale Metaplasie festgestellt), 30 Fälle von intestinaler Metaplasie (entsprechend wurden hier 3 Fälle mit gleichzeitig bestehender Atrophie festgestellt), 15 Ulcus Fälle und 4 Magenkarzinome. Die Untergruppen mit keiner und geringer Aktivität wurden im Folgenden aufgrund der geringen Fallzahl mit keiner Aktivität (n = 6) unter der Bezeichnung „geringe“ Aktivität zusammengefasst.

In einem ersten Schritt wurde die Assoziation einzelner Antigene mit dem Grad und der Aktivität der Entzündung untersucht. Die folgenden Graphen zeigen den positiven Anteil des jeweiligen Antigens in Bezug auf den Grad der Entzündung und die Aktivität der Entzündung.

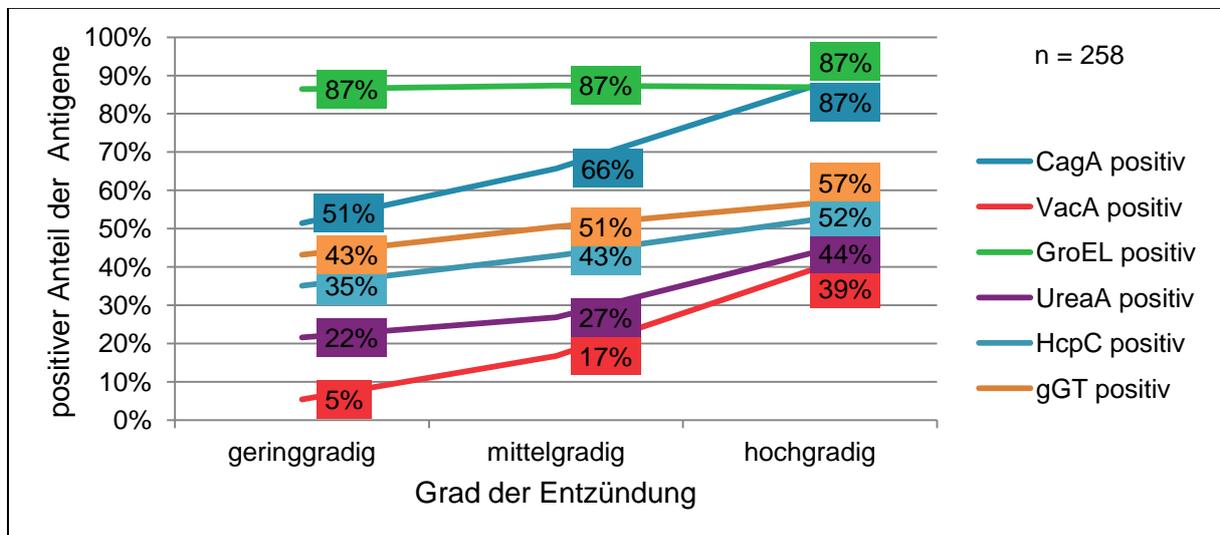


Abbildung 19: Positivitätsraten der Antigene in Bezug auf den Grad der Entzündung

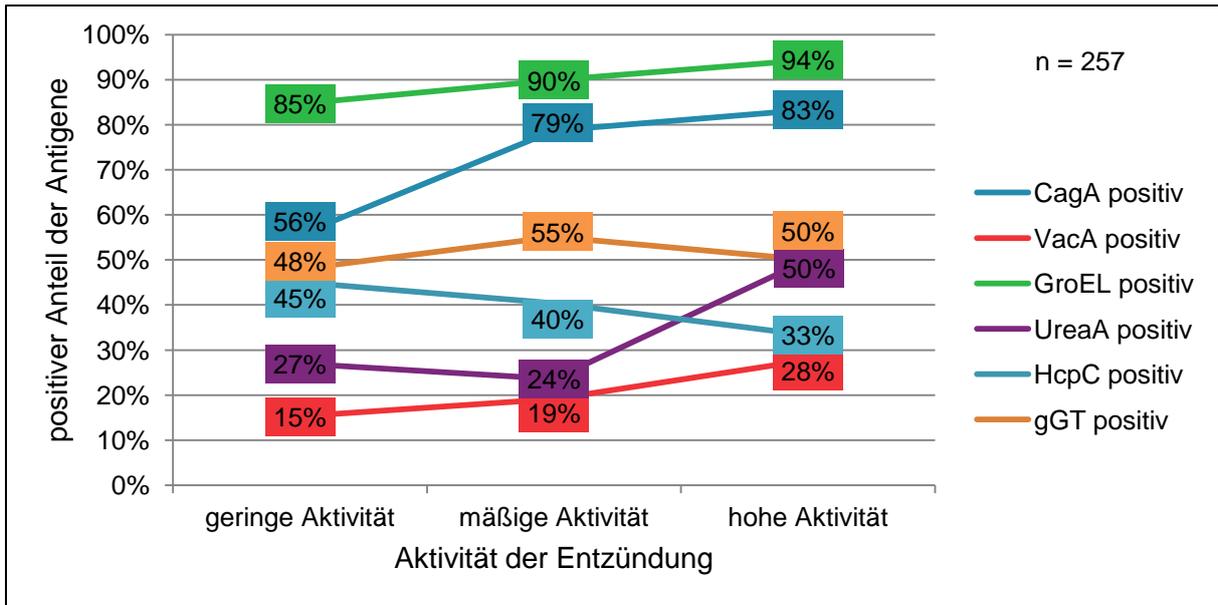


Abbildung 20: Positivitätsraten der Antigene in Bezug auf die Aktivität der Entzündung

Es ergaben sich signifikante Zusammenhänge ($p < 0,01$) zwischen CagA und dem Grad und der Aktivität der Entzündung. So lag zum Beispiel der Anteil an CagA positiven recomLine® Testergebnissen bei einer hochgradigen Entzündung bei 87,0% im Gegensatz zu 51,4% CagA positiven Ergebnissen bei einer geringgradigen Entzündung. Für die signifikanten Zusammenhänge zwischen CagA und dem Grad, bzw. der Aktivität der Entzündung wurden zwei weitere Diagramme zur besseren Darstellung erstellt.

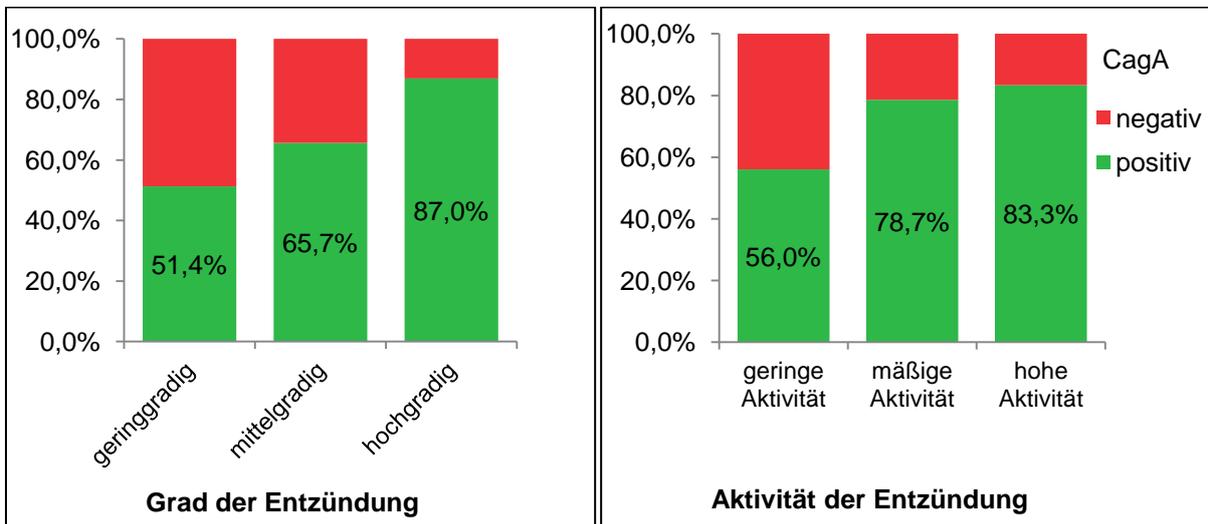


Abbildung 21: Zusammenhang zwischen dem Antigen CagA (laut recomLine®) und dem Grad, bzw. der Aktivität der Entzündung in der Histologie $p < 0,01$, χ^2 -Test

Für das Antigen VacA ergaben sich signifikante Assoziationen ($p < 0,01$) mit dem Grad der Entzündung, aber nicht mit der Aktivität. Der Anteil VacA positiver recomLine®

Testergebnisse stieg von 5,4% bei geringgradiger Entzündung hoch zu 39,1% bei hochgradiger Entzündung.

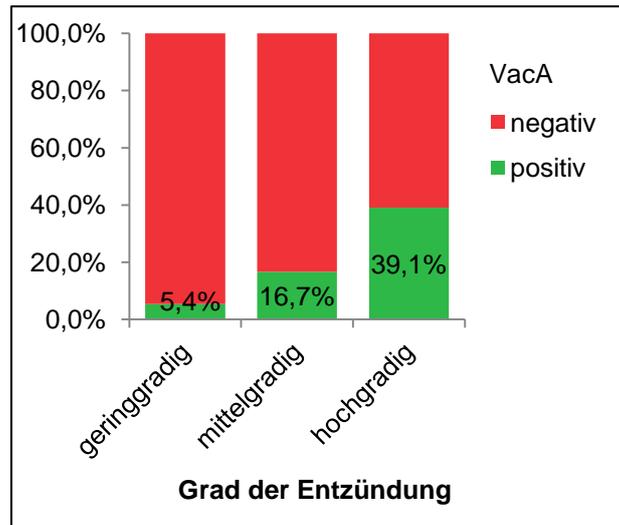


Abbildung 22: Zusammenhang zwischen dem Antigen VacA und dem Grad der Entzündung in der Histologie $p < 0,01$, χ^2 -Test

Für die anderen Antigene wurden zum Teil auch Anstiege der Positivitätsraten festgestellt, jedoch nicht im signifikanten Ausmaß, wie aus den nachstehenden Tabellen zu entnehmen ist.

Tabelle 14: Positivitätsraten (%) der einzelnen Antigene im recomLine® bezogen auf den Grad und die Aktivität der Entzündung und pathologische Veränderungen

	Histologie Grad der Entzündung			P
	geringgradig	mittelgradig	hochgradig	
Gesamt (n)	37	198	23	
CagA positiv	51,4	65,7	87,0	< 0,01
VacA positiv	5,4	16,7	39,1	< 0,01
GroEL positiv	86,5	87,4	87,0	0,98
UreaA positiv	21,6	26,8	43,5	0,16
HcpC positiv	35,1	42,9	52,2	0,43
gGT positiv	43,2	50,5	56,5	0,58

	Histologie Aktivität der Entzündung			P		
	geringe	mäßige	hohe			
Gesamt (n)	150	89	18			
CagA positiv	56,0	78,7	83,3	<0,01		
VacA positiv	14,6	19,1	27,8	0,35		
GroEL positiv	84,6	89,9	94,4	0,52		
UreaA positiv	27,3	23,6	50,0	0,06		
HcpC positiv	45,3	40,4	33,3	0,73		
gGT positiv	48,0	55,1	50,0	0,31		
	Pathologie					P
	keine	Atrophie	Metaplasie	Ulcus	Karzinom	
Gesamt (n)	188	24	30	15	4	
CagA positiv	54,3	71,4	100,0	100,0	100,0	< 0,01
VacA positiv	15,4	19,0	20,0	33,3	75,0	0,17
GroEL positiv	86,2	81,0	96,7	80,0	100,0	0,35
UreaA positiv	27,7	14,3	36,7	46,7	0,0	0,13
HcpC positiv	45,7	28,6	33,3	46,7	50,0	0,45
gGT positiv	48,9	47,6	63,3	46,7	75,0	0,51

Bei den Pathologiezeichen zeigten sich signifikante Zusammenhänge für CagA: bei intestinaler Metaplasie, Ulzerationen und Karzinomen war CagA in allen Fällen positiv, bei nicht Vorhandensein diverser Pathologiezeichen lag dieser Wert nur bei 54,3%. Weiterhin wurde für VacA ein signifikanter Zusammenhang mit Karzinombefunden festgestellt. 75% der Karzinom Patienten waren VacA positiv, hingegen waren nur 15,4% der Studienteilnehmer mit fehlenden Anzeichen pathologischer Veränderungen VacA positiv.

Der recomLine® Test teilt die *H. pylori* seropositiven Fälle in einen virulenteren Typ I Stamm (CagA u/o VacA positiv) und in einen Typ II Stamm (CagA und VacA negativ). Da sich die Einteilung auf die beiden Antigene CagA und VacA stützt zeigten sich auch hier signifikante Zusammenhänge ($p < 0,01$) zwischen dem Stamm und der Aktivität der Entzündung und den Pathologiezeichen. Für die Assoziation zwischen dem *H. pylori* Stamm und dem Grad der Entzündung zeigte sich eine Signifikanz von $p = 0,03$.

Es zeigten sich weiterhin signifikante Zusammenhänge ($p < 0,01$) zwischen dem Punkte Score im recomLine® und dem Grad und der Aktivität der Entzündung. So erreichten Patienten mit höhergradigen und hoch aktiven *H. pylori* Entzündungen im recomLine® ein durchschnittlich höheres Testergebnis als die anderen Patienten.

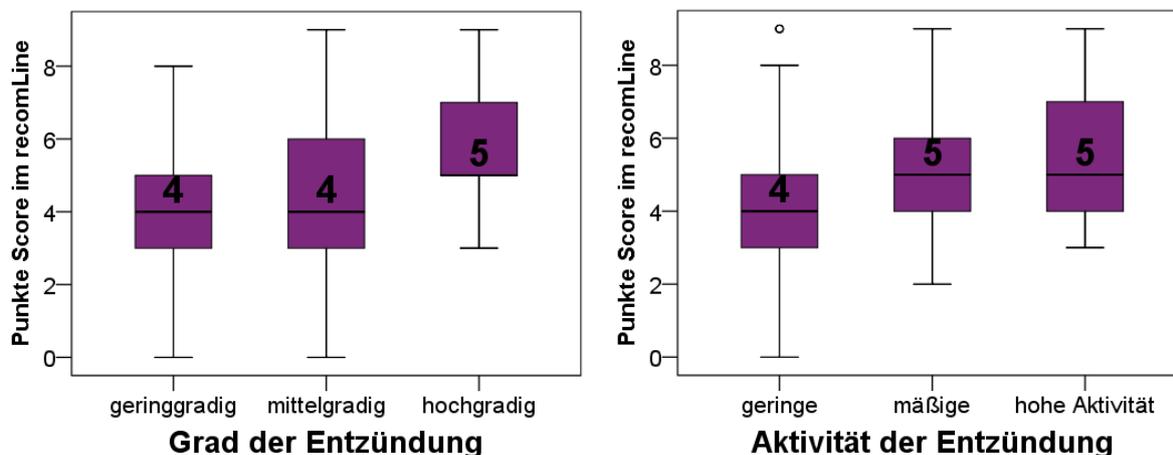


Abbildung 23: Zusammenhang zwischen recomLine® Punkte Score und Grad / Aktivität der Entzündung $p < 0,01$, angegeben ist der Median

Für das Vorhandensein von Pathologiezeichen konnten ebenfalls signifikante Zusammenhänge ($p < 0,01$) mit dem Punkte Score im recomLine® und der Anzahl der positiven Antigene im recomLine® festgestellt werden. So zeigte sich zum Beispiel bei Karzinomen ein durchschnittlicher Punkte Score von $6,75 \pm 1,89$ im Gegensatz zu einem Mittelwert von $4,35 \pm 1,92$ bei fehlenden Pathologiezeichen.

Tabelle 15: RecomLine® Score und Anzahl positiver Antigene in Abhängigkeit verschiedener Histologie-merkmale angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung

	Histologie Grad der Entzündung			P
	geringgradig	mittelgradig	hochgradig	
recomLine® Score	3.9 ± 1.5	4.6 ± 1.9	5.8 ± 1.8	<0.01
positive Antigene	2.4 ± 1.0	2.9 ± 1.3	3.6 ± 1.2	<0.01
	Histologie Aktivität der Entzündung			P
	geringe Aktivität	mäßige Aktivität	hohe Aktivität	
recomLine® Score	$4,3 \pm 1,9$	5.0 ± 1.7	5.4 ± 1.7	<0.01
positive Antigene	$2,8 \pm 1,3$	3.1 ± 1.2	3.4 ± 1.2	0.06

	Pathologie					P
	keine	Atrophie	Metaplasie	Ulcus	Karzinom	
recomLine® Score	4.4 ± 1.9	4.5 ± 1.7	5.7 ± 1.5	5.7 ± 1.8	6.8 ± 1.9	<0.01
positive Antigene	2.8 ± 1.3	2.8 ± 1.2	3.5 ± 1.2	3.5 ± 1.1	4.0 ± 1.4	<0.01

4.2.4 Cutoff des recomLine®

Auf jedem recomLine® Teststreifen befindet sich eine Cutoff Bande. Nur Banden die dieselbe oder eine stärkere Intensität als diese Bande aufweisen werden laut Hersteller als positiv gewertet. Banden deren Intensität unter der der Cutoff Bande sind werden als negativ gewertet.

Es wurde analysiert, ob ein Einbeziehen dieser Banden unterhalb des Cutoffs zu einem weiteren Sensitivitätsgewinn des recomLine® führt. Für die Berechnungen wurden Banden oberhalb der Cutoff Intensität entsprechend den Herstellerangaben 1 oder 2 Punkte verliehen. Banden mit einer Intensität unterhalb des Cutoff Niveaus wurden 0,5 Punkte verliehen. Bei dieser „sensitiven“ Bandenbewertung ergab sich eine Sensitivität von 98,4% (261/265) und eine Spezifität von 78,7% (344/437), im Gegensatz zu einer Sensitivität von 98,1% (260/265) und einer Spezifität von 91,3% (399/437) bei einer konventionellen Bandenbewertung. Dabei wurden fragliche Ergebnisse mit mehr als einer positiven Bande (unter- oder oberhalb dem Cutoff) als positiv gewertet.

Die beste Sensitivität und Spezifität findet sich bei Miteinbeziehung der fraglichen Banden – genauso wie bei der konventionellen Bandenbewertung – bei einem Punktwert von größer gleich zwei Punkten, wie die nachfolgende Tabelle 16 zeigt.

Tabelle 16: Sensitivität und Spezifität bei diversen recomLine® Punktwerten (sensitive Bandenbewertung)

	recomLine® positiv wenn \geq	Sensitivität	Spezifität
 negativ	0,0	1,00	0,00
	0,5	0,98	0,78
	1,0	0,98	0,88
	1,5	0,97	0,91
----- positiv 	2,0	0,97	0,91
	2,5	0,92	0,96
	3,0	0,83	0,97
	3,5	0,78	0,97
	4,0	0,74	0,98
	4,5	0,60	0,99
	5,0	0,51	0,99
	9,0	0,03	1,00

4.3 Auswertung recomLine® und recomWell® im eradizierten *H. pylori* Kollektiv

Das *H. pylori* eradizierte Kollektiv besteht aus 439 Fällen, von denen 213 im recomWell® positiv und 226 negativ waren. Von den 227 recomLine® getesteten Fällen waren 198 Fälle recomLine® positiv. Es wurden alle recomWell® positiven Fälle mit dem recomLine® getestet und nur 14 der recomWell® negativen Fälle, daher darf für die Berechnung der Seropositivität (48,7%) im eradizierten Kollektiv nur der recomWell® betrachtet werden.

Tabelle 17: *H. pylori* eradiziertes Kollektiv

		recomLine®		nicht recomLine® getestet	Gesamt
		negativ	positiv		
recomWell®	negativ	11	3	212	226
	positiv	18	195	0	213
Gesamt		29	198	212	439

Im eradizierten Kollektiv wurden im recomLine® im Durchschnitt $1,59 \pm 1,09$ Antigene erkannt ($n = 227$), der Punkte Score Mittelwert im recomLine® lag bei $2,82 \pm 1,74$. Beide Mittelwerte liegen signifikant ($p < 0,01$) unter den entsprechenden Werten im positiven Kollektiv (Antigene im positiven Kollektiv $\bar{x} 2,89 \pm 1,27$ und Punkte Score im positiven Kollektiv $\bar{x} 4,58 \pm 1,89$).

Wie schon in Abschnitt 4.2.2 *Häufig erkannte recomLine® Antigene* analysiert, sticht im eradizierten Kollektiv vor allem das Antigen CagA heraus, dass als einziges Antigen eine relativ erhöhte Inzidenz im Serum eradizierter Patienten zeigt. Bei den Antigenen VacA, UreA, HcpC und gGT entspricht die serologische Antwort im eradizierten Kollektiv der serologischen Antwort im negativen Kollektiv. Lediglich bei GroEL findet sich eine erhöhte Inzidenz von 51,5% im eradizierten gegenüber 34,2% im negativen Kollektiv. Im Gegensatz zu dem Antigen CagA liegt hier jedoch der Anteil von GroEL im positiven Kollektiv mit 88,8% deutlich über dem Wert im eradizierten Kollektiv (s.h. Abbildung 16). Eine weitere Rolle spielt außerdem die alleinige Seropositivität von CagA im recomLine®: wie bereits in Abschnitt 4.2.1 *diskrepante Fälle* beschrieben, liegt die Rate an alleinig CagA positiven Fällen ($n = 104$) im eradizierten Kollektiv mit 37,9% (75/198) deutlich höher als im positiven Kollektiv mit 4,2% (11/260).

Neben den einzelnen Antigenen wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der serologischen Immunantwort und der Zeit seit Eradikation, also einer Halbwertszeit der Immunantwort, untersucht. In 264 Fällen war das Jahr der Eradikation bekannt. Für den recomWell® wurden die Positivitätsraten (Anzahl an recomWell® positiven in einer Altersgruppe auf die Anzahl an allen recomWell® getesteten in dieser Altersgruppe) in Prozent berechnet. Für die recomWell® Extinktion wurden die Mittelwerte \pm Standardabweichung berechnet. Es zeigte sich ein klarer, jedoch nicht signifikanter, Abfall des recomWell® Score Mittelwertes ($p = 0,07$) sowie der recomWell® Positivität ($p = 0,05$) mit zunehmenden Jahren seit Eradikation.

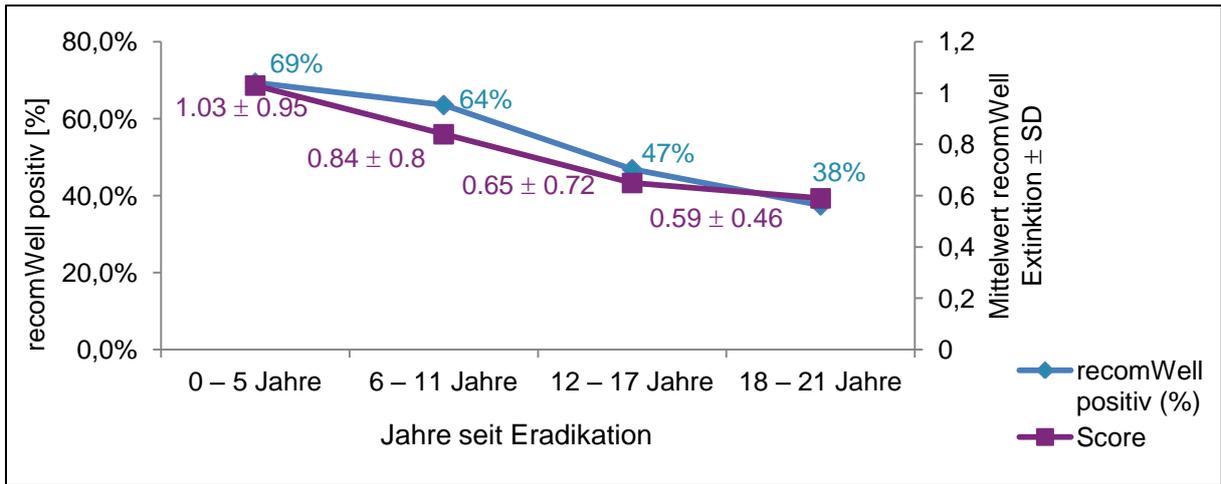


Abbildung 24: Zusammenhang zwischen Zeitpunkt der Eradikation und der Immunantwort im recomWell®

Im recomLine® zeigte sich ebenfalls ein Abfall der Positivitätsraten (94,2% bei 0 – 5 Jahren nach Eradikation und 84,6% bei 12 – 17 Jahren nach Eradikation) und der Mittelwerte der positiven Antigene (1,91 Antigene bei 0 – 5 Jahren nach Eradikation und 1,15 Antigene bei 12 – 17 Jahren nach Eradikation), jedoch ist aufgrund zu geringer Fallzahlen keine genauere Betrachtung möglich (166/264 getestet, davon 149 positiv). Weiterhin wurden die Positivitätsraten der einzelnen Antigene berechnet. Es zeigte sich ein Abfall der fünf Antigene VacA, GroEL, UreaseA, HcpC und gGT sowie ein relativer Anstieg der Positivität von CagA mit zunehmenden Jahren seit Eradikation. Der Wiederanstieg der Antigene zwischen der Gruppe 12 – 17 Jahre und 18 – 21 Jahre nach Eradikation ist aufgrund mangelnder Fallzahlen (n = 3) nur unzureichend beurteilbar.

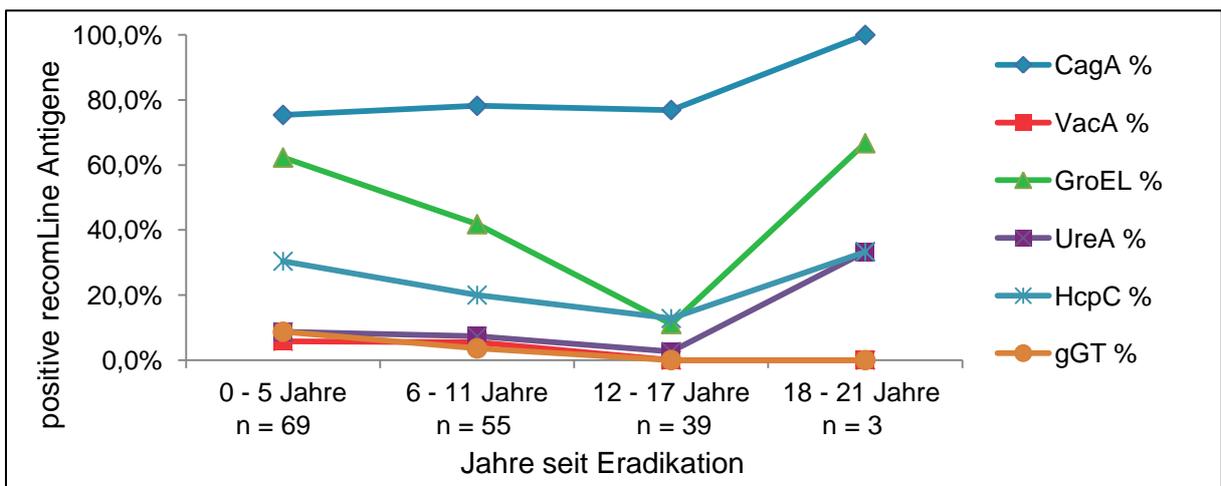


Abbildung 25: Zusammenhang zwischen Zeitpunkt der Eradikation und den Antigenen im recomLine®

Des Weiteren wurde die Übereinstimmung zwischen recomLine® und recomWell® im eradizierten Kollektiv betrachtet. Es zeigte sich eine Übereinstimmung von 90,7%. Der recomWell® erkennt 18 der eradizierten Fälle als positiv, die im recomLine® negativ sind; dieser wiederum erkennt 3 Fälle als positiv an, die im recomWell® negativ sind. Aussagen zu der Sensitivität der beiden Verfahren sind hier jedoch nicht möglich, da sich aus einem eradizierten *H. pylori* Status keine zwingende positive Immunantwort ergibt.

4.4 Vergleich der einzelnen Testverfahren

In verschiedenen Unterprojekten dieser Arbeit wurden neben dem recomLine® und recomWell® weitere serologische und auch genetische Methoden angewandt um die Validität des recomLine® weiter zu überprüfen. Im Einzelnen wurden in den kommenden Abschnitten diese Verfahren in Bezug auf den recomLine® ausgewertet.

4.4.1 Immunoblot®

Insgesamt wurden 338 Fälle mit dem alten Vorläufer Immunoblot® Verfahren getestet, davon waren 210 Histologie positiv und 128 Histologie negativ. Für den recomWell® ergab sich in diesem Kollektiv eine Sensitivität von 86,2% (181/210) und eine Spezifität von 99,2% (127/128), für den recomLine® eine Sensitivität von 97,6% (205/210) und eine Spezifität von 98,4% (126/128) und für den Immunoblot® eine Sensitivität von 85,2% (179/210) und eine Spezifität von 98,4%. Somit zeigten alle drei serologischen Methoden eine vergleichbare Spezifität, der recomLine® zeigte die beste Sensitivität.

Die beiden Testverfahren recomLine® und Immunoblot® stimmten in 91,7% der Fälle überein. Für das Antigen CagA zeigte sich eine Übereinstimmung von 91,2%, wobei der recomLine® mehr CagA positive (72,4%) erkannte als der Immunoblot® (69,1%).

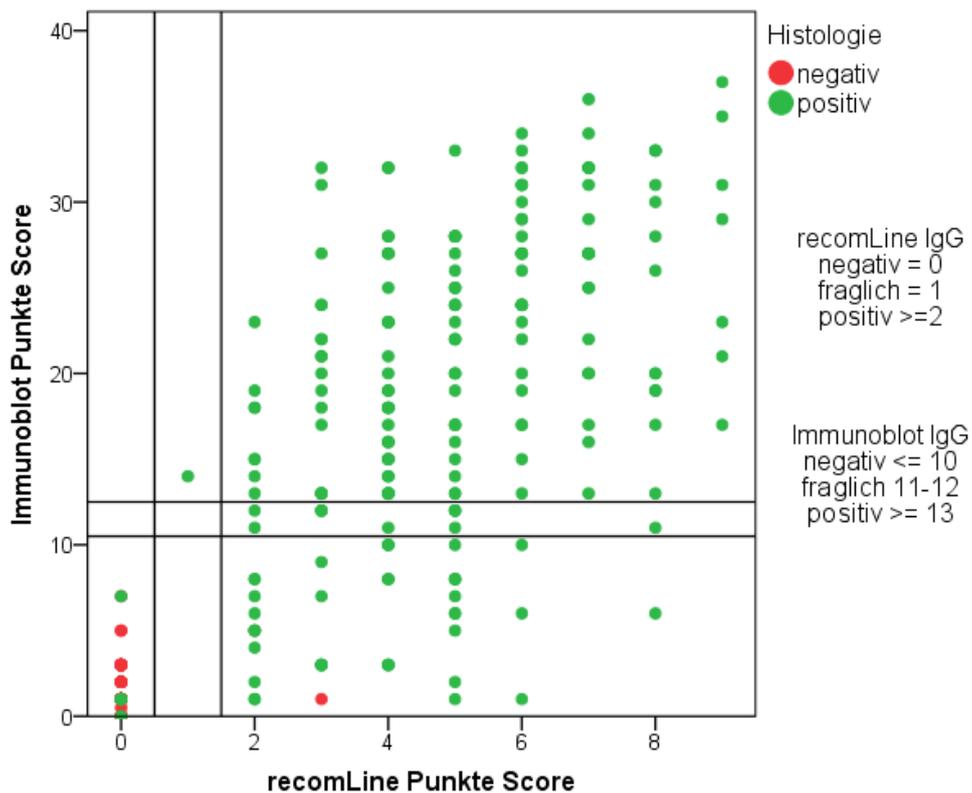


Abbildung 26: Übereinstimmung zwischen dem Punkte Score im recomLine® und Immunoblot®

Wie in der obigen Abbildung 25 zu erkennen ist, ist der recomLine® sensitiver als der Immunoblot®: es wurden mehr *H. pylori* positive Fälle durch den recomLine® erkannt. Insgesamt erkannte der recomLine® 26 positive Histologie Fälle, die der Immunoblot® nicht erkannte. Dies ist in der Abbildung im unteren rechten Feld veranschaulicht: die in der Histologie *H. pylori* positiven Fälle (blau) werden von dem recomLine® als positiv erkannt, haben also größer oder gleich zwei Punkte im recomLine® (x-Achse). Der Immunoblot® Score für diese Fälle liegt aber unterhalb von 10 Punkten, also im negativen Bereich (y-Achse). Im Gegensatz dazu brachte der Immunoblot® nur in einem Fall einen diagnostischen Vorteil und erkannte einen Histologie positiven Fall, der im recomLine® fraglich war.

4.4.2 Luminex Verfahren

Es wurden 180 Fälle ausgewählt (139 Histologie-positiv, 41 Histologie-negativ) und mit dem Luminex Verfahren in Heidelberg gescreent. Es ergab sich eine Sensitivität von 95,7% und eine Spezifität 78%. Im Gegensatz dazu zeigte der recomLine® eine Sensitivität von 98,6% und eine Spezifität von 70,7%. Die niedrigere Spezifität ergibt sich dadurch, dass unter anderem unklare Fälle (Histologie-negativ und Serologie-positiv) mit dem Luminex Verfahren getestet wurden. Die beiden serologischen Verfahren stimmen in 91,7% miteinander überein.

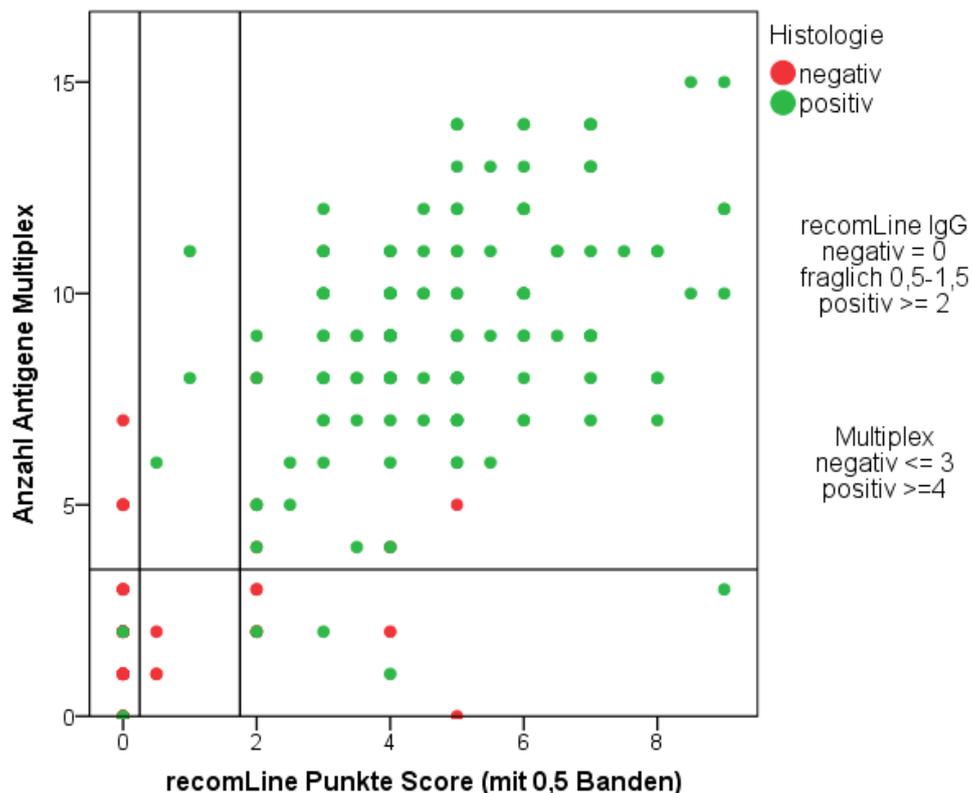


Abbildung 27: Korrelation der Anzahl der Antigene im Luminex mit der Summe im recomLine®

Bei den einzelnen Antigenen zeigten sich die besten Übereinstimmungen für CagA (92,2%) und GroEL (93,3%). VacA (65,0%) und UreaseA (65,0%) schnitten am schlechtesten ab, wobei hier auffiel, dass die Übereinstimmung besonders schlecht war, wenn es um die als positiv erkannten Antigene ging. Da stimmten recomLine® und Luminex Verfahren bei dem Antigen VacA in nur 34,8% und bei dem Antigen UreaseA in 42,3% überein.

Die Unstimmigkeiten in der Antigenerkennung ergaben sich vor allem für die Fälle in denen die Antigene im recomLine® negativ und im Luminex positiv waren. Dies war für VacA und UreaseA jeweils 60 Mal der Fall. Für diese Fälle zeigte sich jeweils ein geringerer Score im Multiplex als für die Fälle, in denen beide Verfahren für das Antigen positiv waren. Bei VacA waren von den 60 Fällen 58 in der Histologie *H. pylori* positiv, bei der Urease waren 48 in der Histologie positiv, die anderen Fälle waren jeweils Histologie *H. pylori* negativ. Insgesamt ist das Luminex Verfahren für die Antigene VacA und UreaseA sensitiver als der recomLine®. Eine mögliche Ursache ist die Verwendung nativer Antigene im Multiplex, im Gegensatz zu aufgereinigten und auf fester Phase fixierten Antigenen im recomLine®.

Tabelle 18: Mittelwert des Luminex Scores in Bezug auf die Übereinstimmung mit dem recomLine®

	Cutoff Multiplex	Mittelwert Luminex Score		
		beide Verfahren negativ	beide Verfahren positiv	Multiplex positiv recomLine® negativ
VacA	316	103 ± 89,4	2841 ± 2385	1010 ± 773 (n = 60)
GroEL	100	78,7 ± 495,2	1377 ± 563	503 ± 373 (n = 8)
UreA	144	31,7 ± 36,2	7508 ± 2450	1247 ± 1426 (n = 60)
HcpC	100	8,1 ± 18,2	3026 ± 1969	59,1 ± 27,0 (n = 7)

Andersherum kam es seltener vor, dass im recomLine® ein Antigen positiv war und im Luminex negativ. Dies traf unter anderem für HcpC (n = 18), CagA (n = 14), GroEL (n = 4), VacA (n = 3) und UreaseA (n = 3) zu.

4.4.3 PCR der humanen Magenbiopsien

Von 63 DNA Isolaten aus humanen Magenbiopsien wurde eine PCR durchgeführt. Davon waren 50 Histologie positiv, von denen wiederum nur 41 durch die PCR eindeutig als positiv erkannt wurden. Alle 13 Histologie negativen Fälle waren in der PCR ebenfalls negativ.

Zunächst wurden die Screening Primer gegen insgesamt 15 verschiedenen *H. pylori* Proteine an dem *H. pylori* Stamm G27 als positiv Kontrolle getestet.

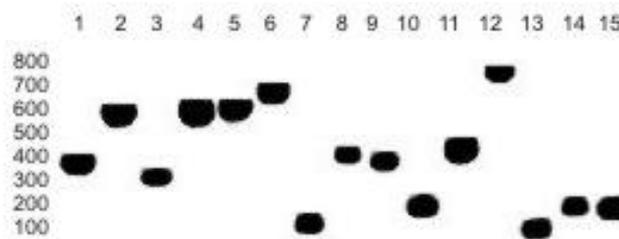


Abbildung 28: Positiv Kontrolle der PCR Screening Primer, *H. pylori* G27

Als negativ Kontrolle dienten DNA Isolationen aus Magenbiopsien von Histologie und Serologie *H. pylori* negativen Studienteilnehmern. Die Nummern 1 – 15 stehen für die einzelnen Antigene und sind der Tabelle 7 im Abschnitt 3.2.1 *Design der Primer* zu

entnehmen. Anschließend wurden alle DNA Isolate auf die 15 Antigene getestet. Im Folgenden werden zwei Beispiele, ein positives und ein negatives Ergebnis, gezeigt.



Abbildung 29: Patient Nummer P005, positives PCR Ergebnis

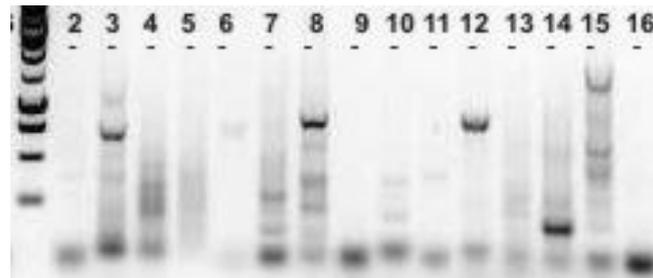


Abbildung 30: Patient Nummer MRI 10, negatives PCR Ergebnis

Wie bereits erwähnt waren neun der Histologie-positiven Fälle in der PCR negativ. Die DNA Konzentrationen der betroffenen Fälle ($\bar{O} 69,8 \pm 39,0 \text{ ng}/\mu\text{l}$) lagen in vergleichbaren Werten zu denen der PCR positiven Fälle ($\bar{O} 92,3 \pm 126,2 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Um auszuschließen, dass die DNA Polymerasen in den neun Fällen z.B. durch Gewebsbestandteile inhibiert waren, wurden Primer eingesetzt, die an die humane DNA binden („Primer gGT“). In sieben Proben waren diese positiv, d.h. ein Ablesen des humanen Genoms war möglich und es lagen keine Inhibitoren vor. Die PCR in den betroffenen Proben war somit aufgrund fehlender *H. pylori* DNA negativ. Bei den anderen zwei Proben sind Inhibitoren anzunehmen, da weder die humane DNA noch die *H. pylori* DNA amplifiziert werden konnte. Die unten stehende Abbildung zeigt, dass der eingesetzte gGT Screening Primer nicht an die humane DNA aus Zelllinien (KG1, SnU, Jurkat) bindet, sondern lediglich an *H. pylori* DNA, gekennzeichnet durch ein „+“. Im Gegensatz dazu bindet der eingesetzte „Primer gGT“ bei den gleichen Proben an die humane DNA.

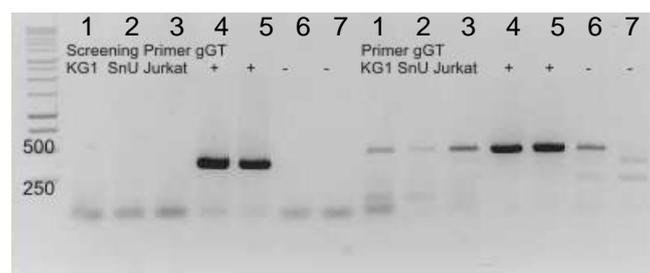


Abbildung 31: GGT Primer gegen humane DNA (1 – 3) und humane Magenbiopsien (4 – 7)

4.4.3.1 PCR Antigene

Bei den positiven PCR Proben wurden im Mittel $12,7 \pm 1,6$ Antigene erkannt mit einer Spannweite von 6 Antigenen [9; 15]. Die vier Antigene gGT, ICD, SabA und HP0231 waren in allen 41 PCRs positiv. Im Durchschnitt ergab sich eine positive Detektionsrate von 83,5% für alle gescreenten Antigene. Am seltensten positiv war CagA mit 51,2%.

Tabelle 19: Anzahl und Prozentangaben positiver Antigene in der PCR

Nr.	<i>H. pylori</i> Antigen	Anzahl	Prozent
1	gGT positiv	41	100,0 %
2	BabA positiv	14	34,1 %
3	HcpC positiv	35	85,4 %
4	CagA positiv	21	51,2 %
5	VacA positiv	36	87,8 %
6	UreA positiv	40	97,6 %
7	HtrA positiv	37	90,2 %
8	ICD positiv	41	100,0 %
9	NapA positiv	32	78,0 %
10	SabA positiv	41	100,0 %
11	Omp1 positiv	32	78,0 %
12	Omp15 positiv	34	82,9 %
13	HP0231 positiv	41	100,0 %
14	GroEL positiv	38	92,7 %
15	HpaA positiv	39	95,1 %

4.4.3.2 Vergleich PCR und Serologie

Als nächstes wurde die Übereinstimmung zwischen den erkannten Antigenen in der PCR und dem recomLine[®] überprüft. Fragliche recomLine[®] Banden mit einer Intensität unter dem Cutoff (0,5 Banden) wurden hier als positiv gewertet (n = 12). Insgesamt ergab sich eine Übereinstimmung von 66,7% (164/246). Die größte Übereinstimmung von 87,8% fand sich bei dem Antigen GroEL. Die Antigene VacA (36,6%) und UreaseA (53,7%) schneiden,

ebenso wie im Vergleich mit dem Luminex Verfahren, am schlechtesten ab, was auf ein technisches Problem bei der Aufbereitung der beiden Antigen hindeutet. In der folgenden Tabelle wurden neben den einzelnen Übereinstimmungs-raten ebenfalls die Sensitivität und Spezifität für die einzelnen Antigene des recomLine® berechnet. Hier ist die PCR als Goldstandard gesetzt, da davon auszugehen ist, dass eine positive Bande in der PCR ein eindeutiger Indikator dafür ist, dass das betroffene Antigen im jeweiligen *H. pylori* Genom vorhanden ist. Jedoch ist dies nicht unbedingt gleichbedeutend mit einer tatsächlichen Expression des betroffenen Proteins. In 82 Fällen stimmten die beiden Testverfahren nicht miteinander überein (33,3%). In 71 Fällen war die PCR für das betroffene Antigen positiv und die Serologie negativ. Hervor traten in dieser Gruppe vor allem die Antigene VacA (n = 26), UreaseA (n = 19) und gGT (n = 11). Es blieben noch 11 Fälle in denen die PCR für ein Antigen negativ und die Serologie positiv war. Hier lag das Augenmerk auf CagA (n = 7), weitere Fälle traten bei HcpC (n = 2) und GroEL (n = 2) auf.

Tabelle 20: Übereinstimmung zwischen der PCR und der Serologie (recomLine®)

	Übereinstimmung recomLine® – PCR	Sensitivität recomLine® in Bezug auf PCR	Spezifität recomLine® in Bezug auf PCR
CagA	80,5%	95,2% (20/21)	65,0% (13/20)
VacA	36,6%	27,8% (10/36)	100% (5/5)
GroEL	87,8%	92,1% (35/38)	33,3% (1/3)
UreA	53,7%	52,5% (21/40)	100% (1/1)
HcpC	68,3%	68,6% (24/35)	66,7% (4/6)
gGT	73,2%	73,2% (30/41)	

4.4.3.3 Korrelation Histologie und PCR

Es zeigten sich positive Korrelation von dem CagA und VacA Vorkommen in der PCR mit der Aktivität der Entzündung, bei CagA lag mit $p = 0,01$ eine signifikante Korrelation vor. Die Positivitätsraten sind in Prozent angegeben. Bezüglich dem Grad der Entzündung zeigten sich positive Korrelationen zwischen HcpC (0,11; $p = 0,67$) und HtrA (0,25; $p = 0,15$), jedoch nicht signifikant. Für die Pathologiezeichen gab es ebenfalls keine signifikanten Korrelationen, da hier die Fallzahlen sehr niedrig waren. Es fiel jedoch auf, dass alle Ulcus und Karzinom Patienten der betrachteten Untergruppe (n = 5) gGT, HcpC, CagA, VacA, UreA, ICD, SabA, HP0231, GroEL und HpaA positiv waren.

Zwischen der Anzahl an positiven Antigenen und den einzelnen Histologie Merkmalen wurden keine signifikanten Zusammenhänge festgestellt.

Tabelle 21: Korrelation Antigene in PCR mit der Aktivität der Entzündung in der Histologie

	Aktivität der Entzündung				Korrelation nach Spearman	P
	gering	mäßig	hoch	gesamt (n)		
gGT positiv	100,0	100,0	100,0	37		
BabA positiv	17,6	56,3	0,0	12	0,17	0,29
HcpC positiv	88,2	93,8	50,0	32	- 0,16	0,31
CagA positiv	23,5	62,5	75,0	17	0,42	0,01
VacA positiv	76,5	93,8	100,0	32	0,27	0,16
UreA positiv	94,1	100,0	100,0	36	0,17	0,57
HtrA positiv	88,2	100,0	75,0	34	0,04	0,74
ICD positiv	100,0	100,0	100,0	37		
NapA positiv	88,0	68,8	75,0	29	- 0,20	0,31
SabA positiv	100,0	100,0	100,0	37		
Omp1 positiv	94,1	81,3	50,0	31	- 0,32	0,09
Omp 15 positiv	76,5	93,8	50,0	30	0	1
HP0231 positiv	100,0	100,0	100,0	37		
GroEL positiv	88,2	93,8	100,0	34	0,14	0,53
HpaA positiv	94,1	100,0	75,0	35	-0,08	0,59
Gesamt	17	16	4	37		

5 Diskussion

Unumstritten ist die humanpathogene Bedeutung von *H. pylori* im Zusammenhang mit Magenschleimhautentzündungen, duodenalen und gastralen Ulzerationen, Karzinomen und MALT Lymphomen (Marshall und Warren 1984; Goodwin et al. 1986a; Uemura 2001; Parsonnet 1998; Stolte et al. 2002). Obwohl darüber hinaus vielfältige Risikofaktoren für einen schweren Krankheitsverlauf einer *H. pylori* Infektion bekannt sind, erlaubt die herkömmliche Diagnostik keine Voraussage bezüglich des weiteren Erkrankungsrisikos eines infizierten Patienten. Neben allgemeinen Risiken die eine *H. pylori* Infektion aggravieren können, wie zum Beispiel Rauchen, erlauben auch diverse Virulenzfaktoren eine prädiktive Aussage. Bekannte Antigene sind unter andere VacA und CagA, die beide eng mit einem erhöhten Karzinomrisiko korreliert sind (Gao et al. 2009b; Gao et al. 2009a; Huang et al. 2003; Koehler et al. 2003). Trotz dieser Befunde haben diese Antigene noch keinen Weg in die Standarddiagnostik gefunden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der recomLine® als ein neues serologisches Testverfahren zur Diagnostik von *H. pylori* ausgewertet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Antigene des recomLine® sowie die Summe der erkannten Antigene signifikant mit der Ausprägung einer Gastritis sowie prämaligen und malignen Veränderungen in der Histologie korrelieren.

Im Folgenden wird zunächst die Bedeutung der Serologie, insbesondere in Hinblick auf spezifische Antigene und das recomLine® Testverfahren, analysiert, um im Anschluss daran das Studienkollektiv und die Studienergebnisse näher zu diskutieren.

5.1 Bedeutung der Serologie

Der Serologie kommt in der Diagnostik des Bakteriums *H. pylori* nur eine untergeordnete Rolle zu. Bevorzugt wird die Diagnostik über die Histologie und den Atemtest durchgeführt, alternative Diagnostik erfolgt über die Kultur oder den Stuhl-Antigen-Test (Vgl. Umfrage des Nationalen Referenzzentrums für *Helicobacter pylori*, Kapitel 1.1.6). Die Serologie ist insbesondere als Screening Ansatz und vor allem in epidemiologischen Studien zur Bestimmung der *H. pylori* Prävalenz von Bedeutung. Aus diesem Grund werden im weiteren Verlauf die Eigenschaften für ein geeignetes Screening Verfahren erläutert und in Bezug auf die Serologie diskutiert. Zu den Qualitätskriterien eines derartigen Verfahrens zählen Validität (hohe Sensitivität und Spezifität), Reliabilität, Ausbeute, Kosten, Akzeptanz und Nachsorgeleistung (Wilson und Jungner 1968). Die genannten Anforderungen werden durch die Serologie zu einem großen Teil erfüllt. So konnten in der vorliegenden Arbeit

Sensitivitäten und Spezifitäten von über 90% bei verhältnismäßig geringen Kosten ermittelt werden. Außerdem ist die Blutentnahme im Gegensatz zu der Endoskopie weniger invasiv. Weiterhin haben Studien gezeigt, dass die Serologie sensitiver als symptom-basierte Screening-Strategien ist, wodurch die Anzahl an Endoskopien zur Diagnostik von *H. pylori* reduziert werden kann (Sobala et al. 1991). Des Weiteren ist die Serologie als Screening-Test zur Vorbeugung von Magenkarzinomen dem Atemtest deutlich überlegen (Xie et al. 2008).

Neben dem Screening Ansatz kann die Serologie auch als Kontrolluntersuchung nach einer Therapie angewandt werden. So konnte nachgewiesen werden, dass der Titer-Verlauf der Antikörper nach einer Eradikationstherapie absinkt, was als Erfolg der Therapie gewertet werden kann (Veenendaal et al. 1991). Da jedoch auch eradizierte Patienten noch einige Jahre nach der Therapie positive Antikörpertiter aufweisen, eignet sich die Serologie noch nicht dazu, eradizierte von infizierten Patienten zu unterscheiden (Culter et al. 1998). Eine Beurteilung des Therapieerfolges ist nach Eradikation also nur in Zusammenschau mit vorherigen Befunden möglich (Culter et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden weiterhin Anzeichen gefunden, die als Hinweise auf eine vorangegangene Eradikation gedeutet werden können. So gibt es beispielsweise Anzeichen dafür, dass eine alleinige CagA Seropositivität verstärkt bei bereits therapierten Studienteilnehmern gefunden werden kann. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnten daraus jedoch bisher keine endgültigen Schlüsse gezogen werden.

Zurzeit ist eine Seropositivität nicht gleichbedeutend mit einem Krankheitswert. Viele chronische *H. pylori* Infektionen verlaufen klinisch stumm und führen zu keinerlei Beschwerden (Kusters et al. 2006). Zwar haben Studien gezeigt, dass eine Eradikation symptomatischer dyspeptischer Patienten kosteneffektiv ist (Chiba et al. 2004), jedoch wird dabei außer Acht gelassen, dass zwischen Symptomen und Krankheiten meist keine Korrelation besteht und nur 10% der Patienten langfristig bezüglich ihrer Symptome profitieren (Moayyedi et al. 2011). Außerdem werden asymptomatische Patienten, die aufgrund virulenter *H. pylori* Stämme ein erhöhtes Krankheitsrisiko haben, bei rein klinisch orientierten Screening Ansätzen nicht erfasst. Auch um unnötige Eradikationstherapien zu vermeiden, ist es von großer Bedeutung, eine Differenzierung zwischen virulenten und weniger virulenten Stämmen zu schaffen. Ebendies gelingt dem recomLine[®], der in der vorliegenden Arbeit daher nicht als Screening Ansatz, sondern zur zusätzlichen Diagnostik verwendet wurde, um weitere Aussagen bezüglich des Krankheitsrisikos *H. pylori* infizierter Menschen treffen zu können.

5.1.1 RecomLine®

Der recomLine® beschränkte sich in der vorliegenden Arbeit auf den Nachweis von IgG Antikörpern, da diese der Langzeit-Immunantwort einer chronischen *H. pylori* Infektion entsprechen. Da im Rahmen der Untersuchung keine Bestimmung von IgA Antikörpern erfolgte, wurde eine Nachtestung von falsch negativen Seren in Erwägung gezogen. So ist der in der Literatur angegebene Anteil der IgA positiven und IgG negativen Antikörper gegen *H. pylori* mit 2% - 7% zwar relativ gering, könnte jedoch auf eine Reinfektion mit *H. pylori* hindeuten, da sich diese meist zunächst durch einen Wiederanstieg der IgA Antikörper bemerkbar macht (Jaskowski et al. 1997; Veenendaal et al. 1991).

Neben der Einstufung einer Serologie als positiv oder negativ, liefert der recomLine® Aussagen über sechs verschiedene *H. pylori* Antikörper. Widmer et. al zeigten in einer von ihnen durchgeführten Studie, dass eine hohe Anzahl an Antigenen zu einer guten Sensitivität führt, ohne die Spezifität zu senken (Widmer et al. 1999). Da die auf dem recomLine® präsentierten Antigene rekombinant hergestellt worden sind, erlauben sie eine einfache und klare Identifizierung der Antikörper durch leicht ablesbare Banden. Durch die sichere Identifizierung der Antigene CagA und VacA lässt sich eine Einordnung in den virulenteren Typ I Stamm und den weniger virulenten Typ II vornehmen. Außerdem ergaben die sechs Antigene verschiedene Antigenerkennungsprofile für unterschiedliche Gruppen, wie beispielsweise eradizierte Studienteilnehmer.

5.1.1.1 Sensitivität und Spezifität

Der recomLine® zeigte in der vorliegenden Arbeit eine Sensitivität von 98,1% sowie eine Spezifität von 97,1% und liegt damit vor den beiden anderen verwendeten Serologieverfahren (recomWell® Sensitivität 87,9% und Spezifität 96,6%; Immunoblot® Sensitivität 85,2% und Spezifität 98,4%). Der recomLine® zeichnet sich insbesondere durch eine deutlich bessere Sensitivität gegenüber dem recomWell® und Immunoblot® aus. Im Vergleich zum recomWell® lagen einige Diskrepanzen vor (n = 53), wobei die Mehrzahl der abweichenden Fälle (n = 41) im recomLine® richtig bewertet wurde. So identifiziert der recomLine® im Falle des *H. pylori* positiven Kollektivs 27 Fälle als richtig positiv, die im recomWell® nicht erkannt werden. Im recomLine® waren bei einem Großteil (n = 21) dieser 27 Fälle die Antigene, die vom recomWell® erkannt werden, CagA und GroEL, positiv. Der recomWell® hätte die betroffenen Fälle also bei vorhandener Immunantwort erkennen sollen. Der Immunoblot® erkennt im Vergleich zu dem recomLine® 26 Histologie-positive Fälle nicht als positiv und bietet dabei nur in einem Fall einen diagnostischen Vorteil (recomLine® negativ und Immunoblot® positiv).

Da auf dem Immunoblot[®] alle Antigene vorhanden sind, hätten analog zum recomWell[®] auch hier die Immunantworten erkannt werden sollen. Letztendlich präsentiert sich der recomLine[®] mit seinen rekombinant auflinierten Antigenen also wesentlich sensitiver als der recomWell[®] und als der Immunoblot[®]. Dass rekombinant hergestellte Antigene zu einer besseren Sensitivität und Spezifität führen, bestätigen auch Studien von Graessle und Reynders (Graessle et al. 1999; Reynders et al. 2012).

Insgesamt werden in der Literatur verschiedene Angaben bezüglich Sensitivität und Spezifität der Serologie gemacht. Eine Metaanalyse von Gisbert et. al aus dem Jahr 2006 ergab bei 9 Studien und 803 Patienten mit oberer gastrointestinaler Blutung eine Sensitivität von 88% und eine Spezifität von 69% für die Serologie (Gisbert et al. 2006). Insbesondere die Spezifität lag dabei deutlich unter den Werten anderer diagnostischer Verfahren (Vgl. Tabelle 2). Lediglich der Stuhl-Antigen-Test zeigte eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität von 87% und 70%. Bei der Beurteilung der Spezifität wird meist außer Acht gelassen, dass die Serologie im Gegensatz zu den anderen diagnostischen Methoden die Seronarbe einer bereits therapierten *H. pylori* Infektion erkennt. So tragen bereits eradizierte *H. pylori* negative Patienten mit einer positiven Serologieantwort zu einer schlechten Spezifität der Serologie bei (Bruden et al. 2011). Zur Zeit gibt es noch keine Möglichkeit zwischen einer aktiven und einer abgelaufenen Infektion in der Serologie zu unterscheiden, jedoch sollte der zusätzliche Informationsgewinn einer abgelaufenen Infektion in der Beurteilung der Spezifität Beachtung finden. In der vorliegenden Arbeit wurden die eradizierten Patienten gesondert betrachtet. Daraus resultierte eine niedrigere Anzahl an falsch positiven Serologieergebnissen und eine konstant hohen Spezifität von 97,1% im recomLine[®], 96,6% im recomWell[®] und 98,4% im Immunoblot[®].

Im Vergleich zu anderen nicht-invasiven diagnostischen Methoden variiert die Sensitivität der Serologie je nach Studien zwischen höheren (Alam El-Din et al. 2013), vergleichbaren (Bruden et al. 2011; Sudraba et al. 2011) und niedrigeren Werten (Mégraud 2005). Häufig werden nicht alle Methoden in einer Studie verglichen. Dies hat zur Folge, dass diese Untersuchungen keine endgültigen Schlüsse zulassen. Klar ersichtlich ist jedoch ein diagnostischer Vorteil der Serologie innerhalb bestimmter Patientengruppen. So ist die Immunantwort im Serum unabhängig von der Bakteriendichte (Korstanje et al. 2008). Bei sinkender Bakteriendichte in der Magenschleimhaut, beispielsweise im Rahmen einer PPI-Medikation (Gatta et al. 2004), einer atrophischer Gastritis (Kokkola et al. 2000), einem MALT Lymphom (Lehours et al. 2003) oder einem Magenkarzinom (Ekström et al. 2001), zeichnet sich die Serologie durch eine anhaltend hohe Sensitivität aus, wohingegen andere

diagnostische Verfahren aufgrund unzureichender Bakterienzahlen zu falsch negativen Ergebnissen führen können.

Es existiert ein großes Spektrum an diagnostischen Methoden zur Detektion einer *H. pylori* Infektion, wobei der Nutzen von mehreren Testverfahren als kritisch zu betrachten ist. Um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, ist ein Rückgriff auf das Verfahren mit der größten Sensitivität und Spezifität empfehlenswert. Die höchsten Werte in der Serologie erzielte in der vorliegenden Arbeit der recomLine®.

5.1.1.2 *H. pylori* spezifische Antigene

Um eine möglichst differenzierte Aussage über das Ergebnis treffen zu können, sind insgesamt sechs Antigene auf dem recomLine® aufliniert. Dabei fiel auf, dass im positiven Kollektiv 254 der 260 recomLine® positiven Ergebnisse entweder CagA und/oder GroEL positiv waren, die Positivität des recomLine® also fast ausschließlich über eines der beiden Antigene definiert wurde. Die restlichen sechs Fälle waren alle HcpC positiv, die anderen drei Antigene traten nur vereinzelt auf. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die nachlassende Expression bestimmter Proteine bei langanhaltender *H. pylori* Infektion, so wird zum Beispiel das Antigen UreA vor allem zu Beginn der Infektion zur Kolonisation benötigt (Andrutis et al. 1995). Eine weitere Ursache stellt die Variabilität des betroffenen Antigens dar. Im Falle von VacA sind geographische Verteilungsmuster und diverse Varianten der Gensequenz bekannt (Wen und Moss 2009). In dem neuen und aktuell in der Weiterentwicklung befindlichen recomLine® wurde daher statt auf ein einzelnes VacA Antigen auf die beiden Varianten m1 und m2 zurückgegriffen. Des Weiteren kann ein technisches Problem in der Herstellung rekombinanter Antigene, wie beispielsweise Probleme in der Faltung oder Aufreinigung, nicht ausgeschlossen werden. So zeigte das Luminex Verfahren, welches nicht auf gereinigten sondern auf nativ exprimierten rekombinanten Antigenen basiert, für die Antigene VacA und UreaseA eine deutlich bessere Sensitivität. Dies sollte in künftigen Prototypen des recomLine® Beachtung finden.

Im „falsch positiven“ recomLine® Kollektiv (n = 38) fiel auf, dass häufig CagA (n = 28) – in 18 Fällen sogar als einziges Antigen – positiv war. Unter den anderen Antigen fiel GroEL in vier Fällen und HcpC in drei Fällen mit alleiniger Seropositivität auf, während die anderen Antigene jeweils nur in Kombination mit weiteren Antigenen positiv waren. Als möglicher Grund für die „falsche“ Seropositivität ist am ehesten von einer Seronarbe einer vorangegangenen *H. pylori* Infektion auszugehen, beispielsweise als Resultat einer eventuell unbekanntem Eradikation im Rahmen einer anderen bakteriellen Infektionskrankheit. Weitere

Informationen konnten bei diesen Fällen nicht eingeholt werden, da die Hausärzte nicht bekannt waren. Weitere mögliche Gründe sind kreuzreaktive Antigene anderer bakterieller Infektionen. So ist das Protein GroEL etwa auch aus bakteriellen Proteomen anderer Bakterienarten bekannt (O'Connor et al. 1997). Zudem sind bei der Urease ähnliche Phänomene bekannt, so können Ureasen anderer Organismen Kreuzreaktionen hervorrufen (Widmer et al. 1999), ein Phänomen, das allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt wurde. So waren lediglich zwei der 38 falsch positiven recomLine[®] Ergebnisse unter anderem auch UreaseA positiv.

Schließlich lässt sich sagen, dass durch die Antigene VacA, HcpC, UreA und gGT kein zusätzlicher Informationsgewinn bezüglich der *H. pylori* Seropositivität gewonnen werden kann. Hierfür waren maßgeblich die Antigene CagA und GroEL verantwortlich. Betrachtet man hingegen die Gesamtzahl der erkannten Antigene, lassen sich Rückschlüsse auf die Pathogenität der einzelnen Stämme ziehen. So zeigten Patienten mit höhergradig aktiven Gastritiden, gastralen und duodenalen Ulzerationen und Magenkarzinomen einen signifikant erhöhten recomLine[®] Score. Dieser Befund wiederum macht die einzelnen Antigene sehr wichtig für die Auswertung und Beurteilung des recomLine[®].

5.2 Diskussion des Studienkollektivs

Zunächst fällt die relativ hohe *H. pylori* Prävalenz im Studienkollektiv auf. Bezieht man die Prävalenz auf *H. pylori* positive und eradizierte Studienteilnehmer, ergibt sich eine Prävalenz von 52,1%. Serologisch zeigte sich im recomWell[®] eine Seropositivität von 36,0%. In Hinblick auf einschlägige Literatur sind diese Ergebnisse deutlich erhöht. Für Industrienationen wie Deutschland werden Prävalenzraten von 10 bis 30% angegeben (Bures et al. 2011).

Die hohe Prävalenz lässt sich zunächst einmal darauf zurückführen, dass es sich bei dem Studienkollektiv nicht um eine Zufallsstichprobe handelt. Vielmehr wurden nur Patienten eingeschlossen, bei denen eine Spiegelung des oberen Magen-Darm-Traktes durchgeführt wurde. Dies geschah meist aufgrund von Symptomen wie epigastralere Bauchschmerz, zur Karzinomvorsorge oder -nachsorge. Es handelte sich somit um ein vorselektiertes Kollektiv, bei dem mit einem erhöhtem *H. pylori* Vorkommen zu rechnen ist. Des Weiteren wurde in mehreren epidemiologischen Studien ein starker Zusammenhang der *H. pylori* Prävalenz mit der Nationalität festgestellt, jeweils mit deutlich höheren Prävalenzen bei Menschen aus weniger entwickelten Herkunftsländern (Rothenbacher 1998; Staat et al. 1996; Bures et al. 2011). Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt: teilt man die Studienteilnehmer nach deutscher und nicht-deutscher Herkunft in zwei Gruppen ein, so

ergeben sich höhere Prävalenzraten für die Gruppe nicht-deutscher Herkunft. Dort waren 38,3% mit *H. pylori* infiziert, im Gegensatz zu 16% in der deutschen Gruppe. Der Anteil an bereits eradizierten Patienten in beiden Gruppen war hingegen mit 30,6% in der nicht-deutschen und 32,9% in der deutschen Gruppe vergleichbar. Wie in anderen Studien beschrieben, fiel außerdem ein positiver Zusammenhang zwischen Prävalenz und Lebensalter auf. Während in der Gruppe der 11 – 20-Jährigen der Anteil eradizierter Patienten lediglich bei 14% liegt, steigt dieser in der Gruppe der 81 – 90-Jährigen auf 57% an. Dies lässt sich zum einen darauf zurückführen, dass immer mehr Menschen in Deutschland auf *H. pylori* getestet und folglich auch eradiziert werden. Aufgrund verbesserter sozioökonomischer Umstände konnten über die vergangenen Dekaden hinweg außerdem fallende *H. pylori* Infektionsraten beobachtet werden (Bures et al. 2011). Die Prävalenzen von *H. pylori* positiven und eradizierten Fällen bei jungen Studienteilnehmern (28%, jeweils 14% positiv und 14% eradiziert) liegen deutlich unter den in der Studie durchschnittlich ermittelten Werten. Aufgrund des präselektionierten Kollektivs sind diese jedoch im Gegensatz zu Werten bei asymptomatischen Kindern auf einem relativ hohen Niveau (6,5% Boltshauser S 1999; und 13,4% Rothenbacher 1998).

5.2.1 Eradizierte Fälle

Die besondere Situation der eradizierten Fälle entwickelte sich im Verlauf der Arbeit, da eine hohe Anzahl an „falsch positiven“ serologischen Testergebnissen im Vergleich zur Histologie bestand. Durch Konsultationen der behandelnden Fach- und Hausärzte konnte ein Großteil dieser Fälle als *H. pylori* eradiziert identifiziert werden. Bei einigen Patienten lieferte die Histologie außerdem Hinweise auf eine abgelaufene *H. pylori* Gastritis. Bei einigen dieser in der Serologie falsch positiven Fälle konnte jedoch in der Krankengeschichte kein Hinweis auf eine zurückliegende *H. pylori* Infektion gefunden werden. Leider war eine Erhebung der Krankengeschichte nicht bei jedem Patienten möglich. Es verblieb somit die Frage, ob diese Fälle wirklich falsch positiv waren, das heißt zu einer schlechteren Spezifität der Serologie beitragen, oder ob es sich um unbekannterweise eradizierte Fälle handelt. So kann *H. pylori* auch im Zuge von anderen Antibiotikatherapien unwissentlich und unabsichtlich miteradiziert worden sein. Es wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass auch eine Monotherapie mit einem Antibiotikum (statt zwei Antibiotika wie in der Tripletherapie eingesetzt) eine Eradikation von *H. pylori* bewirken kann. Zum Beispiel werden Erfolgsraten von bis zu 20% für Amoxicillin und 10 – 50% für Clarithromycin Monotherapien angegeben (Israel und Hassall 1993; Peterson et al. 1993). Eine Miteradikation von *H. pylori* bei anderen antibiotischen Therapieindikationen, wie zum Beispiel Amoxicillin bei Mittelohrentzündungen

oder akuter Bronchitis und Clarithromycin bei Nasennebenhöhlen- oder Lungenentzündung, kann daher nicht ausgeschlossen werden. Eine vorherige Therapie mit betroffenen Antibiotika konnte bei einem Großteil der serologisch falsch positiven Fälle nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund ist es empfehlenswert, dass bei der Patientendatenerfassung im Rahmen von Folgestudien auf frühere antibiotische Therapien geachtet wird. Neben einer möglichen antibiotischen Eradikation ist jedoch auch eine Eradikation durch den Wirt selbst denkbar. So können beispielsweise fortgeschrittene Stadien einer *H. pylori* Infektion, wie intestinale Metaplasie und Atrophie, ebenso wie Magenkarzinome kein ideales Milieu für eine *H. pylori* Infektion gewährleisten. Die Histologie unterschätzt daher den Zusammenhang mit einer *H. pylori* Infektion, insbesondere bei dem Vorliegen intestinaler Metaplasie oder Atrophie (Testoni et al. 1996). Dieser Verdacht konnte bei den vorliegenden „falsch positiven“ recomLine[®] Ergebnissen nicht bestätigt werden. Weiterhin ist eine falsch negative Histologie nicht auszuschließen. So liegen die Angaben in der Literatur für eine falsch negative Histologie bei 3% in Antrum Biopsien und zwischen 6 – 9% in Corpus Biopsien (Genta und Graham 1994). Die negativen histologischen Befunde wurden daher erneut von dem Institut für Pathologie des Klinikums Bayreuth befundet, wobei dazu unter anderem die spezielle Warthin-Starry Färbung zur besseren Darstellung von *H. pylori* verwendet wurde. Es fanden sich jedoch keine Hinweise auf eine mögliche *H. pylori* Infektion, wie zum Beispiel Lymphfollikel oder ein erhöhtes Vorkommen von Neutrophilen. Eine gewisse Limitation der Histologie ist dennoch nicht auszuschließen.

Insgesamt konnten 38 recomLine[®] positive und Histologie-negative Fälle nicht eindeutig als bereits eradiziert bestätigt werden und sind daher zunächst als falsch positiv in die Statistik eingegangen. Um die Fragestellung der „falsch positiven“ und eradizierten Fälle zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit ein genaues Augenmerk auf die Antigenerkennungsmuster und Mittelwerte der beiden Kollektive gelegt. Im eradizierten wie auch im „falsch positiven“ Kollektiv zeigten sich signifikante Differenzen zum positiven Kollektiv: die Mittelwerte von recomWell[®] und recomLine[®] Score lagen deutlich unter denen aus dem positiven, aber deutlich über denen aus dem negativen Kollektiv. Darüber hinaus zeigte sich im eradizierten Kollektiv eine erhöhte Inzidenz von rein CagA positiven Fällen im recomLine[®]. In einer Studie von Simán et. al wurde gezeigt, dass bei serologischer CagA Positivität in *H. pylori* negativen Fällen die Intensität der Banden signifikant geringer ist als die Intensität in *H. pylori* positiven Fällen (Simán et al. 2005). Daraus schlossen die Autoren auf eine falsch positive Reaktion des verwendeten Western Blots (Helicoblot 2.1), jedoch erfolgte in der Studie kein Vergleich zu einem eradizierten Kollektiv wie in der vorliegenden Arbeit. Durch die hohe Übereinstimmung zwischen den bekannt eradizierten Fällen und den serologisch „falsch

positiven“ Fällen, wurde in der durchgeführten Untersuchung daher von einer unbekanntem Eradikation bei den falsch positiven Fällen ausgegangen. Die „falsch positiven“ Fälle, die in beiden serologischen Methoden recomLine® und recomWell® positiv waren und dem Erkennungsmuster der eradizierten Fälle glichen (n = 26), wurden daher dem eradizierten Kollektiv zugeordnet. Die daraus resultierende korrigierte Spezifität von 97,1% statt 91,3% lässt sich aber nur in Zusammenschau der oben genannten Ergebnisse rechtfertigen. Auch bei den anderen Fällen ist eine Eradikation zu vermuten, da jedoch nur ein serologisches Testverfahren positiv war, ist eine falsch positive Reaktion des betroffenen Testverfahrens nicht auszuschließen.

Insgesamt bietet die Serologie bei unklaren Fällen eine weitere Entscheidungshilfe, da sie die Identifikation einer Seronarbe erlaubt. Die Histologie – zur Zeit der Goldstandard in der Routinediagnostik – kann hingegen nur unzureichend *H. pylori* eradizierte von negativen Patienten unterscheiden. Auch der Atemtest dient nur zur Identifikation einer aktiven Infektion. Geht man von einer abgelaufenen Infektion aus, die Histologie nicht immer als Goldstandard zu verwenden. Vielmehr wäre es sinnvoll nach einer abgelaufenen Infektion der Serologie mehr Bedeutung beizumessen. Weitere Studien mit klar definierten *H. pylori* negativen und eradizierten Patienten sollten daher angeschlossen werden. Des Weiteren sollte eine genaue Aufarbeitung des eradizierten Kollektivs in einer eigenen Kohorte mit dem Ziel erfolgen, gegebenenfalls weitere spezifische Antigenerkennungsmuster zu erkennen. Erste Ansätze, wie die CagA Seropositivität bei schwacher oder fehlender Reaktivität gegen andere Antigene, wurden in der vorliegenden Arbeit gefunden und sollten gezieltere Untersuchungen nach sich ziehen.

Neben Unterschieden zwischen eradizierten und positiven Kollektiv wurde außerdem der Zusammenhang zwischen der Zeit seit Eradikation und der Immunantwort untersucht. Es ist bekannt, dass die Titer von *H. pylori* Antikörpern nach Eradikation abfallen. Kosunen et al. zeigten, dass 6 Wochen nach Eradikation IgG Titer um 20 – 30% fallen, und zwar unabhängig vom Erfolg der Eradikation. Nach 6 bis 12 Monaten zeigte sich bei den erfolgreich eradizierten Fällen ein Titer von 50% oder weniger, bei den erfolglos therapierten folgte auf den initialen Abfall ein Gleichbleiben oder ein leichter Anstieg der IgG Titer (Kosunen et al. 1992). In der vorliegenden Arbeit zeigten die Serologie positiven Fälle des eradizierten Kollektivs im recomLine® einen um durchschnittlich 2 Punkte niedrigeren Score als im positiven Kollektiv. Im recomWell® lag der durchschnittliche Score der Extinktion bei weniger als der Hälfte des Scores im positiven Kollektiv. Da die Studie nicht auf eine Analyse der eradizierten Fälle hin ausgelegt war, wurden hier nur teilweise Daten in Bezug auf vorausgehende Eradikationen, wie beispielsweise den Zeitpunkt der Therapie, gewonnen.

Eine Beurteilung des serologischen Ergebnisses ohne einen zeitlichen Zusammenhang der Eradikation ist daher nur bedingt möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde das Jahr der Eradikation vorzugsweise über eine Befragung der Patienten, meist aber über den behandelnden Hausarzt ermittelt. Lieferte dies kein Ergebnis wurde das Datum des letzten *H. pylori* positiven Vorbefundes in der Histologie als Jahr der Eradikation angenommen (bei aktuell *H. pylori* negativem oder Ex-*H. pylori* Gastritis Befund). Somit entspricht das verwendete Jahr der Eradikation nicht unbedingt dem tatsächlichen Jahr der Eradikation. Diese Angaben sollten daher lediglich im Sinne eines Richtwertes verwendet werden. Zwar zeigte sich in der vorliegenden Studie eine geringere serologische Antwort, je mehr Zeit seit der Therapie einer *H. pylori* Infektion vergangen ist, gleichzeitig fanden sich jedoch auch bei Patienten positive serologische Antworten, die seit über 15 Jahren eradiziert waren. Hier wiederum kann bei nicht genau angegebenen Eradikationszeitpunkten eine spätere Eradikation, bzw. auch eine spätere Reinfektion und erneute Eradikation nicht ausgeschlossen werden.

Die Ausrichtung der vorliegenden Arbeit lag vor allem auf der Auswertung des recomLine® in Bezug auf das *H. pylori* positive Kollektiv mit dem Ziel, prädiktive Aussagen treffen zu können. Aus diesem Grund wurde nur etwa die Hälfte des eradizierten Kollektives zusätzlich mit dem recomLine® getestet. Alles in allem sollte das eradizierte Kollektiv ausgebaut werden, um genauere Aussagen zuzulassen. Bisherige Studien, die unter anderem von Veenendaal et al. und Kosunen et al. vorgelegt wurden, haben gezeigt, dass es zu signifikanten Abfällen der IgG und IgA Antwort nach antibiotischer Therapie kommt (Veenendaal et al. 1991; Kosunen et al. 1992). Eine genauere Betrachtung des Verlaufs einzelner Antigene ist bisher noch nicht erfolgt. Gerade hier setzt der neue recomLine® an und bietet neue Möglichkeiten einen differenzierteren Blick auf den Verlauf der Immunantwort einzelner Antigene zu werfen. Durch entsprechende Follow-Up Studien könnte dann zusätzlich die Unterscheidung von eradizierten und falsch positiven Befunden geleistet werden.

5.2.2 RecomLine® im Vergleich zur PCR

Es wurden 63 Proben mittels PCR untersucht, davon waren 50 Proben in der Histologie *H. pylori* positiv und 13 negativ. Die *H. pylori* negativen Fälle waren in der PCR ebenfalls negativ (100%), bei den positiven Fällen wurden 41 der 50 Fälle (82%) als eindeutig positiv klassifiziert. Die Serologie war bei den 50 Histologie-positiven Fällen ebenfalls positiv (100%), bei den 13 Histologie-negativen Fällen jedoch nur in drei Fällen negativ (23%). Von

den 13 *H. pylori* negativen Patienten war bei vier Patienten eine Eradikation bekannt (davon drei Patienten recomLine® positiv). Die schlechte Spezifität des recomLine® im Gegensatz zur PCR ergibt sich dadurch, dass bei allen im recomLine® „falsch positiven“, von denen auch eine Magenbiopsie zur DNA Isolation zur Verfügung stand, eine PCR durchgeführt wurde (n = 10). Bei drei recomLine® und Histologie-negativen Proben wurde als negativ Kontrolle eine PCR durchgeführt.

Der recomLine® und die PCR detektieren die *H. pylori* Antigene auf zwei verschiedenen Ebenen: der recomLine® prüft die Immunantwort, also die Antikörperbildung gegen präsentierte Antigene, während die PCR von den Antigensequenzen im Genom abhängt. Insbesondere für die Auswertung des recomLine® ist der Vergleich mit der PCR ein wichtiges Validitätskriterium, da er prüft, ob der recomLine® Immunantworten gegen tatsächlich vorhandene *H. pylori* Antigene erkennt. Von einer positiven PCR für ein bestimmtes Antigen lässt sich jedoch nicht zwingend auf eine Expression schließen, andererseits schließt ein negatives recomLine® Ergebnis nicht aus, dass die Gensequenz des Proteins trotzdem im Genom vorhanden ist. So zeigten sich auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit Unstimmigkeiten zwischen der serologischen Antwort und der DNA. Alle in der PCR positiven Proben waren sowohl in der Histologie als auch in der Serologie *H. pylori* positiv, die Unstimmigkeiten beziehen sich daher nur auf die Antigenebene. Hier lag eine Übereinstimmung von 66,7% vor, wobei das Antigen VacA mit lediglich 36,6% die geringste Übereinstimmung aufwies.

Insgesamt lagen für die einzelnen Antigene in 82 Fällen Unstimmigkeiten vor, davon war in 71 Fällen die PCR für das jeweilige *H. pylori* Antigen positiv und die Immunantwort, detektiert durch den recomLine®, negativ. Betroffen waren vor allem die Antigene VacA, UreA und gGT. Zunächst ist davon auszugehen, dass die Gensequenz eines Proteins im Genom des jeweiligen *H. pylori* Isolates vorhanden ist wenn die PCR für dieses Protein positiv ist. Dies bedeutet jedoch nicht zwangsweise, dass das Antigen auch exprimiert und folglich Antikörper gegen das Antigen gebildet werden können. Beispielweise ist es möglich, dass bei VacA einzelne Signalsequenzen im Genom zu einer Suppression der Expression führen und somit auch keine Antikörper gegen VacA ausgebildet werden können. Auch bei CagA sind Stämme mit einer Deletion in der Promotorregion bekannt. Da eine Expression des Gens und somit eine entsprechende Immunantwort ausbleibt, führt die Deletion zu einer negativen Serumantwort bei vorhandenem CagA-Gen (Nguyen et al. 2009). Außerdem ist es möglich, dass ein Antigen nur zu Beginn der Infektion von *H. pylori*, nicht jedoch im weiteren chronischen Verlauf, exprimiert wird. Vorhandene Antikörper im Blut des Patienten fallen dann mit der Zeit unter die Detektionsschwelle des recomLine®. Die Antikörper sind dann

zwar vorhanden, werden aber nicht durch den recomLine[®] erkannt. Das kann auch an den auf dem recomLine[®] präsentierten Antigen liegen. So existieren beispielsweise bei unterschiedlichen Bakterienstämmen verschiedene Sequenzen eines Proteins. Daher kann es vorkommen, dass die gebildeten Antikörper nicht die auf dem recomLine[®] präsentierten Antigenepitope erkennen. Für die drei Antigene VacA, UreA und gGT sollten also gegebenenfalls neue Varianten der Antigene für den recomLine[®] aufgereinigt und neu ausgetestet werden. So sind auf dem aktuell in der Entwicklung befindlichen neuen recomLine^{2.0} bereits die Subtypen VacA m1 und m2 aufgeführt. Hier wäre es ebenfalls interessant die korrespondierenden Subtypen in der DNA durch eine entsprechende PCR zu identifizieren und den recomLine[®] zu validieren.

In weiteren 11 Fällen war die PCR negativ und der recomLine[®] positiv, das Augenmerk lag dabei vor allem auf CagA (n = 7). Mögliche Ursachen dieser Beobachtung sind unspezifische, falsch positive Reaktionen der recomLine[®] Banden oder auch eine falsch negative PCR. Letzteres kann beispielsweise durch variable Antigen-Sequenzen bedingt sein, die nicht durch die Screening-Primer erkannt werden. Im Zuge einer Kooperation mit Prof. Pan¹ wurden zudem chinesische *H. pylori* Isolate gescreent, die alle in der PCR mit den in dieser Arbeit verwendeten CagA-Primern negativ waren. Da in asiatischen Stämmen CagA Prävalenzen von bis zu 100% nachgewiesen werden können (Lai et al. 2002; Pan et al. 1997), ist davon auszugehen, dass sich die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer ausschließlich zum Nachweis des europäischen CagA Gens eignen. Die sieben CagA recomLine[®] positiven und PCR negativen Fälle wurden daher näher betrachtet und es zeigte sich, dass sechs der sieben Fälle dem Patientennamen entsprechend nicht deutscher Herkunft zu sein scheinen. Da das CagA Gen in asiatischen Stämmen hoch konserviert ist, sollte eine PCR mit spezifischen Primern für asiatische Stämme wiederholt werden (Xu et al. 2003). Ein weiterer möglicher Grund sind Gendelektionen im Verlaufe einer Infektion. Dabei bleibt bei einer akuten Infektion mit *H. pylori* das Genom des Bakteriums zunächst unverändert, im Laufe der Infektion kann es jedoch zu dynamischen Veränderungen des Genoms mit Verlust oder Zugewinn einzelner Gene kommen (Dong et al. 2009). Während eine falsch positive CagA Bande aufgrund von Kreuzreaktionen bei geringer Übereinstimmung humaner und bakterieller Proteinsequenzen eher nicht als Auslöser anzusehen ist (Fusconi et al. 1999; Nguyen et al. 2009), könnten im Falle von falsch positiven GroEL Banden Kreuzreaktionen eine mögliche Erklärung sein (Vgl. Kapitel 5.1.1.1).

1 Prof. Kai-Feng Pan, Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Department of Cancer Epidemiology, Peking University Cancer Hospital and Institute, Beijing, People's Republic of China

Neben Kreuzreaktionen sind falsch positive Banden aufgrund einer schlechten Spezifität der betroffenen Antigene des recomLine® jedoch grundsätzlich nicht auszuschließen.

5.3 Bedeutung der Studienergebnisse

Seit der Entdeckung des Bakteriums *H. pylori* hat sich der Blick der Forschung vor allem auf den Zusammenhang mit diversen Krankheiten als auch auf die Therapie gerichtet. In Bezug auf die Diagnostik konnten im Verhältnis dazu lediglich kleine Fortschritte erzielt werden. Da mittlerweile der Zusammenhang zwischen *H. pylori* und gastrointestinalen Krankheiten wie Ulzerationen, Lymphomen und Karzinomen hinreichend belegt ist und das Bakterium heute als Grad I Karzinogen von der WHO eingestuft wird (World Health Organisation 1994), gilt es die Frage nach der Anwendung dieser Erkenntnisse zu stellen. In der vorliegenden Arbeit wurde bereits mehrfach darauf eingegangen, dass sich nicht jede *H. pylori* infizierte Person einer antibiotischen Therapie unterziehen sollte. Zwar gibt es Studien die zeigen, dass eine frühe Eradikationstherapie gegenüber einer Surveillance Strategie kosteneffizient ist und zudem das Krebsrisiko senkt (Lee et al. 2007; Fendrick et al. 1999; Mason et al. 2002). Trotzdem ist von einer flächendeckenden Eradikation abzusehen. Therapie-nebenwirkungen, steigende Raten an multiresistenten Keimen und protektive Eigenschaften von *H. pylori* sind dabei die schlagkräftigsten Argumente. Nicht umsonst weisen Forscher auf eine seit über Jahrtausenden bestehende Koevolution zwischen dem Keim *H. pylori* und dem Wirt Mensch hin (Blaser 1998). Diese hätte es wohl kaum gegeben, wenn der Keim nicht in einem gewissen Maße einen Selektionsvorteil für den Menschen darstellt. Das Ziel ist daher Patienten mit einem erhöhten Risiko für Magenkarzinome zu identifizieren und diese dann gezielt zu therapieren. So können unnötige Nebenwirkungen vermieden werden und die Anzahl der erforderlichen Behandlungen (engl. *number needed to treat*) sinkt. Diese Möglichkeit bietet der recomLine®: bei minimaler Invasivität erlaubt er eine Aussage bezüglich der Pathogenität eines betroffenen Keims. Bezogen auf das vorliegende Studienkollektiv reduziert sich dadurch die Anzahl zu therapierender Patienten. Bei Eradikation der virulenten Typ I Stämme ist eine Verringerung von 265 auf 176 *H. pylori* positive Patienten (66,4%) feststellbar. Werden Patienten mit fünf oder mehr positiven Antigenen eradiziert müssten lediglich 27 Patienten (10,1%) therapiert werden. Natürlich bietet auch der recomLine® keine Aussage darüber welcher Patient in Zukunft ein Krebsleiden entwickeln wird, aber er grenzt die Gruppe weiter ein. Durch fortlaufende Weiterentwicklungen werden neue Antigene für den recomLine® getestet, die in Zukunft weitere Hinweise auf die Pathogenität des *H. pylori* Stammes liefern könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden dafür die ersten Grundsteine gelegt. Zunächst zeichnet sich der recomLine® durch eine sehr gute Sensitivität und Spezifität aus und zeigt sich somit gegenüber anderen diagnostischen Methoden überlegen. Weiterhin erlaubt der recomLine® die Einteilung in den virulenteren Typ I Stamm (CagA und / oder VacA positiv), der mit einem signifikant erhöhtem Risiko für höhergradige, hoch aktive Gastritiden einhergeht und vermehrt bei Ulzerationen und Karzinomen zu finden ist. Die selben Zusammenhänge zeigten sich für die Anzahl der erkannten Antigene: sind fünf oder alle sechs Antigene positiv, ist die Wahrscheinlichkeit für einen virulenten *H. pylori* Stamm deutlich erhöht. So lagen bei fünf oder sechs positiven Antigenen bei 38,7% pathologische Veränderungen vor und im Falle von ein bis vier positiven Antigenen fanden sich lediglich bei 12,7% (58/458) pathologische Veränderungen wie intestinale Metaplasie, Atrophie, Ulzera oder Karzinome.

Schlussendlich lässt sich sagen, dass der recomLine® eine sinnvolle Diagnostik zur Detektion einer *H. pylori* Infektion ist. Noch stellt er keine Alternative zu der Endoskopie dar, denn die *H. pylori* induzierte Gastritis ist eine rein histologische Diagnose. Der recomLine® ist aber in der Lage eine *H. pylori* positive oder negative Diagnose zu verfeinern und einen schweren Verlauf einer Infektion anzuzeigen. Um eine prädiktive Aussage bezüglich des Krankheitsrisikos zu geben sind jedoch prospektive Studien nötig. Insgesamt könnten bei minimalem Aufwand besonders gefährdete Patienten für eine Therapie selektiert werden. Besonders in Entwicklungsländern bietet sich so der Vorteil einer kostensparenden und effektiven Methode Patienten mit einem erhöhtem Risiko für Magenkarzinome frühzeitig zu erkennen und zu therapieren. Es ist folglich davon auszugehen, dass die Serologie in Zukunft einen höheren Stellenwert nicht nur in epidemiologischen Studien, sondern auch in der Routine Diagnostik finden wird.

5.4 Ausblick

Ein wichtiger Punkt für den weiteren Ausbau der Bedeutung serologischer Diagnostik ist die Unterscheidung von infizierten und nicht infizierten Personen. Zurzeit ermöglicht die Serologie keine Aussage bezüglich der Aktivität der Infektion – seropositiv können sowohl aktive Infektionen als auch bereits eradizierte Infektionen sein. Somit kann die Serologie nicht als Goldstandard zur Diagnostik einer aktiven *H. pylori* Infektion dienen, sondern lediglich zum Screening oder für einen zusätzlichen Informationsgewinn hinzugezogen werden. Hier lag das Augenmerk der vorliegenden Arbeit, die auf eine Identifikation besonders gefährdeter Subgruppen zielte. Prädiktive Aussagen bezüglich des Krankheitsrisikos sind sehr wichtig, vor allem in Bezug auf die weitere Therapieplanung. Es

gibt keinen sicher nicht-virulenten *H. pylori* Stamm, genauso wenig wie es einen sicher karzinogenen *H. pylori* Stamm gibt. Nichtsdestotrotz erlaubt der recomLine® eine Aussage darüber, welcher Stamm eine schwerere Entzündung hervorruft und daher ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung gastroduodenaler Erkrankungen mit sich bringt.

In Zukunft wird es erforderlich sein, vorhandene Testsysteme weiter auszubauen, um möglichst genaue Aussagen zu dem weiteren Krankheitsverlauf infizierter Personen treffen zu können. Dieser beinhaltet unter anderem den Ausbau des vorhandenen recomLine®: aktuell stehen weitere Antigene, wie zum Beispiel NapA und ICD bereit, um auf einem neuen Prototypen getestet zu werden. Hier geht es nicht darum die Anzahl der Antigene zu erhöhen, sondern darum, mit möglichst wenigen Antigenen die best-möglichen Aussagen treffen zu können. Daher wurden vor allem aus der Literatur bekannt virulente Proteine ausgesucht. In folgenden Studien müssen dann die neuen Antigene an den vorhanden oder neuen Seren ausgetestet werden, um auch hier Korrelationen mit diversen Krankheitsmarkern zu erhalten.

Weiterhin sollte die Validierung des recomLine® an einem pathogenen Kollektiv erfolgen. Bisher bezogen sich die Auswertungen auf ein relativ heterogenes Kollektiv, das nur geringe Fallzahlen an gastroduodenalen Erkrankungen aufwies. Insgesamt sind in dem vorliegenden Kollektiv nur 15 Fälle von Magen- oder Darm-Ulzera sowie vier Fälle von Magenkrebs diagnostiziert und ausgewertet worden. Es kann daher kein allgemeingültiger Schluss bezüglich der Aussagekraft des recomLine® bei fortgeschrittenen Magendarmkrankungen gezogen werden. Um verschiedene pathogene Antigenerkennungsmuster aufzudecken, sollte im weiteren Verlauf der Studie zudem beispielhaft das Screening von reinen Magenkarzinomen oder Ulzera Kollektiven erfolgen.

Neben der Möglichkeit, Patienten mit erhöhten Risiken für das Fortschreiten der *H. pylori* Infektion zu identifizieren, könnte die Serologie auch bald einen Unterschied zwischen infizierten und immunisierten Fällen aufzeigen. Dies spielt vor allem im Rahmen laufender Immunisierungsstudien für *H. pylori* eine entscheidende Rolle. Sind diese einmal erfolgreich, erscheint die Entwicklung eines Tests absehbar, durch den eine sichere Identifizierung erfolgreich immunisierter Patienten ermöglicht wird.

Bei weiteren Testungen gilt es außerdem, die Limitierung des recomLine® in Bezug auf den europäischen und asiatischen Raum näher zu beleuchten. So zeigen die Virulenzfaktoren CagA und VacA eine erhöhte Assoziation mit gastroduodenalen Krankheiten im europäischen Raum. Im asiatischen Raum sind hingegen nahezu 100% der Bevölkerung CagA und VacA positiv (Pan et al. 1997) – einer der Gründe für die erhöhte Prävalenz von

Magenkarzinomen in Ostasien (Yamaoka et al 2008c). Da fast die gesamte asiatische Bevölkerung mit dem virulenten Typ I Stamm infiziert ist, können die Antigene CagA und VacA nicht für diagnostische Zwecke genutzt werden. Die Aussagen bezüglich des recomLine® besitzen daher keine internationale Gültigkeit. Weitere serologische Studien sind dazu notwendig.

6 Zusammenfassung

H. pylori ist ein gram-negatives mikroaerophiles Bakterium, das den menschlichen Magen besiedeln kann. Insgesamt sind über die Hälfte der Bevölkerung weltweit mit dem Bakterium infiziert. Es besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen einer *H. pylori* Infektion und diversen Magenerkrankungen, wie Ulzera und Adenokarzinomen. Zahlreiche Studien belegen die karzinogenen Auswirkungen von *H. pylori* und führten letztlich dazu, dass *H. pylori* von der WHO im Jahr 1994 als Klasse 1 Karzinogen eingestuft wurde. Weltweit ist das Magenkarzinom eine der häufigsten Ursachen für Krebs assoziierte Todesfälle, wobei in über 90% der Fälle die Magenkarzinome mit einer *H. pylori* Infektion assoziiert sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Eradikation des Bakteriums mit Antibiotika das Fortschreiten von Schleimhautatrophie und die Entwicklung von Magenkrebs verhindern kann. Da aber nur knapp ein Prozent der mit *H. pylori* infizierten Menschen tatsächlich ein Magenkarzinom entwickelt und eine Therapie auch Nebenwirkungen, Zunahme multiresistenter Keime und hohe Therapiekosten mit sich bringt, sollte eine Therapieindikation genau abgewägt werden. Zudem dürfen auch die protektiven Eigenschaften von *H. pylori* nicht übersehen werden. So kann man auf über 60 000 Jahre Koevolution zwischen dem Bakterium *H. pylori* und dem Wirt Mensch zurückblicken. Eine derart langanhaltende Toleranz lässt protektive Faktoren für den Wirt wahrscheinlich erscheinen. Es gilt also, Patienten mit einem erhöhten Magenkarzinomrisiko zu identifizieren und diese Patientengruppe dann gezielt zu therapieren. Genau an diesem Punkt setzt der recomLine® nun an. Er detektiert die Serumantwort auf sechs verschiedene *H. pylori* Antigene: CagA, VacA, GroEL, UreA, HcpC und gGT. Diese wurden im Labor der Arbeitsgruppe Gerhard am Institut für Medizinische Mikrobiologie der TU München rekombinant in *E.coli* hergestellt, gereinigt und in Kooperation mit der Firma Mikrogen auf einer Membran immobilisiert. Hochvirulente Proteine wie CagA und VacA, die beide unter anderem mit der Entstehung chronisch atrophischer Gastritis, Ulzera und Magenkarzinomen assoziiert sind, befinden sich auf dem recomLine®. Der recomLine® erlaubt so die Einteilung in einen virulenteren *H. pylori* Stamm I, CagA und oder VacA positiv, und einen weniger virulenteren Stamm II, CagA und VacA negativ.

Ziel dieser Arbeit war es nun ein Patientenkollektiv zu etablieren und mit dem recomLine® zu screenen, um so den recomLine® hinsichtlich Sensitivität, Spezifität und seiner prädiktiven Aussagekraft zu validieren. Im Zeitraum von einem Jahr wurden in einer gastroenterologischen Praxis in Bayreuth und in München Blut- und Gewebeproben von Patienten mit gesunder und entzündlich veränderter Magenschleimhaut untersucht. Insgesamt wurden 1350 Patienten in die Studie eingeschlossen. Davon waren ca. 20% *H.*

pylori positiv und etwa 30% eradiziert. Es wurden die positiven und eradizierten Patientengruppen jeweils hinsichtlich ihrer Serumantworten im recomWell® und im recomLine® untersucht, wobei die Histologie den Goldstandard darstellte. Für den recomLine® konnte eine Sensitivität von 98% und eine Spezifität von 97% erreicht werden. Es zeigten sich weiterhin signifikante Zusammenhänge einzelner Antigene sowie der Summe der Antigene im recomLine® mit dem Grad und der Aktivität der Entzündung. Der recomLine® zeigte insgesamt sehr überzeugende Parameter und ermöglichte ein erstes Abschätzen der Virulenz einzelner *H. pylori* Stämme. Zur weiteren Validierung wird in Zukunft das Screening eines pathologischen Kollektivs erfolgen, um die Aussagekraft des recomLine® weiter zu stärken.

Literaturverzeichnis

- Alam El-Din**, H. M.; Hashem, A. G. M.; Ragab, Y. M.; Hussein, I. L.; Mohamed, D. B.; Mohamed, E.-C. B. (2013): Evaluation of Noninvasive Versus Invasive Techniques for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. In: *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 21 (4), S. 326–333.
- Alm**, R. A.; Ling, L.-S. L.; Moir, D. T.; King, B. L.; Brown, E. D.; Doig, P. C.; Smith, D. R.; Noonan, B.; Guild, B. C.; deJonge, B. L.; Carmel, G.; Tummino, P. J.; Caruso, A.; Uria-Nickelsen, M.; Mills, D. M.; Ives, C.; Gibson, R.; Merberg, D.; Mills, S. D.; Jiang, Q.; Taylor, D. E.; Vovis, G. F.; Trust, T. J. (1999): Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. In: *Nature* 397 (6715), S. 176–180. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/16495>.
- Andrutis**, K. A.; Fox, J. G.; Schauer, D. B.; Marini, R. P.; Murphy, J. C.; Yan, L.; Solnick, J. V. (1995): Inability of an isogenic urease-negative mutant strain of *Helicobacter mustelae* to colonize the ferret stomach. In: *Infect. Immun.* 63 (9), S. 3722–3725.
- Arnold**, I. C.; Dehzad, N.; Reuter, S.; Martin, H.; Becher, B.; Taube, C.; Muller, A. (2011): *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. In: *J Clin Invest* 121 (8), S. 3088–3093.
- Atherton**, J. C.; Cao, P.; Peek, R. M., JR; Tummuru, M. K.; Blaser, M. J.; Cover, T. L. (1995): Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. In: *J Biol Chem* 270 (30), S. 17771–17777.
- Atherton**, J. C.; Spiller, R. C. (1994): The urea breath test for *Helicobacter pylori*. In: *Gut* 35, S. 723–725.
- Baker**, K. H.; Hegarty, J. P. (2001): Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water is associated with clinical infection. In: *Scand. J. Infect. Dis.* 33 (10), S. 744–746.
- Baltrus**, D. A.; Amieva, M. R.; Covacci, A.; Lowe, T. M.; Merrell, D. S.; Ottemann, K. M.; Stein, M.; Salama, N. R.; Guillemin, K. (2008): The Complete Genome Sequence of *Helicobacter pylori* Strain G27. In: *J Bact* 191 (1), S. 447–448.
- Bauerfeind**, P.; Garner, R.; Dunn, B. E.; Mobley, H. L. (1997): Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. In: *Gut* 40 (1), S. 25–30.
- Bayerdörffer**, E.; Mannes, G. A.; Sommer, A.; Höchter, W.; Weingart, J.; Hatz, R.; Lehn, N.; Ruckdeschel, G.; Dirschedl, P.; Stolte, M. (1993): Long-term follow-up after eradication of *Helicobacter pylori* with a combination of omeprazole and amoxicillin. In: *Scand. J. Gastroenterol. Suppl* 196, S. 19–25.
- Bebb**, J. R.; Letley, D. P.; Rhead, J. L.; Atherton, J. C. (2003): *Helicobacter pylori* Supernatants Cause Epithelial Cytoskeletal Disruption That Is Bacterial Strain and Epithelial Cell Line Dependent but Not Toxin *VacA* Dependent. In: *Infect Immun* 71 (6), S. 3623–3627.
- Bizzozero** G. (1893): Ueber die schlauchfoermigen drusen des magendarmkanals und die beziehungen ihres epithels zu dem oberflaechenepithel der schleimhaut. In: *Arch. Mikr Anat* (42:82).
- Blaser**, M. J. (1998): *Helicobacter pylori* and gastric diseases. In: *BMJ* 316 (7143), S. 1507–1510.

- Boanca, G.;** Sand, A.; Okada, T.; Suzuki, H.; Kumagai, H.; Fukuyama, K.; Barycki, J. J. (2006): Autoprocessing of *Helicobacter pylori* -Glutamyltranspeptidase Leads to the Formation of a Threonine-Threonine Catalytic Dyad. In: *J Bio Chem* 282 (1), S. 534–541.
- Boltshauser, S.;** Herzog, D. (1999): 1999-15 Prävalenz der asymptomatischen *Helicobacter*-Infektion bei den 5-7-jährigen Kindern des Kantons St. Gallen (Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic 5-7-year-olds of Canton St. Gallen). In: *Schweiz Med Wochenschr* 129 (15), S. 579–584.
- Brown, L. M.** (2000): *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. In: *Epidemiologic Reviews* 22 (2), S. 283–297.
- Bruden, D. L.;** Bruce, M. G.; Miernyk, K. M.; Morris, J.; Hurlburt, D.; Hennessy, T. W.; Peters, H.; Sacco, F.; Parkinson, A. J.; McMahon, B. J. (2011): Diagnostic accuracy of tests for *Helicobacter pylori* in an Alaska Native population. In: *WJG* 17 (42), S. 4682–4688.
- Bures, J.;** Kopácová, M.; Skodová Fendrichová, M.; Rejchrt, S. (2011): Epidemiologie *Helicobacter pylori*. In: *Vnitr Lek* 57 (12), S. 993–999.
- Buzás, G. M.** (2010): First-line eradication of *Helicobacter pylori*. In: *WJG* 16 (31), S. 3865–3870.
- Carlsohn, E.;** Nyström, J.; Bölin, I.; Nilsson, C. L.; Svennerholm, A.-M. (2006a): HpaA is essential for *Helicobacter pylori* colonization in mice. In: *Infect Immun* 74 (2), S. 920–926.
- Carlsohn, E.;** Nyström, J.; Karlsson, H.; Svennerholm, A.-M.; Nilsson, C. L. (2006b): Characterization of the Outer Membrane Protein Profile from Disease-Related *Helicobacter pylori* Isolates by Subcellular Fractionation and Nano-LC FT-ICR MS Analysis. In: *J. Proteome Res* 5 (11), S. 3197–3204.
- Castro-Fernández, M.;** Lamas, E.; Pérez-Pastor, A.; Pabón, M.; Aparcero, R.; Vargas-Romero, J.; Larraona, J.L.; Romero-Gómez, M. (2009): Efficacy of triple therapy with a proton pump inhibitor, levofloxacin, and amoxicillin as first-line treatment to eradicate *Helicobacter pylori*. In: *Rev Esp Enferm Dig.* 101 (6), S. 395–402.
- Cave, D. R.** (1997): How is *Helicobacter pylori* transmitted? In: *Gastroenterology* 113 (6 Suppl), S. S9-14.
- Censini, S.;** Lange, C.; Xiang, Z.; Crabtree, J. E.; Ghiara, P.; Borodovsky, M.; Rappuoli, R.; Covacci, A. (1996): *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (25), S. 14648–14653.
- Chevalier, C.;** Thiberge, J.-M.; Ferrero, R. L.; Labigne, A. (1999): Essential role of *Helicobacter pylori* γ -glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. In: *Molecular Microbiology* 31 (5), S. 1359–1372.
- Chiba, N.;** van Veldhuyzen Zanten, S. J. O.; Escobedo, S.; Grace, E.; Lee, J.; Sinclair, P.; Barkun, A.; Armstrong, D.; Thomson, A. B. R. (2004): Economic evaluation of *Helicobacter pylori* eradication in the CADET-Hp randomized controlled trial of *H. pylori*-positive primary care patients with uninvestigated dyspepsia. In: *Aliment. Pharmacol. Ther.* 19 (3), S. 349–358.
- Cover, T. L.;** Blaser, M. J. (1992): Purification and Characterization of the Vacuolating Toxin from *Helicobacter pylori*. In: *J Bio Chem* 267 (15), S. 10570–10575.
- Crabtree, J. E.** (1996): Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. In: *Scand J Gastroenterol Suppl* 215, S. 3–10.
- Culter, A. F.;** Prasad, V. W.; Santogade, P. (1998): Four-year Trends in *Helicobacter Pylori* IgG Serology following Successful Eradication. In: *Am J Med* 105 (1), S. 18–20.

- Delport**, W.; Cunningham, M.; Olivier, B.; Preisig, O.; van der Merwe, S. W. (2006): A Population Genetics Pedigree Perspective on the Transmission of *Helicobacter pylori*. In: *Genetics* 174, S. 2107–2118.
- Dixon**, M. F.; Genta, R. M.; Yardley, J. H.; Correa, P. (1996): Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. In: *Am J Surg Pathol* 20 (10), S. 1161–1181.
- Dong**, Q.-J.; Wang, Q.; Xin, Y.-N.; Li, N.; Xuan, S.-Y. (2009): Comparative genomics of *Helicobacter pylori*. In: *WJG* 15 (32), S. 3984–3991.
- Dorer**, M. S.; Talarico, S.; Salama, N. R.; Manchester, M. (2009): *Helicobacter pylori*'s Unconventional Role in Health and Disease. In: *PLoS Pathog* 5 (10), S. e1000544.
- Ekström**, A. M.; Held, M.; Hansson, L.-E.; Engstrand, L.; Nyrén, O. (2001): *Helicobacter pylori* in Gastric Cancer Established by CagA Immunoblot as a Marker of Past Infection. In: *Gastroenterology* 121 (4), S. 784–791.
- Ellis**, R. J. (1990): The molecular chaperone concept. In: *Semin Cell Biol* 1 (1), S. 1–9.
- El-Nujumi**, A.; Hilditch, T. E.; Williams, C.; McColl, K. E. (1998): Current or recent proton pump inhibitor therapy markedly impairs the accuracy of the [¹⁴C]urea breath test. In: *Eur J Gastroenterol Hepatol* 10 (9), S. 759–764.
- El-Omar**, Emad M. (2006): Role of host genes in sporadic gastric cancer. In: *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 20 (4), S. 675–686.
- Enomoto**, H.; Watanabe, H.; Nishikura, K.; Umezawa, H.; Asakura, H. (1998): Topographic distribution of *Helicobacter pylori* in the resected stomach. In: *Eur J Gastroenterol Hepatol* 10 (6), S. 473–478.
- Evans**, D.J [JR.]; Evans, D. G.; Takemura, T.; Nakano, H.; Lampert, H. C.; Graham, D. Y.; Granger, D. N.; Kvietys, P. R. (1995): Characterization of a *Helicobacter pylori* Neutrophil-Activating Protein. In: *Infect Immun* 63 (6), S. 2213–2220.
- Falush**, D.; Wirth, T.; Linz, B.; Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Kidd, M.; Blaser, M. J.; Graham, D. Y.; Vacher, S.; Perez-Perez, G. I.; Yamaoka, Y.; Mégraud, F.; Otto, K.; Reichard, U.; Katzowitsch, E.; Wang, X.; Achtman, M.; Suerbaum, S. (2003): Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. In: *Science* 299 (5612), S. 1582–1585.
- Fendrick**, A. M.; Chernew, M. E.; Hirth, R. A.; Bloom, B. S.; Bandekar, R. R.; Scheiman, J. M. (1999): Clinical and economic effects of population-based *Helicobacter pylori* screening to prevent gastric cancer. In: *Arch. Intern. Med.* 159 (2), S. 142–148.
- Fischbach**, W.; Malfertheiner, P.; Hoffmann, J.; Boltzen, W.; Bornschein, J.; Götze, O.; Höhne, W.; Kist, M.; Koletzko, S.; Labenz, J.; Layer, P.; Miehke, St; Morgner, A.; Peitz, U.; Preiß, J.; Prinz, C.; Rosien, U.; Schmidt, W.; Schwarzer, A.; Suerbaum, S.; Timmer, A.; Treiber, G.; Vieth, M. (2009): S3-Leitlinie „*Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulcuskrankheit“ der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). In: *Z Gastroenterol* 47 (01), S. 68–102.
- Fock**, K. M.; Katelaris, P.; Sugano, K.; Ang, T. L.; Hunt, R.; Talley, N. J.; Lam, S. K.; Xiao, S.-D.; Tan, H. J.; Wu, C.-Y.; Jung, H. C.; Hoang, B. H.; Kachintorn, U.; Goh, K.-L.; Chiba, T.; Rani, A. A. (2009): Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for *Helicobacter pylori* infection. In: *J. Gastroenterol. Hepatol.* 24 (10), S. 1587–1600.
- Ford**, A. C.; Delaney, B. C.; Forman, D.; Moayyedi, P. (2004): Eradication therapy in *Helicobacter pylori* positive peptic ulcer disease: systematic review and economic analysis. In: *Am. J. Gastroenterol.* 99 (9), S. 1833–1855.

- Francesco**, V.; Giorgio, F.; Hassan, C.; Manes, G.; Vannella, L.; Panella, C.; Ierardi, E.; Zullo, A. (2010): Worldwide H. pylori Antibiotic Resistance: a Systematic review. In: *J Gastrointest Liver Dis* 19 (4), S. 409–414.
- Fusconi**, M.; Vaira, D.; Menegatti, M.; Farinelli, S.; Figura, N.; Holton, J.; Ricci, C.; Corinaldesi, R.; Miglioli, M. (1999): Anti-CagA reactivity in Helicobacter pylori-negative subjects: a comparison of three different methods. In: *Dig Dis Sci* 44 (8), S. 1691–1695.
- Gao**, L.; Michel, A.; Weck, M. N.; Arndt, V.; Pawlita, M.; Brenner, H. (2009a): Helicobacter pylori Infection and Gastric Cancer Risk: Evaluation of 15 H. pylori Proteins Determined by Novel Multiplex Serology. In: *Cancer Research* 69 (15), S. 6164–6170.
- Gao**, L.; Weck, M. N.; Michel, A.; Pawlita, M.; Brenner, H. (2009b): Association between Chronic Atrophic Gastritis and Serum Antibodies to 15 Helicobacter pylori Proteins Measured by Multiplex Serology. In: *Cancer Research* 69 (7), S. 2973–2980.
- Gatta**, L.; Vakil, N.; Ricci, C.; Osborn, J. F.; Tampieri, A.; Perna, F.; Miglioli, M.; Vaira, D. (2004): Effect of Proton Pump Inhibitors and Antacid Therapy on 13C Urea Breath Tests and Stool Test for Helicobacter Pylori Infection. In: *Am J Gastroenterology* 99 (5), S. 823–829.
- Gebert**, B.; Fischer, W.; Weiss, E.; Hoffmann, R.; Haas, R. (2003): Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. In: *Science* 301 (5636), S. 1099–1102.
- Genta**, R. M.; Graham, D. Y. (1994): Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of Helicobacter pylori: a topographic study of H. pylori density and distribution. In: *Gastrointest. Endosc* 40 (3), S. 342–345.
- Gerhard**, M.; Lehn, N.; Neumayer, N.; Borém, T.; Rad, R.; Schepp, W.; Miehke, S.; Classen, M.; Prinz, C. (1999): Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin. In: *PNAS* 96 (22), S. 12778–12783.
- Gerhard**, M.; Schmees, C.; Volland, P.; Endres, N.; Sander, M.; Reindl, W.; Rad, R.; Oelsner, M.; Decker, T.; Mempel, M.; Hengst, L.; Prinz, C. (2005): A secreted low-molecular-weight protein from Helicobacter pylori induces cell-cycle arrest of T cells. In: *Gastroenterology* 128 (5), S. 1327–1339.
- Ghoshal**, U. C.; Chourasia, D. (2010): Gastroesophageal Reflux Disease and Helicobacter pylori: What may be the relationship? In: *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 16 (3), S. 243–250.
- Gisbert**, J. P.; Abaira, V. (2006): Accuracy of Helicobacter pylori Diagnostic Tests in Patients with Bleeding Peptic Ulcer: A Systematic Review and Meta-analysis. CME. In: *Am J Gastroenterology* 101 (4), S. 848–863.
- Goodwin**, C. S.; Armstrong, J. A.; Marshall, B. J. (1986a): Campylobacter pyloridis, gastritis, and peptic ulceration. In: *J Clin Pathol* 39, S. 353–365.
- Goodwin**, C. S.; Armstrong, J. A.; Chilvers, T.; Peters, M.; Collins, M. D.; Sly, L.; McConnell, W.; Harper, W. E. S. (1989a): Transfer of Campylobacter pylori and Campylobacter mustelae to Helicobacter gen. nov. as Helicobacter pylori comb. nov. and Helicobacter mustelae comb. nov. Respectively. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 39 (4), S. 397–405. Online verfügbar unter <http://ijs.sgmjournals.org/content/39/4/397.full.pdf>, zuletzt geprüft am 15.04.2012.
- Goodwin**, C. S.; Blake, P.; Blincow, E. (1986b): The minimum inhibitory and bactericidal concentrations of antibiotics and anti-ulcer agents against Campylobacter pyloridis. In: *J. Antimicrob. Chemother.* 17 (3), S. 309–314.

- Goodwin, C. S.; Collins, M. D.; Blincow, E. (1989b):** The absence of thermoplasmaquinones in *Campylobacter pyloridis*, and its temperature and pH growth range. In: *Microbios Lett.* 32, S. 137–140.
- Goodwin, C. S.; McCulloch, R. K.; Armstrong, J. A.; Wee, S. H. (1985):** Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. In: *J. Med. Microbiol.* 19 (2), S. 257–267.
- Graessle, S.; Grabher, G.; Gapp, G.; Preuss, E.; Datz, C.; Sandhofer, F.; Stöffler, G. (1999):** Immune Response to Natural and Recombinant Antigens of *Helicobacter pylori* in Patients with Dyspeptic Complaints. In: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (18).
- Graham, D. Y. (2000):** *Helicobacter pylori* infection is the primary cause of gastric cancer. In: *J Gastroenterol* 35 Suppl 12, S. 90–97.
- Graham, D. Y.; Lu, H.; Yamaoka, Y. (2009):** African, Asian or Indian enigma, the East Asian *Helicobacter pylori*: facts or medical myths. In: *J Dig Dis* 10 (2), S. 77–84.
- Guarner, J.; Kalach, N.; Elitsur, Y.; Koletzko, S. (2010):** *Helicobacter pylori* diagnostic tests in children: review of the literature from 1999 to 2009. In: *Eur J Pediatr* 169 (1), S. 15–25.
- Han, S. R.; Zschausch, H. C.; Meyer, H. G.; Schneider, T.; Loos, M.; Bhakdi, S.; Maeurer, M. J. (2000):** *Helicobacter pylori*: clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing. In: *J. Clin. Microbiol.* 38 (10), S. 3646–3651.
- Hazell, S. L.; Evans, D. J., JR; Graham, D. Y. (1991):** *Helicobacter pylori* catalase. In: *J Gen Microbiol* 137 (1), S. 57–61.
- Heilmann, K. L.; Borchard, F. (1991):** Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological, and ultrastructural findings. In: *Gut* 32, S. 137–140.
- Höcker, M.; Hohenberger, P. (2003):** *Helicobacter pylori* virulence factors - one part of a big picture. In: *The Lancet* 362, S. 1231–1233.
- Howson CP; H. T; Wynder, E. L. (1986):** The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. In: *Epidemiol Rev.* 8. Online verfügbar unter <http://epirev.oxfordjournals.org/content/8/1/1.full.pdf#page=1&view=FitH>, zuletzt geprüft am 11.06.2012.
- Hoy, B.; Löwer, M.; Weydig, C.; Carra, G.; Tegtmeyer, N.; Geppert, T.; Schröder, P.; Sewald, N.; Backert, S.; Schneider, G.; Wessler, S. (2010):** *Helicobacter pylori* HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. In: *EMBO Rep* 11 (10), S. 798–804.
- Huang, J. Q.; Zheng, G. F.; Sumanac, K.; Irvine, E. J.; Hunt, R. H. (2003):** Meta-analysis of the relationship between *cagA* seropositivity and gastric cancer (6). Online verfügbar unter <http://farncombe.mcmaster.ca/documents/Huangetal.Gastroenterology200312561636-44.pdf>, zuletzt geprüft am 10.03.2012.
- Huang, X.-W.; Luo, R.-H.; Zhao, Q.; Shen, Z.-Z.; Huang, L.-L.; An, X.-Y.; Zhao, L.-J.; Wang, J.; Huang, Y.-Z. (2011):** *Helicobacter pylori* induces mitochondrial DNA mutation and reactive oxygen species level in AGS cells. In: *Int. J. Med. Sci. (International Journal of Medical Sciences)* 8 (1), S. 56–67.
- Hussain, M. A.; Naveed, S. A.; Sechi, L. A.; Ranjan, S.; Alvi, A.; Ahmed, I.; Ranjan, A.; Mukhopadhyay, S.; Ahmed, N.; Dheda, K. (2008):** Isocitrate Dehydrogenase of *Helicobacter pylori* Potentially Induces Humoral Immune Response in Subjects with Peptic Ulcer Disease and Gastritis. In: *PLoS ONE* 3 (1), S. e1481.

- Israel**, D. M.; Hassall, E. (1993): Treatment and long-term follow-up of *Helicobacter pylori*-associated duodenal ulcer disease in children. In: *J. Pediatr.* 123 (1), S. 53–58.
- Janzon**, A.; Sjoling, A.; Lothigius, A.; Ahmed, D.; Qadri, F.; Svennerholm, A.-M. (2009): Failure To Detect *Helicobacter pylori* DNA in Drinking and Environmental Water in Dhaka, Bangladesh, Using Highly Sensitive Real-Time PCR Assays. In: *Applied and Environmental Microbiology* 75 (10), S. 3039–3044.
- Jaskowski**, T. D.; Martins, T. B.; Hill, H. R.; Litwin, C. M. (1997): Immunoglobulin A Antibodies to *Helicobacter pylori*. In: *J Clin Microbiol* 35 (11), S. 2999–3000. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC230107/pdf/352999.pdf>, zuletzt geprüft am 20.02.2012.
- Jemal**, A.; Bray, F.; Center, M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. (2011): Global cancer statistics. In: *CA Cancer J Clin* 61, S. 69–90. Online verfügbar unter http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.3322/caac.20107/asset/20107_ftp.pdf?v=1&t=gzmkhv1t&s=62c013ef42d6a048f9b86c27a89aa9873c4, zuletzt geprüft am 10.03.2012.
- Jönsson**, K.; Guo, B. P.; Monstein, H.-J.; Mekalanos, J. J.; Kronvall, G. (2004): Molecular cloning and characterization of two *Helicobacter pylori* genes coding for plasminogen-binding proteins. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (7), S. 1852–1857.
- Kamangar**, F.; Dawsey, S. M.; Blaser, M. J.; Perez-Perez, G. I.; Pietinen, P.; Newschaffer, C. J.; Abnet, C. C.; Albanes, D.; Virtamo, J.; Taylor, P. R. (2006): Opposing Risks of Gastric Cardia and Noncardia Gastric Adenocarcinomas Associated With *Helicobacter pylori* Seropositivity. In: *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 98 (20), S. 1445–1452.
- Khamri**, W.; Moran, A. P.; Worku, M. L.; Karim, Q. N.; Walker, M. M.; Annuk, H.; Ferris, J. A.; Appelmelk, B. J.; Eggleton, P.; Reid, K. B. M.; Thursz, M. R. (2005): Variations in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide to evade the innate immune component surfactant protein D. In: *Infect. Immun.* 73 (11), S. 7677–7686.
- Kivi**, M.; Tindberg, Y.; Sörberg, M.; Casswall, T. H.; Befrits, R.; Hellström, P. M.; Bengtsson, C.; Engstrand, L.; Granström, M. (2003): Concordance of *Helicobacter pylori* strains within families. In: *J. Clin. Microbiol.* 41 (12), S. 5604–5608.
- Klein**, P. D.; Graham, D. Y.; Gaillour, A.; Opekun, A. R.; Smith, E. O. (1991): Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. In: *Lancet* 337 (8756), S. 1503–1506.
- Koehler**, C.; Mues, M. B.; Dienes, H. P.; Kriegsmann, J.; Schirmacher, P.; Odenthal, M. (2003): *Helicobacter pylori* genotyping in gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma by multiplex PCR analyses of paraffin wax embedded tissues. In: *J Clin Pathol* (56), S. 36–42.
- Kokkola**, A.; Rautelin, H.; Puolakkainen, P.; Sipponen, P.; Färkkilä, M.; Haapiainen, R.; Kosunen, T. U. (2000): Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Patients with Atrophic Gastritis: Comparison of Histology, 13C-Urea Breath Test, and Serology. In: *Scand. J. Gastroenterol* 35, S. 138–141.
- Konturek**, S. J.; Konturek, P. C.; Konturek, J. W.; Plonka, M.; Czesnikiewicz-Guzik, M.; Brzozowski, T.; Bielanski, W. (2006): *Helicobacter pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. In: *Journal of Physiology and Pharmacology* 57 (3), S. 29–50.
- Kosunen**, T. U.; Seppälä, K.; Sarna, S.; Sipponen, P. (1992): Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. In: *Lancet* 339 (8798), S. 893–895.

- Korstanje**, A.; van Eeden, S.; Offerhaus, J. A.; Waltman, F. L.; Hartog, G. d.; Roelandse, F. W. C.; Souverijn, J. H. M.; Biemond, I.; Lamers, C. B. H. W. (2008): Comparison between serology and histology in the diagnosis of advanced gastric body atrophy: a study in a Dutch primary community. In: *J Clin Gastroenterol* 42 (1), S. 18–22.
- Kusters**, J. G.; Gerrits; M. M.; van Strijp, J. A. G.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. (1997): Coccoid Forms of *Helicobacter pylori* are the Morphologic Manifestation of Cell Death. In: *Infect Immun* 65 (9), S. 3672–3679.
- Kusters**, J. G.; van Vliet, Arnould H.M; Kuipers, Ernst J. (2006): Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. In: *Clinical Microbiology Reviews* 19 (3), S. 449–490.
- Labigne**, A.; Cussac, V.; Courcoux, P. (1991): Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. In: *J Bacteriol* 173 (6), S. 1920–1931.
- Lage**, A. P.; Godfroid, E.; Fauconnier, A.; Burette, A.; Butzler, J. P.; Bollen, A.; Glupczynski, Y. (1995): Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. In: *J Clin Microbiol* 33 (10), S. 2752–2756.
- Lai**, C.-H.; Kuo, C.-H.; Chen, Y.-C.; Chao, F.-Y.; Poon, S.-K.; Chang, C.-S.; Wang, W.-C. (2002): High Prevalence of *cagA*- and *babA2*-Positive *Helicobacter pylori* clinical isolates in Taiwan. In: *J Clin Microbiol* 40 (10), S. 3860–3862.
- Lau**, P. P.; DeBrunner-Vossbrinck, B.; Dunn, B.; Miotto, K.; MacDonnell, M. T.; Rollins, D. M.; Pillidge, C. J.; Hespell, R. B.; Colwell, R. R.; Sogin, M. L.; Fox, G. E. (1987): Phylogenetic diversity and position of the genus *Campylobacter*. In: *Syst. Appl. Microbiol.* 9, S. 231–238.
- Lee**, Y.-C.; Lin, J.-T.; Wu, H.-M.; Liu, T.-Y.; Yen, M.-F.; Chiu, H.-M.; Wang, H.-P.; Wu, M.-S.; Hsiu-Hsi Chen, T. (2007): Cost-effectiveness analysis between primary and secondary preventive strategies for gastric cancer. In: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16 (5), S. 875–885.
- Lehours**, P.; Ruskone-Foumestruaux, A.; Lavergne, A.; Cantet, F.; Mégraud, F.; the Group d'Etude des Lymphomes Digestifs (GELD) for the Fédération Française de Cancérologie Digestive (FFCD) (2003): Which test to use to detect *Helicobacter pylori* infection in patients with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma? In: *The American Journal of Gastroenterology* 98 (2), S. 294.
- Leung**, W. K.; Siu, K. L.; Kwok, C. K.; Chan, S. Y.; Sung, R.; Sung, J. J. (1999): Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. In: *Am. J. Gastroenterol.* 94 (10), S. 2881–2884.
- Lu**, H.; Yamaoka, Y.; Graham, D. Y. (2005): *Helicobacter pylori* virulence factors: facts and fantasies. In: *Curr. Opin. Gastroenterol.* 21 (6), S. 653–659.
- Lu**, Y.; Redlinger, T. E.; Avitia, R.; Galindo, A.; Goodman, K. (2002): Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (3), S. 1436–1439.
- Malfertheiner**, P.; Megraud, F.; O'Morain, C. A.; Atherton, J.; Axon, A. T. R.; Bazzoli, F.; Gensini, G. F.; Gisbert, J. P.; Graham, D. Y.; Rokkas, T.; El-Omar, E. M.; Kuipers, E. J. (2012): Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. In: *Gut* 61 (5), S. 646–664.
- Marshall**, B. J. (1983): Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. In: *Lancet* 1 (8336), S. 1273–1275.

- Marshall**, B. J. H. Royce D. I. Annear C. S. Goodwin J. W. (1984): Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. In: *Microbios Lett.* (25), S. 83–88.
- Marshall**, B. J.; Goodwin, C. S. (1987): Notes: Revised Nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 37 (1), S. 68.
- Marshall**, B. J.; Surveyor, I. (1988): Carbon-14 urea breath test for the diagnosis of *Campylobacter pylori* associated gastritis. In: *J. Nucl. Med.* 29 (1), S. 11–16.
- Marshall**, B. J.; Warren, J. R. (1984): Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. In: *Lancet* 1 (8390), S. 1311–1315.
- Marshall**, B. J.; Goodwin, C. S.; Warren, J. R.; Murray, R.; Blincow, E. D.; Blackbourn, S. J.; Phillips, M.; Waters, T. E.; Sanderson, C. R. (1988): Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. In: *Lancet* 2 (8626-8627), S. 1437–1442.
- Marshall**, B. J. (2001): One Hundred Years of Discovery and Rediscovery of *Helicobacter pylori* and Its Association with Peptic Ulcer Disease. In: *Helicobacter pylori Physiology and Genetics*. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/eaccess.ub.tum.de/books/NBK2432/#A180>, zuletzt geprüft am 05.09.2011.
- Mascellino**, M. T.; Margani, M.; Oliva, A. (2009): *Helicobacter pylori*: Determinant and markers of virulence. In: *Disease Markers* 27, S. 1–21.
- Mason**, J.; Axon, A. T. R.; Forman, D.; Duffett, S.; Drummond, M.; Crocombe, W.; Feltbower, R.; Mason, S.; Brown, J.; Moayyedi, P. (2002): The cost-effectiveness of population *Helicobacter pylori* screening and treatment: a Markov model using economic data from a randomized controlled trial. In: *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16 (3), S. 559–568.
- Mattapallil**, J. J.; Dandekar, S.; Canfield, D. R.; Solnick, J. V. (2000): A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute *Helicobacter pylori* infection in rhesus macaques. In: *Gastroenterology* 118 (2), S. 307–315.
- Mattsson**, A.; Quiding-Jarbrink, M.; Lonroth, H.; Hamlet, A.; Ahlstedt, I.; Svennerholm, A. (1998): Antibody-secreting cells in the stomachs of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. In: *Infect Immun* 66 (6), S. 2705–2712.
- Mégraud**, F. (2005): Comparison of non-invasive tests to detect *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents: Results of a multicenter European study. In: *The Journal of Pediatrics* 146 (2), S. 198–203.
- Mégraud**, F.; Lehours, P. (2007): *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. In: *Clinical Microbiology Reviews* 20 (2), S. 280–322.
- Michel**, A.; Waterboer, T.; Kist, M.; Pawlita, M. (2009): *Helicobacter pylori* Multiplex Serology. In: *Helicobacter (Blackwell Publishing Ltd.)* 14, S. 525–535.
- Mittl**, P. R. E.; Luthy, L.; Reinhardt, C.; Joller, H. (2003): Detection of High Titers of Antibody against *Helicobacter Cysteine-Rich Proteins A, B, C, and E* in *Helicobacter pylori*-Infected Individuals. In: *Clinical and Vaccine Immunology* 10 (4), S. 542–545.
- Miyachi**, H.; Miki, I.; Aoyama, N.; Shirasaka, D.; Matsumoto, Y.; Toyoda, M.; Mitani, T.; Morita, Y.; Tamura, T.; Kinoshita, S.; Okano, Y.; Kumagai, S.; Kasuga, M. (2006): Primary levofloxacin resistance and *gyrA/B* mutations among *Helicobacter pylori* in Japan. In: *Helicobacter* 11 (4), S. 243–249.
- Moayyedi**, P.; Soo, S.; Deeks, J. J.; Delaney, B.; Harris, A.; Innes, M.; Oakes, R.; Wilson, S.; Roalfe, A.; Bennett, C.; Forman, D. (2011): Eradication of *Helicobacter pylori* for non-ulcer

dyspepsia. Cochrane Database of Systematic Reviews 2011, Issue 2. Art. No.: CD002096. S. 291–295

- Mobley, H. L.** (1996): The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. In: *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10 Suppl 1, S. 57–64.
- Monteiro, L.; Gras, N.; Megraud, F.** (2001): Magnetic Immuno-PCR Assay with Inhibitor Removal for Direct Detection of *Helicobacter pylori* in Human Feces. In: *Journal of Clinical Microbiology* 39 (10), S. 3778–3780.
- Monteiro, L.; Mascarel, A.; Sarrasqueta, A. M.; Bergey, B.; Barberis, C.; Talby, P.; Roux, D.; Shouler, L.; Goldfain, D.; Lamouliatte, H.; Megraud, F.** (2001): Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. In: *Am J Gastroenterology* 96 (2), S. 353–358.
- Nguyen, L. T.; Uchida, T.; Kuroda, A.; Tsukamoto, Y.; Trinh, T. D.; Ta, L.; Mai, H. B.; Ho, D. Q.; Hoang, H. H.; Vilaichone, R. K.; Mahachai, V.; Matsuhisa, T.; Kudo, Y.; Okimoto, T.; Kodama, M.; Murakami, K.; Fujioka, T.; Yamaoka, Y.; Moriyama, M.** (2009): Evaluation of the anti-East Asian CagA-specific antibody for CagA phenotyping. In: *Clin Vaccine Immunol* 16 (11), S. 1687–1692.
- Oak, J. H.; Chung, W. C.; Jung, S. H.; Choi, K. H.; Kim, E. J.; Kang, B. K.; Kang, B. R.; Kong, S. E.; Paik, C. N.; Lee, K. M.** (2011): Effect of acid pump antagonist (Revaprazan, Revanex(R)) on result of ¹³C urea breath test in patients with *Helicobacter pylori* associated peptic ulcer disease. In: *Korean J Gastroenterol* 57 (1), S. 8–13.
- O'Connor, C. D.; Farris, M.; Fowler, R.; Qi, S. Y.** (1997): The proteome of *Salmonella enterica* serovar typhimurium: current progress on its determination and some applications. In: *Electrophoresis* 18 (8), S. 1483–1490.
- Odenbreit, S.; Swoboda, K.; Barwig, I.; Ruhl, S.; Borén, T.; Koletzko, S.; Haas, R.** (2009): Outer membrane protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates. In: *Infect. Immun.* 77 (9), S. 3782–3790.
- Pan, Z. J.; van der Hulst, R. W.; Feller, M.; Xiao, S. D.; Tytgat, G. N.; Dankert, J.; van der Ende, A.** (1997): Equally high prevalences of infection with cagA-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia. In: *J. Clin. Microbiol.* 35 (6), S. 1344–1347.
- Papini, E.; Bernard, M. de; Milia, E.; Bugnoli, M.; Zerial, M.; Rappuoli, R.; Montecucco, C.** (1994): Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originate from late endosomal compartments. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (21), S. 9720–9724.
- Parsonnet, J.** (1995): The incidence of *Helicobacter pylori* infection. In: *Allment Pharmacol Ther* 9 (2), S. 45-51.
- Parsonnet, J.** (1998): *Helicobacter pylori*: the size of the problem. In: *Gut* 43 (1), S. 6–9.
- Parsonnet, J.; Shmueli, H.; Haggerty, T.** (1999): Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. In: *JAMA* 282 (23), S. 2240–2245.
- Peck, B.; Ortkamp, M.; Diehl, K.D; Hundt, E.; Knapp, B.** (1999): Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. In: *Nucleic Acids Res.* 27 (16), S. 3325–3333.
- Perez-Perez, G. I.; Rothenbacher, D.; Brenner, H.** (2004): Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. In: *Helicobacter* 9 Suppl 1, S. 1–6.
- Perez-Perez, G. I.; Olivares, A. Z.; Foo, F. Y.; Foo, S.; Neusy, A. J.; Ng, C.; Holzman, R. S.; Marmor, M.; Blaser, M. J.** (2005): Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in New York City populations originating in East Asia. In: *J Urban Health* 82 (3), S. 510–516.

- Peters, C.;** Schablon, A.; Harling, M.; Nienhaus, A. (2011): Sind *Helicobacter pylori* Infektionen bei Gastroenterologen und ihren Assistenten beruflich erworben? Abstracts der Vorträge und Poster. In: Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin e.V., 51. Jahrestagung, S. 187–188.
- Peterson, W. L.;** Graham, D. Y.; Marshall, B.; Blaser, M. J.; Genta, R. M.; Klein, P. D.; Stratton, C. W.; Drnec, J.; Prokocimer, P.; Siepman, N. (1993): Clarithromycin as monotherapy for eradication of *Helicobacter pylori*: a randomized, double-blind trial. In: *Am. J. Gastroenterol.* 88 (11), S. 1860–1864.
- Press Release:** The 2005 Nobel Prize in Physiology or Medicine (2012). Online verfügbar unter http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/press.html, zuletzt aktualisiert am 03.07.2013, zuletzt geprüft am 03.07.2013.
- Pronai, L.;** Schandl, L.; Orosz, Z.; Magyar, P.; Tulassay, Z. (2004): Lower prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with inflammatory bowel disease but not with chronic obstructive pulmonary disease - antibiotic use in the history does not play a significant role. In: *Helicobacter* 9 (3), S. 278–283.
- Radin, J. N.;** Gonzalez-Rivera, C.; Ivie, S. E.; McClain, M. S.; Cover, T. L. (2011): *Helicobacter pylori* VacA Induces Programmed Necrosis in Gastric Epithelial Cells. In: *Infect Immun* 79 (7), S. 2535–2543.
- Reibman, J.;** Marmor, M.; Filner, J.; Fernandez-Beros, M.-E.; Rogers, L.; Perez-Perez, G. I.; Blaser, M. J.; Hartl, D. (2008): Asthma Is Inversely Associated with *Helicobacter pylori* Status in an Urban Population. In: *PLoS ONE* 3 (12), S. e4060.
- Remmele, W.;** Bettendorf, U.; Gebbers, J. O. (1996): Pathologie 2: Verdauungstrakt: Springer. Online verfügbar unter <http://books.google.de/books?id=ZPHxriK6Ut0C>.
- Reynders, M. B. M. L.;** Deyi, V. Y. M.; Dahma, H.; Scheper, T.; Hanke, M.; Decolvenaer, M.; Dediste, A. (2012): Performance of individual *Helicobacter pylori* antigens in the immunoblot-based detection of *H. pylori* infection. In: *FEMS Immunol Med Microbiol* 64 (3), S. 352–363.
- Riggio, M. P.;** Lennon, A. (1999): Identification by PCR of *Helicobacter pylori* in subgingival plaque of adult periodontitis patients. In: *J Med Microbiol* 48 (3), S. 317–322.
- Romaniuk, P. J.;** Zoltowska, B.; Trust, T. J.; Lane, D. J.; Olsen, G. J.; Pace, N. R.; Stahl, D. A. (1987): *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. In: *J. Bacteriol.* 169 (5), S. 2137–2141.
- Roosendaal, R.;** Kuipers, E. J.; Buitenwerf, J.; van Uffelen, C.; Meuwissen, S. G.; van Kamp, G. J.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. (1997): *Helicobacter pylori* and the birth cohort effect: evidence of a continuous decrease of infection rates in childhood. In: *Am. J. Gastroenterol.* 92 (9), S. 1480–1482.
- Rothenbacher, D.** (1998): Prevalence and determinants of *Helicobacter pylori* infection in preschool children: a population-based study from Germany. In: *International Journal of Epidemiology* 27 (1), S. 135–141.
- Sabarth, N.;** Hurwitz, R.; Meyer, Thomas F.; Bumann, D. (2002): Multiparameter Selection of *Helicobacter pylori* Antigens Identifies Two Novel Antigens with High Protective Efficacy. In: *Infect Immun* 70 (11), S. 6499–6503.
- Sabbi, T.;** Angelis, P. d.; Colistro, F.; Dall'Oglio, L.; Di Abriola, G. F.; Castro, M. (2005): Efficacy of Noninvasive Tests in the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Pediatric Patients. In: *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* Vol. 159 (3), S. 238–241.

- Saiki**, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. In: *Science* 230 (4732), S. 1350–1354.
- Salih**, B. A. (2009): Helicobacter pylori infection in developing countries: the burden for how long? In: *Saudi J Gastroenterol* 15 (3), S. 201–207.
- Sasaki**, M.; Ogasawara, N.; Utsumi, K.; Kawamura, N.; Kamiya, T.; Kataoka, H.; Tanida, S.; Mizoshita, T.; Kasugai, K.; Joh, T. (2010): Changes in 12-Year First-Line Eradication Rate of Helicobacter pylori Based on Triple Therapy with Proton Pump Inhibitor, Amoxicillin and Clarithromycin. In: *J Clin Biochem Nutr* 47 (1), S. 53–58.
- Satin**, B.; Del Giudice, G.; Della Bianca, V. D. S.; Laudanna, C.; Tonello, F.; Kelleher, D.; Rappuoli, R.; Montecucco, Cesare; Rossi, F. (2000): The Neutrophil-activating Protein (HP-NAP) of Helicobacter pylori Is a Protective Antigen and a Major Virulence Factor. In: *J Exp Med* 191 (9), S. 1467–1476.
- Schmees**, C.; Prinz, C.; Treptau, T.; Rad, R.; Hengst, L.; Volland, P.; Bauer, S.; Brenner, L.; Schmid, R.; Gerhard, M. (2007): Inhibition of T-Cell Proliferation by Helicobacter Transpeptidase. In: *Gastroenterology Research and Practice* 132 (5), S. 1820–1833.
- Schwarz**, S.; Morelli, G.; Kusecek, B.; Manica, A.; Balloux, F.; Owen, R. J.; Graham, D. Y.; van der Merw, S.; Achtman, M.; Suerbaum, S. (2008): Horizontal versus Familial Transmission of Helicobacter pylori. In: *PLoS Pathog* 4 (10), S. e1000180.
- Segal**, E. D.; Cha, J.; Lo, J.; Falkow, S.; Tompkins, L. S. (1999): Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by Helicobacter pylori. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (25), S. 14559–14564.
- Simán**, J. H.; Engstrand, L.; Berglund, G.; Florén, C.-H.; Forsgren, A. (2005): Evaluation of Western Blot CagA Seropositivity in Helicobacter pylori-Seropositive and -Seronegative Subjects. In: *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* (2), S. 304–309.
- Sobala**, G. M.; Crabtree, J. E.; Pentith, J. A.; Rathbone, B. J.; Shallcross, T. M.; Wyatt, J. I.; Dixon, M. F.; Heatley, R. V.; Axon, A. T. (1991): Screening dyspepsia by serology to Helicobacter pylori. In: *Lancet* 338 (8759), S. 94–96.
- Spiegelhalder**, C.; Gerstenecker, B.; Kersten, A.; Schiltz, E.; Kist, M. (1993): Purification of Helicobacter pylori superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. In: *Infect Immun* 61 (12), S. 5315–5325.
- Staat**, M. A.; Kruszon-Moran, D.; McQuillan, G. M.; Kaslow, R. A. (1996): A population-based serologic survey of Helicobacter pylori infection in children and adolescents in the United States. In: *J. Infect. Dis* 174 (5), S. 1120–1123.
- Stolte**, M.; Meining, A. (2001): The updated Sydney system: Classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment. In: *J Gastroenterol* 15 (9), S. 591–598. Online verfügbar unter http://www.pulsus.com/pdfs/gate/gast/5423_stol.pdf, zuletzt geprüft am 09.10.2011.
- Stolte**, M.; Bayerdörffer, E.; Morgner, A.; Alpen, B.; Wündisch, T.; Thiede, C.; Neubauer, A. (2002): Helicobacter and gastric MALT lymphoma. In: *Gut* 50 Suppl 3, S. III19-24.
- Sudraba**, A.; Daugule, I.; Rudzite, D.; Funka, K.; Tolmanis, I.; Engstrand, L.; Janciauskas, D.; Jonaitis, L.; Kiudelis, G.; Kupcinskas, L.; Ivanauskas, A.; Leja, M. (2011): Performance of Routine Helicobacter pylori Tests in Patients with Atrophic Gastritis. In: *J Gastrointestin Liver Dis* 20 (4), S. 349–354.
- Suerbaum**, S.; Josenhans, C.; Labigne, A. (1993): Cloning and genetic characterization of the Helicobacter pylori and Helicobacter mustelae flaB flagellin genes and construction of

- H. pylori flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. In: *J. Bacteriol.* 175 (11), S. 3278–3288.
- Suerbaum**, Sebastian (2012): *Helicobacter pylori* in „Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie“, Suerbaum, S., Hahn, H., Burchard, G., Kaufmann, S., Schulz, T. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 7. Aufl., S. 281-286
- Tate**, S. S.; Meister, A. (1981): gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. In: *Mol. Cell. Biochem.* 39, S. 357–368.
- Testoni**, P. A.; Colombo, E.; Cattani, L.; Longhi, M.; Bagnolo, F.; Lella, F.; Buizza, M.; Scelsi, R. (1996): *Helicobacter pylori* serology in chronic gastritis with antral atrophy and negative histology for *Helicobacter*-like organisms. In: *J. Clin. Gastroenterol* 22 (3), S. 182–185.
- Thomson**, A. B. R.; Sauve, M. D.; Kassam, N.; Kamitakahara, H. (2010): Safety of the long-term use of proton pump inhibitors. In: *WJG* 16 (19), S. 2323.
- Tkachenko**, M. A.; Zhannat, N. Z.; Erman, L. V.; Blashenkova, E. L.; Isachenko, S. V.; Isachenko, O. B.; Graham, D. Y.; Malaty, H. M. (2007): Dramatic changes in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection during childhood: a 10-year follow-up study in Russia. In: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 45 (4), S. 428–432.
- Tomb**, J.-F.; White, O.; Kerlavage, A. R.; Clayton, R. A.; Sutton, G. G.; Fleischmann, R. D.; Ketchum, K. A.; Klenk, H. P.; Gill, S.; Dougherty, B. A.; Nelson, K.; Quackenbush, J.; Zhou, L.; Kirkness, E. F.; Peterson, S.; Loftus, B.; Richardson, D.; Dodson, R.; Khalak, H. G.; Glodek, A.; McKenney, K.; Fitzgerald, L. M.; Lee, N.; Adams, M. D.; Hickey, E. K.; Berg, D. E.; Gocayne, J. D.; Utterback, T. R.; Peterson, J. D.; Kelley, J. M.; Cotton, M. D.; Weidman, J. M.; Fujii, C.; Bowman, C.; Watthey, L.; Wallin, E.; Hayes, W. S.; Borodovsky, M.; Karp, P. D.; Smith, H. O.; Fraser, C. M.; Venter, J. C. (1997): The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. In: *Nature* 388 (6642), S. 539–547.
- Uemura**, N.; Okamoto, S.; Yamamoto, S.; Matsumura, N.; Yamaguchi, S.; Yamakido, M.; Taniyama, K.; Sasaki, N.; Schlemper, R. (2001): *Helicobacter pylori* Infection and the Development of Gastric Cancer. In: *N Engl J Med* 345 (11), S. 784–789. Online verfügbar unter <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa001999>, zuletzt geprüft am 14.03.2012.
- Veenendaal**, R. A.; Peña, A. S.; Meijer, J. L.; Endtz, H. P.; van der Est, M. M.; van Duijn, W.; Eulerink, F.; Kreuning, J.; Lamers, C. B. (1991): Long term serological surveillance after treatment of *Helicobacter pylori* infection. In: *Gut* 32 (11), S. 1291–1294.
- Wen**, S.; Moss, S. F. (2009): *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. In: *Cancer Lett* 282 (1), S. 1–8.
- Widmer**, M.; Korwin, J. D. de; Aucher, P.; Thiberge, J. M.; Suerbaum, S.; Labigne, A.; Fauchere, J. L. (1999): Performance of native and recombinant antigens for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. In: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18 (11), S. 823–826. Online verfügbar unter <http://www.springerlink.com.eaccess.ub.tum.de/content/0pd6ae8yv6mc5vu/fulltext.pdf>.
- Wilson**, J. M. G.; Jungner, G. (1968): Principles and Practice of Screening for Disease. In: Public Health Papers, Bd. 34, S. 21–32. Online verfügbar unter http://whqlibdoc.who.int/php/WHO_PHP_34.pdf, zuletzt geprüft am 15.02.2012.
- Wong**, B. C.-Y.; Lam, S. K.; Wong, W. M.; Chen, J. S.; Zheng, T. T.; Feng, R. E.; Lai, K. C.; Hu, W. H. C.; Yuen, S. T.; Leung, S. Y.; Fong, D. Y. T.; Ho, J.; Ching, C. K.; Chen, J. S. (2004): *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. In: *JAMA* 291 (2), S. 187–194.

- World Health Organisation** (1994): IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter pylori. Lyon: International Agency for the Research on Cancer (61).
- Xia, H. H.; Talley, N. J.** (1997): Natural acquisition and spontaneous elimination of Helicobacter pylori infection: clinical implications. In: *Am. J. Gastroenterol.* 92 (10), S. 1780–1787.
- Xiang, Z.; Censini, S.; Bayeli, P. F.; Telford, J. L.; Figura, N.; Rappuoli, R.; Covacci, A.** (1995): Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of Helicobacter pylori reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. In: *Infect. Immun.* 63 (1), S. 94–98.
- Xie, F.; Luo, N.; Lee, H.-P.** (2008): Cost effectiveness analysis of population-based serology screening and (13)C-Urea breath test for Helicobacter pylori to prevent gastric cancer: a markov model. In: *World J. Gastroenterol.* 14 (19), S. 3021–3027.
- Xu, C.; Li, Z.-S.; Tu, Z.-X.; Xu, G.-M.; Gong, Y.-F.; Man, X.-H.** (2003): Distribution of cagG gene in Helicobacter pylori isolates from Chinese patients with different gastroduodenal diseases and its clinical and pathological significance. In: *WJG* 9 (10), S. 2258–2260.
- Yamaguchi, H.; Osaki, T.; Kurihara, N.; Taguchi, H.; Hanawa, T.; Yamamoto, T.; Kamiya, S.** (1997): Heat-shock protein 60 homologue of Helicobacter pylori is associated with adhesion of H. pylori to human gastric epithelial cells. In: *J Med Microbiol* 46 (10), S. 825–831.
- Yamaoka, Y.** (2008a): Increasing evidence of the role of Helicobacter pylori SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease. In: *J Infect Dev Ctries* 2 (3), S. 174–181.
- Yamaoka, Y.** (2008b): Roles of Helicobacter pylori BabA in gastroduodenal pathogenesis. In: *WJG* 14 (27), S. 4265.
- Yamaoka, Y.; Kato, M.; Asaka, M.** (2008c): Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between Helicobacter pylori strains. In: *Intern. Med* 47 (12), S. 1077–1083.
- Yamaoka, Y.** (2010): Mechanisms of disease: Helicobacter pylori virulence factors. In: *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 7, S. 629–641.
- Zhang, Z.; Zou, Y.-Y.; Zhou, Y.; Zhou, H.; Li, Y.-J.** (2009): The aggravatory effect of nicotine on Helicobacter pylori-induced gastric mucosa injury: role of asymmetric dimethylarginine. In: *J Clin Gastroenterol* 43 (3), S. 261–266.
- Zsikla, V.; Hailemariam, S.; Baumann, M.; Mund, M. T.; Schaub, N.; Meier, R.; Cathomas, G.** (2006): Increased rate of Helicobacter pylori infection detected by PCR in biopsies with chronic gastritis. In: *Am. J. Surg. Pathol.* 30 (2), S. 242–248.

Anhang

Tabelle 22: Ausführliche Liste der Studienteilnehmer

Code	sex	age	<i>H. pylori</i> Status	Histo Grad	Histo Aktivität	Pathologie- zeichen	recom Well ^R	Score	recom Line ^R	Score	cagA	VacA	GroEL	UreaA	HcpC	gGT
449	w	33	1	2	2	0	1	3,695	1	4	1	0	1	0	0	0
450	m	46	0				0	0,156	0	0	0	0	0	0	0	0
451	w	54	1	2	2	0	1	3,879	1	5	1	0	1	0	0	1
452	m	31	1	2	2	0	1	2,996	1	9	1	1	1	0	1	1
453	w	54	2				1	0,794	1	2	1	0	0	0	0	0
454	m	25	1	2		0	1	0,743	1	2	0	0	1	0	0	0
455	m	41	0				0	0,131	0	0	0	0	0	0	0	0
456	m	53	0				0	0,168	0	0	0	0	0	0	0	0
457	m	67	0				0	0,124	0	0	0	0	0	0	0	0
459	m	38	1	2	1	0	1	2,672	1	7	1	1	1	0	0	1
460	w	59	2				1	0,999	1	4	1	0	1	0	0	0
461	w	38	2				1	1,820	1	2	1	0	0	0	0	0
462	m	69	0				0	0,247	0	0	0	0	0	0	0	0
463	w	37	1	2	1	0	1	1,565	1	4	0	0	1	0	1	1
464	w	60	2				1	1,992	1	5	1	0	1	0	1	0
465	m	34	1	2	2	1	1	2,801	1	4	1	0	1	0	0	0
466	m	25	0				0	0,184	0	0	0	0	0	0	0	0
467	w	68	0				0	0,171	0	0	0	0	0	0	0	0
468	m	63	1	2	2	0	1	1,659	1	4	1	0	0	0	1	1
469	m	58	2				1	0,536	0	0	0	0	0	0	0	0
470	w	38	1	2	1	0	1	2,366	1	3	0	0	1	0	0	1
471	m	47	2	1	0		1	3,743	1	6	1	1	1	0	0	0
472	m	59	2				0	0,333								
473	w	75	2				0	0,172								
474	w	39	0				0	0,186	0	0	0	0	0	0	0	0
475	m	20	0	2	0		0	0,206	0	0	0	0	0	0	0	0
476	w	61	0				0	0,196	0	0	0	0	0	0	0	0
477	w	70	2				1	2,914	1	5	1	1	0	0	1	0
478	m	68	2	1	0		0	0,361								
479	m	45	2	1	0		0	0,279								
480	w	50	2	2	0		1	0,907	1	4	1	0	1	0	0	0
481	m	49	0				0	0,147	0	0	0	0	0	0	0	0
482	m	62	0				0	0,163	0	0	0	0	0	0	0	0
483	w	41	1	2	2	0	1	1,185	1	2	0	0	1	0	0	0
484	m	45	0				0	0,346	0	0	0	0	0	0	0	0
486	m	77	0				1	1,216	1	2	0	0	1	0	0	0
487	w	48	0				0	0,309	0	0	0	0	0	0	0	0
488	m	60	0				0	0,200	0	0	0	0	0	0	0	0
489	m	73	2				1	0,733	1	2	1	0	0	0	0	0
490	m	72	2	1	0		0	0,511								
491	m	49	0				0	0,203	0	0	0	0	0	0	0	0
492	m	81	1	2	3		1	1,073	1	4	1	0	1	0	0	0
493	w	55	2	1	0		1	1,550	1	3	1	0	0	0	1	0
494	w	53	0				0	0,159	0	0	0	0	0	0	0	0

495	m	84	0				0	0,171	0	0	0	0	0	0	0	0
496	m	61	0				0	0,171	0	0	0	0	0	0	0	0
497	w	70	1		3	1	1	3,603	1	5	1	0	1	0	0	1
498	m	71	1	2	2	1	1	1,645	1	5	1	1	0	0	0	1
499	m	55	0				0	0,193	0	0	0	0	0	0	0	0
500	m	23	1	2	1	0	1	1,637	1	3	0	0	1	0	1	0
501	m	57	0				0	0,194	0	0	0	0	0	0	0	0
502	m	21	1	2	1	0	1	1,563	1	5	0	0	1	1	1	1
503	w	61	0				0	0,224	0	0	0	0	0	0	0	0
504	w	44	1	2	1	0	1	9,999	1	9	1	1	1	1	1	1
505	m	71	2				1	0,456	1	3	1	0	0	0	1	0
506	m	55	1	2	1	1	1	1,303	1	2	0	0	1	0	0	0
507	w	71	0				0	0,206	0	0	0	0	0	0	0	0
508	m	63	0				0	0,243	0	0	0	0	0	0	0	0
509	m	26	0				0	0,275	0	0	0	0	0	0	0	0
510	w	36	2	1	0		1	2,698	1	4	1	0	1	0	0	0
511	w	52	2				1	1,637	1	4	1	0	1	0	0	0
512	w	61	2				1	0,487	1	2	1	0	0	0	0	0
513	m	54	0				0	0,262	0	0	0	0	0	0	0	0
514	m	70	2				1	0,779	1	5	1	0	1	0	1	0
515	m	62	0				0	0,240	0	0	0	0	0	0	0	0
516	m	49	2				1	3,837	1	4	1	0	1	0	0	0
517	w	84	2				0	0,368								
518	w	32	0				0	0,175	0	0	0	0	0	0	0	0
519	w	43	0				0	0,201	0	0	0	0	0	0	0	0
520	w	66	0				0	0,186	0	0	0	0	0	0	0	0
521	w	64	0				0	0,207	0	0	0	0	0	0	0	0
522	w	72	0				0	0,188	0	0	0	0	0	0	0	0
523	w	73	2	1	0		0	0,529								
524	w	55	0				0	0,309	0	0	0	0	0	0	0	0
525	m	81	2	1	0		1	1,375	1	2	1	0	0	0	0	0
526	w	67	2				0	0,253								
527	w	51	2	1	0		1	3,779	1	4	1	1	0	0	0	0
528	m	30	1	2	2	0	1	3,909	1	6	1	0	1	0	1	1
529	w	60	1	2	2	0	1	6,636	1	3	0	0	1	0	0	1
530	w	59	2	1	0		1	0,985	1	2	1	0	0	0	0	0
531	m	50	1	2	2	0	1	2,200	1	2	0	0	1	0	0	0
532	m	80	1	2	1	0	1	0,650	1	4	0	0	1	0	1	1
533	w	70	2				1	1,143	1	2	1	0	0	0	0	0
534	m	81	2				1	1,873	1	2	1	0	0	0	0	0
535	w	70	2				1	1,321	1	2	0	0	1	0	0	0
536	w	51	0				1	1,450	1	4	1	0	1	0	0	0
537	m	24	0				0	0,160	0	0	0	0	0	0	0	0
538	m	58	2	1	0		1	0,882	1	4	1	0	1	0	0	0
539	w	73	2	1	0		0	0,095	0	0	0	0	0	0	0	0
540	m	74	2	1	0		0	0,300								
541	m	54	2				1	0,849	1	3	1	0	0	0	1	0
542	w	21	2	1	0		0	0,257								
543	w	53	1	2	2	0	1	3,955	1	8	1	1	1	0	1	1
544	w	79	2	1	0		1	0,670	1	2	0	0	1	0	0	0
545	w	38	1	1	1	1	1	3,794	1	5	1	1	0	0	0	1

546	m	50	1	2	1	0	1	0,949	1	4	0	0	1	0	1	1
547	m	69	1	2	2	0	1	9,999	1	5	1	0	1	0	0	1
548	w	57	0				0	0,235	0	0	0	0	0	0	0	0
549	w	57	0				0	0,137	0	0	0	0	0	0	0	0
550	w	76	2	1	0		1	0,682	1	2	1	0	0	0	0	0
551	w	33	0				0	0,169	0	0	0	0	0	0	0	0
552	m	62	2	1	0		1	1,488	1	5	0	1	1	1	0	0
553	w	68	2	1	0		1	0,528	2	1	0	0	0	0	1	0
554	m	57	2	1	0		1	2,040	1	6	1	0	1	0	1	1
555	m	46	0				0	0,343	0	0	0	0	0	0	0	0
556	w	82	2				1	0,728	1	4	1	0	1	0	0	0
557	w	35	0				1	0,688	0	0	0	0	0	0	0	0
558	m	59	0				0	0,374	0	0	0	0	0	0	0	0
559	w	52	1	2	2	2	1	2,641	1	4	1	0	1	0	0	0
560	w	76	2	1	0		1	0,909	1	4	1	0	1	0	0	0
561	m	34	0				0	0,224	0	0	0	0	0	0	0	0
562	m	75	1	2	1	0	1	3,873	1	8	1	1	1	1	0	1
563	m	45	0				0	0,195	0	0	0	0	0	0	0	0
564	m	47	0				0	0,232	0	0	0	0	0	0	0	0
565	m	71	2				1	0,798	1	4	1	0	1	0	0	0
566	m	61	0				0	0,149	0	0	0	0	0	0	0	0
567	w	49	1	2	1	1	1	3,277	1	5	1	0	1	0	1	0
568	w	48	2				0	0,283								
569	w	79	2				1	0,843	1	4	1	0	1	0	0	0
570	w	66	1	2	1	0	1	2,956	1	3	0	0	1	1	0	0
571	m	69	0				0	0,332	0	0	0	0	0	0	0	0
573	m	63	2	1	0		0	0,324								
574	m	74	2				0	0,329								
575	w	36	0				0	0,279	0	0	0	0	0	0	0	0
576	m	39	1	2	1	1	0	0,312	0	0	0	0	0	0	0	0
578	m	25	0				0	0,145	0	0	0	0	0	0	0	0
579	m	37	0				0	0,322	0	0	0	0	0	0	0	0
580	w	81	0				0	0,251	0	0	0	0	0	0	0	0
581	w	58	1	1	1	1	1	2,947	1	4	0	0	1	0	1	1
582	w	55	0				0	0,237	0	0	0	0	0	0	0	0
583	w	31	0				0	0,182	0	0	0	0	0	0	0	0
584	m	56	0				0	0,211	0	0	0	0	0	0	0	0
585	w	45	2	1	0		1	0,593	1	3	0	0	1	0	1	0
586	m	57	0				0	0,174	0	0	0	0	0	0	0	0
587	m	48	0				0	0,337	0	0	0	0	0	0	0	0
588	m	42	0				0	0,184	0	0	0	0	0	0	0	0
589	m	50	2	2	0		1	2,764	1	4	1	0	1	0	0	0
590	m	49	0				0	0,141	0	0	0	0	0	0	0	0
591	m	24	2	1	0		0	0,190								
592	m	57	0				0	0,181	0	0	0	0	0	0	0	0
593	w	82	0				0	0,207	0	0	0	0	0	0	0	0
594	m	43	1	1	2	2	1	1,769	1	4	1	0	1	0	0	0
595	m	69	0				0	0,167	0	0	0	0	0	0	0	0
598	w	65	0				0	0,303	0	0	0	0	0	0	0	0
599	m	75	1	2	1	0	1	0,833	1	2	0	0	1	0	0	0
600	w	50	0				0	0,193	0	0	0	0	0	0	0	0

601	m	47	0				0	0,245	0	0	0	0	0	0	0	0
602	w	79	0				0	0,318	0	0	0	0	0	0	0	0
603	m	20	0				0	0,268	0	0	0	0	0	0	0	0
604	m	34	0				0	0,233	0	0	0	0	0	0	0	0
605	w	49	1	2	1	1	1	3,754	1	4	0	0	1	0	1	1
606	w	47	0				0	0,200	0	0	0	0	0	0	0	0
607	w	45	0				0	0,229	0	0	0	0	0	0	0	0
608	w	31	0				0	0,279	1	3	0	1	0	0	1	0
609	w	62	0				0	0,190	0	0	0	0	0	0	0	0
610	w	39	0				0	0,277	0	0	0	0	0	0	0	0
611	m	23	2	1	0		0	0,187								
612	w	49	2	1	0		0	0,34								
613	w	22	2				1	1,024	1	2	1	0	0	0	0	0
614	w	75	0				0	0,278	0	0	0	0	0	0	0	0
615	w	18	0				1	0,633	0	0	0	0	0	0	0	0
616	w	46	0				0	0,131	0	0	0	0	0	0	0	0
617	m	43	0				0	0,368	0	0	0	0	0	0	0	0
618	m	42	0				1	0,667	1	2	1	0	0	0	0	0
619	w	71	0				0	0,241	0	0	0	0	0	0	0	0
620	m	48	2	1	0		1	2,649	1	2	1	0	0	0	0	0
621	m	41	2	1	0		0	0,309								
622	w	57	2				1	2,422	1	4	1	0	1	0	0	0
623	w	44	0				0	0,460	0	0	0	0	0	0	0	0
624	w	48	0				0	0,276	0	0	0	0	0	0	0	0
625	w	30	0				0	0,310	0	0	0	0	0	0	0	0
626	m	42	0				0	0,216	0	0	0	0	0	0	0	0
627	m	13	0				0	0,172	0	0	0	0	0	0	0	0
628	w	56	0				1	1,141	0	0	0	0	0	0	0	0
629	m	51	0				0	0,307	0	0	0	0	0	0	0	0
630	m	70	0				0	0,334	0	0	0	0	0	0	0	0
631	w	62	0				0	0,440	0	0	0	0	0	0	0	0
632	m	31	1	2	2	0	1	2,809	1	3	0	0	1	0	0	1
633	m	61	2	1	0		0	0,265								
634	w	41	0				0	0,210	0	0	0	0	0	0	0	0
635	w	30	0				0	0,274	0	0	0	0	0	0	0	0
636	w	67	2				1	1,672	1	5	1	0	1	0	1	0
637	w	45	0				0	0,229	0	0	0	0	0	0	0	0
638	w	36	0				0	0,322	0	0	0	0	0	0	0	0
639	w	49	0				0	0,419	0	0	0	0	0	0	0	0
640	m	51	0				0	0,458	0	0	0	0	0	0	0	0
641	w	74	0				0	0,332	0	0	0	0	0	0	0	0
642	w	64	0				0	0,351	0	0	0	0	0	0	0	0
643	m	50	0				1	2,566	1	2	1	0	0	0	0	0
644	w	71	2				1	2,154	1	2	1	0	0	0	0	0
645	m	49	0				0	0,241	0	0	0	0	0	0	0	0
646	m	70	0				0	0,218	0	0	0	0	0	0	0	0
647	m	74	2				0	0,209	0	0	0	0	0	0	0	0
648	w	56	2	1	0		1	2,539	1	4	1	0	1	0	0	0
649	w	40	2	1	0		1	2,155	1	2	1	0	0	0	0	0
650	w	57	0				0	0,356	0	0	0	0	0	0	0	0
651	w	17	2	1	0		0	0,237								

652	w	71	1	2	1	0	1	3,471	1	4	0	0	1	0	1	1
653	m	66	2	1	0		0	0,272								
654	m	52	2				0	0,459								
655	w	69	1	2	1	0	1	3,182	1	3	0	0	1	0	1	0
656	w	53	2	1	0		1	3,843	1	3	0	0	1	0	0	1
657	m	52	1	2	2	0	1	2,042	1	2	0	0	1	0	0	0
658	m	51	2				0	0,452								
659	m	21	0				0	0,188	0	0	0	0	0	0	0	0
660	m	67	0				0	0,252	0	0	0	0	0	0	0	0
661	m	60	2				1	0,879	1	4	1	0	1	0	0	0
662	w	44	0				0	0,335	0	0	0	0	0	0	0	0
663	m	62	0				1	0,596	1	5	1	0	1	0	1	0
664	m	54	0				0	0,259	0	0	0	0	0	0	0	0
665	m	49	2	1	0		0	0,320								
666	m	81	1	3	3	2	1	9,999	1	7	1	0	1	1	1	1
667	w	73	2	1	0		1	0,624	1	2	0	0	1	0	0	0
668	m	56	1	2	1	0	1	3,774	1	4	0	0	1	1	0	1
669	w	42	0				0	0,200	0	0	0	0	0	0	0	0
670	w	29	0				0	0,217	0	0	0	0	0	0	0	0
671	w	60	0				0	0,224	0	0	0	0	0	0	0	0
673	m	32	0				0	0,223	0	0	0	0	0	0	0	0
674	w	19	1	2	1	0	1	9,999	1	6	1	1	1	0	0	0
675	w	60	0				0	0,386	0	0	0	0	0	0	0	0
676	m	30	0				0	0,176	0	0	0	0	0	0	0	0
677	m	54	0				0	0,358	0	0	0	0	0	0	0	0
678	m	39	2	1	0		1	3,681	1	5	1	0	1	0	0	1
679	m	68	0				0	0,401	0	0	0	0	0	0	0	0
680	m	80	2				0	0,376								
681	w	16	2	1	0		0	0,390								
682	m	62	2	1	0		0	0,408								
684	m	62	0				0	0,323	0	0	0	0	0	0	0	0
685	w	75	2				0	0,264								
686	w	57	0				0	0,248	0	0	0	0	0	0	0	0
688	w	70	2	1	0		0	0,285								
689	m	61	0				0	0,267	0	0	0	0	0	0	0	0
690	m	56	1	2	2	0	1	9,999	1	6	1	0	1	1	0	1
691	w	62	2	1	0		0	0,409								
692	m	61	0				0	0,255	0	0	0	0	0	0	0	0
693	w	66	1	1	1	0	1	9,999	1	4	1	0	1	0	0	0
694	w	59	2	1	0		0	0,283								
695	m	49	0				0	0,230	0	0	0	0	0	0	0	0
696	w	85	1	2	2	2	1	3,994	1	5	1	0	1	0	0	1
697	m	78	0				0	0,216	0	0	0	0	0	0	0	0
698	w	25	0				0	0,360	0	0	0	0	0	0	0	0
699	m	56	0				0	0,160	0	0	0	0	0	0	0	0
700	m	38	0				0	0,241	0	0	0	0	0	0	0	0
701	m	23	0				0	0,305	0	0	0	0	0	0	0	0
702	m	36	0				0	0,259	0	0	0	0	0	0	0	0
704	w	63	2	1	0		1	1,974	1	6	1	0	1	0	1	1
705	m	40	2				0	0,413								
706	m	43	0				1	0,880	0	0	0	0	0	0	0	0

707	w	24	2	1	0		0	0,060	0	0	0	0	0	0	0	0
708	w	23	1	2	1	0	1	9,999	1	2	1	0	0	0	0	0
709	m	39	0				0	0,081	0	0	0	0	0	0	0	0
710	w	59	0				1	0,724	0	0	0	0	0	0	0	0
711	w	53	1	2	1	0	1	9,999	1	5	1	0	1	0	1	0
712	m	58	0				0	0,366	0	0	0	0	0	0	0	0
713	m	41	0				0	0,300	0	0	0	0	0	0	0	0
714	m	66	1	2	1	2	1	9,999	1	6	1	0	1	1	0	1
715	m	81	1	2	1	2	1	2,871	1	4	1	1	0	0	0	0
716	m	48	2	1	0		0	0,142	0	0	0	0	0	0	0	0
717	m	56	0				0	0,064	0	0	0	0	0	0	0	0
718	m	28	1	1	1	0	1	0,789	1	3	0	0	1	0	1	0
719	w	63	2	1	0		1	1,876	1	5	1	0	1	0	0	1
720	w	18	1	2	1	3	1	9,999	1	7	1	1	1	0	0	1
721	w	48	0				0	0,268	0	0	0	0	0	0	0	0
722	w	17	0				0	0,302	0	0	0	0	0	0	0	0
723	w	58	0				0	0,297	0	0	0	0	0	0	0	0
724	m	87	2	1	0		0	0,401								
725	w	43	2	1	0		1	1,025	1	2	1	0	0	0	0	0
726	m	56	1	2	1	0	1	3,628	1	4	0	0	1	1	1	0
727	m	70	2	1	0		1	2,800	1	4	1	0	1	0	0	0
728	w	44	2	1	0		0	0,420								
729	w	16	0				1	0,982	0	0	0	0	0	0	0	0
730	m	43	2	1	0		0	0,243								
731	m	43	0				0	0,234	0	0	0	0	0	0	0	0
732	m	69	2	1	0		0	0,379								
734	m	61	0				0	0,313	0	0	0	0	0	0	0	0
735	m	62	2				1	0,638	0	0	0	0	0	0	0	0
736	m	73	2	1	0		0	0,428								
737	w	71	2				1	2,387	1	6	1	0	1	1	1	0
738	w	57	0				0	0,231	0	0	0	0	0	0	0	0
739	m	70	2	1	0		1	2,615	1	6	1	0	1	1	1	0
740	m	49	0				0	0,253	0	0	0	0	0	0	0	0
741	w	72	2	1	0		1	1,058	1	2	0	0	1	0	0	0
742	w	37	0				0	0,365	0	0	0	0	0	0	0	0
743	w	55	1	2	2	0	1	3,940	1	5	1	0	1	0	0	1
744	w	15	2	1	0		0	0,241								
745	m	55	1	2	1	0	1	2,657	1	8	1	1	1	0	1	1
746	w	68	2				1	1,605	1	2	1	0	0	0	0	0
747	m	47	0				0	0,281	0	0	0	0	0	0	0	0
748	w	49	2				0	0,307								
749	m	66	2	1	0		1	0,911	1	6	1	0	1	0	1	1
750	m	68	1	2	2	0	1	9,999	1	7	1	0	1	1	1	1
751	w	58	0				0	0,308	0	0	0	0	0	0	0	0
752	w	67	2	1	0		1	0,750	1	2	1	0	0	0	0	0
753	w	46	1	1	1	2	1	9,999	1	4	1	0	1	0	0	0
754	m	60	0				0	0,066	0	0	0	0	0	0	0	0
756	w	53	2	1	0		0	0,335								
757	w	60	0				0	0,243	0	0	0	0	0	0	0	0
758	m	55	2				1	0,526	1	2	1	0	0	0	0	0
759	m	54	0				0	0,363	1	2	0	0	1	0	0	0

760	w	80	1	1	0	3	1	1,317	1	5	1	0	1	0	1	0
761	w	74	0				0	0,408	0	0	0	0	0	0	0	0
762	m	48	0				1	1,204	1	4	1	0	1	0	0	0
763	m	67	0				0	0,280	2	1	0	0	0	0	1	0
764	m	46	2	1	0		1	3,955	1	4	0	0	1	1	0	1
765	m	53	1			0	0	0,081	1	3	0	0	1	1	0	0
766	w	67	0				0	0,266	0	0	0	0	0	0	0	0
767	m	58	2	1	0		0	0,429								
768	w	41	2	2	0		1	3,970	1	6	1	0	1	0	1	1
769	w	19	0				0	0,221	0	0	0	0	0	0	0	0
770	w	47	0				0	0,083	0	0	0	0	0	0	0	0
771	m	65	1	2	1	0	1	9,999	1	5	1	0	1	1	0	0
772	w	27	0				0	0,227	0	0	0	0	0	0	0	0
773	m	71	1	2	1	0	0	0,273	1	2	0	0	0	0	1	1
774	w	66	0				0	0,274	0	0	0	0	0	0	0	0
775	m	44	0				0	0,232	0	0	0	0	0	0	0	0
776	w	52	0				0	0,340	0	0	0	0	0	0	0	0
777	m	54	0				0	0,305	0	0	0	0	0	0	0	0
778	w	63	0				0	0,347	0	0	0	0	0	0	0	0
779	m	19	1	2	1	0	1	3,990	1	5	1	0	1	0	1	0
780	m	29	0				0	0,292	0	0	0	0	0	0	0	0
781	m	60	2	1	0		1	0,677	1	2	1	0	0	0	0	0
782	m	45	2	1	0		1	0,713	0	0	0	0	0	0	0	0
783	m	48	0				0	0,376	0	0	0	0	0	0	0	0
784	w	41	0				0	0,377	0	0	0	0	0	0	0	0
785	w	74	2	1	0		1	1,146	1	4	1	0	1	0	0	0
786	w	55	1	2	2	1	1	9,999	1	4	1	0	1	0	0	0
787	w	74	2	1	0		0	0,331								
788	m	55	0				0	0,231	0	0	0	0	0	0	0	0
789	m	70	1	1	0	0	1	2,914	1	3	0	0	1	0	0	1
790	m	36	0				1	1,564	1	2	1	0	0	0	0	0
791	w	21	2	1	0		0	0,283								
792	m	63	2	1	0		1	0,934	0	0	0	0	0	0	0	0
793	w	66	2				1	0,577	1	2	1	0	0	0	0	0
794	w	31	0				0	0,360	0	0	0	0	0	0	0	0
795	w	18	0				0	0,301	0	0	0	0	0	0	0	0
796	m	57	0				0	0,242	0	0	0	0	0	0	0	0
797	w	59	2	1	0		1	2,958	1	4	1	1	0	0	0	0
798	w	43	0				0	0,149	0	0	0	0	0	0	0	0
799	w	18	0				0	0,202	0	0	0	0	0	0	0	0
800	w	43	1	2	1	0	1	9,999	1	3	0	0	1	0	0	1
801	w	50	1	2	1	0	1	3,843	1	5	1	0	1	0	0	1
802	m	33	2	1	0		1	0,779	1	2	1	0	0	0	0	0
803	w	62	2				0	0,249	0	0	0	0	0	0	0	0
804	m	39	2	1	0		0	0,154								
805	w	28	0				0	0,178	0	0	0	0	0	0	0	0
806	w	43	0				0	0,219	0	0	0	0	0	0	0	0
807	m	64	2	1	0		1	0,350	0	0	0	0	0	0	0	0
808	w	43	2	1	0		0	0,197								
809	w	29	0				0	0,164	0	0	0	0	0	0	0	0
810	w	32	1	2	2	0	1	9,999	1	5	1	0	1	0	1	0

811	w	52	1	1	1	0	1	3,410	1	3	0	0	1	0	0	1
812	w	60	2	1	0		1	0,481	1	2	1	0	0	0	0	0
813	w	69	0				0	0,140	0	0	0	0	0	0	0	0
814	w	65	0				0	0,121	0	0	0	0	0	0	0	0
815	w	46	0				0	0,221	0	0	0	0	0	0	0	0
816	w	18	0				0	0,175	0	0	0	0	0	0	0	0
817	m	52	1	2	1	0	0	0,333	2	1	0	0	0	0	1	0
818	m	34	0				0	0,240	0	0	0	0	0	0	0	0
819	w	62	1	3	3	0	1	3,998	1	7	1	1	1	1	0	0
820	m	58	2				1	0,887	1	2	1	0	0	0	0	0
821	w	46	0				0	0,136	0	0	0	0	0	0	0	0
822	m	81	1	2	2	1	1	9,999	1	5	1	0	1	0	0	1
823	w	75	1	3	3	2	1	0,248	1	5	1	0	1	0	1	0
824	m	58	0				0	0,144	0	0	0	0	0	0	0	0
825	m	71	2				1	0,573	0	0	0	0	0	0	0	0
826	w	77	2				0	0,229								
827	w	45	2	1	0		0	0,160								
828	w	37	2	1	0		0	0,143								
829	m	43	1	2	2	0	1	2,690	1	5	1	0	1	0	0	1
830	w	35	0				1	0,508	1	2	1	0	0	0	0	0
831	w	53	0				0	0,151	0	0	0	0	0	0	0	0
832	w	32	2	1	0		1	0,783	1	2	1	0	0	0	0	0
833	m	71	0				0	0,153	0	0	0	0	0	0	0	0
834	w	45	0				0	0,182	0	0	0	0	0	0	0	0
835	m	73	0				0	0,145	0	0	0	0	0	0	0	0
836	w	67	0				0	0,158	0	0	0	0	0	0	0	0
837	w	39	0				0	0,209	2	1	0	0	0	0	1	0
838	w	53	2				1	0,507	1	2	1	0	0	0	0	0
839	w	78	1	1	1	0	1	3,560	1	3	0	0	1	1	0	0
840	w	65	2	1	0		0	0,161								
841	m	28	0				0	0,225	0	0	0	0	0	0	0	0
842	m	29	2	1	0		0	0,175								
843	m	43	0				0	0,168	0	0	0	0	0	0	0	0
844	m	38	1	2	1	0	1	2,226	1	3	1	0	0	0	1	0
845	w	86	1	2	2	3	1	9,999	1	5	1	0	1	0	1	0
846	w	42	1	3	3	0	1	2,796	1	9	1	1	1	1	1	1
847	w	43	2	1	0		0	0,156								
848	w	42	2	1	0		1	1,971	1	4	1	0	0	0	1	1
849	w	56	0				0	0,147	0	0	0	0	0	0	0	0
850	w	70	0				0	0,135	2	1	0	0	0	0	1	0
851	m	54	2	1	0		0	0,179								
852	m	50	2	1	0		0	0,131								
853	w	79	2				1	0,354	0	0	0	0	0	0	0	0
854	w	70	2	1	0		0	0,180								
855	w	57	1	2	2	0	1	3,802	1	4	1	0	1	0	0	0
856	w	48	2	1	0		1	0,430	1	2	1	0	0	0	0	0
857	m	59	2	1	0		1	0,779	1	2	1	0	0	0	0	0
858	w	54	0				0	0,160	0	0	0	0	0	0	0	0
859	w	52	0				0	0,142	0	0	0	0	0	0	0	0
860	m	65	1	3	3	2	1	3,962	1	7	1	1	1	0	1	0
861	w	20	0				0	0,144	0	0	0	0	0	0	0	0

862	w	72	0				0	0,168	0	0	0	0	0	0	0	0
863	m	58	2	1	0		1	1,040	1	4	1	0	1	0	0	0
864	w	52	0				0	0,177	0	0	0	0	0	0	0	0
865	w	41	1	3	2	0	1	3,966	1	5	1	0	1	0	0	1
866	m	23	2	1	0		0	0,142								
867	m	59	0				0	0,136	0	0	0	0	0	0	0	0
868	m	48	0				0	0,163	0	0	0	0	0	0	0	0
869	w	41	0				0	0,150	0	0	0	0	0	0	0	0
870	w	54	2	1	0		1	2,438	1	4	1	0	1	0	0	0
871	w	69	0				0	0,291	0	0	0	0	0	0	0	0
873	m	33	0				0	0,161	0	0	0	0	0	0	0	0
874	w	56	1	1	1	0	0	0,314	1	3	0	0	1	0	1	0
875	w	48	1	2	1	0	0	0,226	1	5	1	0	1	0	0	1
877	w	70	1	2	2	2	0	0,095	1	6	1	0	1	1	0	1
878	w	65	2	1	0		0	0,185								
880	w	60	0				0	0,084	0	0	0	0	0	0	0	0
881	w	60	2				0	0,061								
882	m	54	2				0	0,092								
883	w	57	0				0	0,322	0	0	0	0	0	0	0	0
885	w	65	1	2	1	0	1	2,845	1	6	1	0	1	0	1	1
886	w	62	0				0	0,104	0	0	0	0	0	0	0	0
887	w	55	0				0	0,215	0	0	0	0	0	0	0	0
888	m	63	2	1	0		0	0,084								
889	m	56	0				0	0,108	0	0	0	0	0	0	0	0
890	w	20	0				0	0,302	0	0	0	0	0	0	0	0
891	w	70	2				0	0,123								
892	w	22	0				0	0,147	0	0	0	0	0	0	0	0
893	w	72	2	1	0		1	1,252	1	2	1	0	0	0	0	0
894	w	16	2	1	0		0	0,016								
895	w	66	0				0	0,086	0	0	0	0	0	0	0	0
896	m	26	1	2	2	0	1	3,123	1	3	0	0	1	0	0	1
897	w	62	1	2	1	0	1	0,689	1	3	0	0	1	1	0	0
898	m	56	2				0	0,087	0	0	0	0	0	0	0	0
899	w	60	1	2	1	0	0	0,321	1	2	1	0	0	0	0	0
900	w	70	1	3	1	1	0	0,113	1	9	1	1	1	1	1	1
902	m	57	2	1	0		0	0,183								
903	m	69	2	1	0		1	1,063	1	4	1	0	1	0	0	0
904	m	47	1	2	1	0	1	2,406	1	7	1	0	1	1	1	1
907	w	65	0				1	2,328	0	0	0	0	0	0	0	0
908	w	59	0				0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
909	m	64	0				0	0,109	0	0	0	0	0	0	0	0
910	w	60	0				0	0,056	0	0	0	0	0	0	0	0
911	m	68	2				0	0,153								
912	m	63	0				0	0,135	0	0	0	0	0	0	0	0
913	w	46	2	1	0		1	3,235	1	2	1	0	0	0	0	0
914	w	18	0				0	0,146	0	0	0	0	0	0	0	0
915	m	47	2	1	0		0	0,04								
916	m	46	2				1	1,207	1	2	1	0	0	0	0	0
917	w	68	2	1	0		0	0,077								
918	m	35	2	1	0		0	0,133								
919	w	68	0				0	0,075	0	0	0	0	0	0	0	0

920	w	69	2	1	0		0	0,051								
922	m	39	0				0	0,055	0	0	0	0	0	0	0	0
923	m	55	1	2	1	0	0	0,079	1	4	1	0	1	0	0	0
924	w	74	1	1	1	0	0	0,242	1	3	0	0	1	0	1	0
925	w	43	0				0	0,059	0	0	0	0	0	0	0	0
926	w	57	0				0	0,067	0	0	0	0	0	0	0	0
927	m	17	0				0	0,362	0	0	0	0	0	0	0	0
928	m	43	1	2	1	0	0	0,16	1	2	1	0	0	0	0	0
929	w	59	2	1	0		0	0,079								
930	w	39	1	3	3	0	1	2,715	1	6	1	1	1	0	0	0
932	m	64	0				0	0,035	0	0	0	0	0	0	0	0
933	w	44	0				0	0,057	0	0	0	0	0	0	0	0
934	m	45	0				0	0,132	0	0	0	0	0	0	0	0
935	m	29	1	2	2	0	0	0,219	1	9	1	1	1	1	1	1
936	m	66	2	1	0		0	0,169								
937	m	28	0				0	0,069	0	0	0	0	0	0	0	0
938	m	83	2	1	0		0	0,104								
939	w	55	2	1	0		1	1,332	1	2	1	0	0	0	0	0
940	w	53	2	1	0		0	0,08								
941	m	74	1	2	1	0	1	1,945	1	5	1	0	1	0	0	1
942	m	68	2	1	0		0	0,113								
943	w	46	1	2	1	0	0	0,296	1	4	0	0	1	1	0	1
944	m	63	0				0	0,107	0	0	0	0	0	0	0	0
945	m	78	2	1	0		0	0,149								
946	m	68	2	2	0		0	0,085								
947	m	49	2	1	0		0	0,054								
948	w	67	2	1	0		0	0,137								
949	w	54	0				0	0,041	0	0	0	0	0	0	0	0
950	w	75	0				0	0,093	0	0	0	0	0	0	0	0
951	m	70	0				0	0,249	0	0	0	0	0	0	0	0
952	m	68	2				1	1,318	1	2	1	0	0	0	0	0
953	m	62	0				0	0,129	0	0	0	0	0	0	0	0
954	w	41	1	2	1	0	0	0,033	1	7	1	1	1	0	0	1
955	m	46	2	1	0		0	0,02								
956	w	74	0				0	0,045	0	0	0	0	0	0	0	0
957	w	62	0				0	0,048	0	0	0	0	0	0	0	0
958	m	55	0				0	0,143	0	0	0	0	0	0	0	0
959	w	25	0				0	0,084	0	0	0	0	0	0	0	0
960	w	69	0				0	0,175	1	2	1	0	0	0	0	0
961	w	49	2	1	0		0	0,122								
962	w	54	0				0	0,037	0	0	0	0	0	0	0	0
963	m	27	0				0	0,154	0	0	0	0	0	0	0	0
964	w	20	0				1	0,759	0	0	0	0	0	0	0	0
965	w	49	1	2	1	2	1	1,623	1	9	1	1	1	1	1	1
966	m	70	0				0	0,271	0	0	0	0	0	0	0	0
967	w	40	1	2	2	0	1	2,26	1	2	1	0	0	0	0	0
968	w	53	2				0	0,88								
969	w	71	2	1	0		1	2,451	0	0	0	0	0	0	0	0
970	w	72	2				1	3,39	0	0	0	0	0	0	0	0
971	w	58	2	1	0		1	1,106	0	0	0	0	0	0	0	0
972	w	52	2	1	0		0	0,009								

973	m	28	0				0	0,007	0	0	0	0	0	0	0	0
974	w	32	0				0	0,161	0	0	0	0	0	0	0	0
975	m	50	1	2	1	0	0	0,001	1	4	0	0	1	0	1	1
976	w	76	0				0	0,062	0	0	0	0	0	0	0	0
977	w	51	1	2	1	0	1	2,502	1	3	0	0	1	0	0	1
978	w	36	1	3	2	0	0	0,186	1	5	1	1	0	0	1	0
979	w	66	0				0	0,083	1	2	1	0	0	0	0	0
980	w	65	0				0	0,095	0	0	0	0	0	0	0	0
981	w	32	0				0	0,173	0	0	0	0	0	0	0	0
982	m	55	2	1	0		0	0,096								
983	m	43	2	1	0		1	1,866	0	0	0	0	0	0	0	0
984	m	52	0				0	0,058	0	0	0	0	0	0	0	0
985	m	74	2				0	0,247								
986	m	58	2				0	0,065								
987	w	61	2	1	0		0	0,011								
988	m	42	2	1	0		1	3,156	1	8	1	1	1	0	1	1
989	w	21	0				1	3,327	1	2	1	0	0	0	0	0
990	w	63	2	1	0		0	0,134								
991	w	59	2				0	0,153	0	0	0	0	0	0	0	0
992	w	80	2	1	0		1	3,541	0	0	0	0	0	0	0	0
993	m	61	1	2	2	0	0	0,159	1	4	1	0	1	0	0	0
994	m	29	0				0	0,267	0	0	0	0	0	0	0	0
995	m	62	0				0	0,065	0	0	0	0	0	0	0	0
996	m	67	2				1	2,245	0	0	0	0	0	0	0	0
997	w	59	2	1	0		1	1,914	1	4	1	0	1	0	0	0
998	w	75	2	1	0		0	0,1								
999	m	50	1	2	1	0	1	1,919	1	2	0	0	1	0	0	0
1000	w	39	0				0	0,228	0	0	0	0	0	0	0	0
1001	m	50	0				0	0,082	0	0	0	0	0	0	0	0
1002	w	64	2				0	0,163								
1003	w	59	0				0	0,19	0	0	0	0	0	0	0	0
1004	w	64	2				0	0,09								
1005	w	42	1	2	2	0	1	3,016	1	7	1	1	1	1	0	0
1006	w	58	2	1	0		0	0,223								
1007	w	51	0				0	0,058	0	0	0	0	0	0	0	0
1008	m	56	2	1	0		1	1,031	1	3	1	0	0	0	1	0
1009	w	67	1	2	2	0	0	0,202	1	5	1	0	1	0	1	0
1010	m	55	0				0	0,063	0	0	0	0	0	0	0	0
1011	w	56	2	1	0		0	0,059								
1012	w	24	0				1	1,18	0	0	0	0	0	0	0	0
1013	m	57	2	1	0		0	0,127								
1014	w	48	0				0	0,316	0	0	0	0	0	0	0	0
1015	m	39	0				1	3,276	0	0	0	0	0	0	0	0
1016	w	48	2	1	0		1	1,171	0	0	0	0	0	0	0	0
1017	w	22	0				0	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0
1018	w	40	0				0	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0
1019	w	71	2	1	0		0	0,072								
1020	m	72	0				0	0,252	0	0	0	0	0	0	0	0
1021	w	29	0				0	0,072	0	0	0	0	0	0	0	0
1022	w	54	1	2	1	0	1	3,36	1	4	1	0	1	0	0	0
1023	w	70	0				1	2,257	0	0	0	0	0	0	0	0

1024	w	27	2		0		0	0,068								
1025	m	45	1	2	1	0	0	0,102	1	3	1	0	0	0	1	0
1026	w	61	0				0	0,103	0	0	0	0	0	0	0	0
1027	w	34	2	1	0		0	0,168	0	0	0	0	0	0	0	0
1028	w	27	2				0	0,082	0	0	0	0	0	0	0	0
1029	m	73	2	1	0		0	0,103								
1030	m	44	0				0	0,091	0	0	0	0	0	0	0	0
1031	w	47	2				1	1,173	1	4	1	0	1	0	0	0
1032	m	37	0				0	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0
1033	w	35	1	2	2	3	1	3,504	1	3	1	0	0	0	1	0
1034	m	43	0				0	0,075	0	0	0	0	0	0	0	0
1035	w	43	0				1	0,702	0	0	0	0	0	0	0	0
1036	m	77	2	1	0		0	0,13								
1037	w	44	0				0	0,182	0	0	0	0	0	0	0	0
1038	m	70	0				0	0,192	0	0	0	0	0	0	0	0
1039	w	64	2	1	0		0	0,111								
1040	m	36	1	2	1	0	0	0,087	0	0	0	0	0	0	0	0
1041	m	74	0				0	0,039	1	3	1	0	0	1	0	0
1042	m	50	0				0	0,076	0	0	0	0	0	0	0	0
1043	m	60	0				0	0,292	0	0	0	0	0	0	0	0
1044	m	69	2	1	0		0	0,286								
1045	w	51	1	2	1	0	0	0,114	1	3	0	0	1	0	1	0
1046	w	73	0				0	0,055	0	0	0	0	0	0	0	0
1047	w	61	2				0	0,088								
1048	w	53	0				0	0,207	0	0	0	0	0	0	0	0
1049	m	27	0				0	0,06	0	0	0	0	0	0	0	0
1050	m	18	0				0	0,119	0	0	0	0	0	0	0	0
1051	m	55	0				0	0,055	0	0	0	0	0	0	0	0
1052	w	16	0	1	0		0	0,331	0	0	0	0	0	0	0	0
1053	w	51	2				1	0,931	1	3	1	0	0	0	1	0
1054	m	60	0				0	0,072	0	0	0	0	0	0	0	0
1055	w	50	2	1	0		0	0,064								
1056	w	68	2	1	0		0	0,159								
1057	w	64	2				1	3,299	1	7	1	1	1	0	1	0
1058	w	53	2	1	0		0	0,137								
1059	w	59	1	2	2	0	1	2,749	1	6	1	0	1	0	1	1
1060	w	17	0				0	0,101	0	0	0	0	0	0	0	0
1061	w	55	1	2	1	0	1	3,265	1	5	1	0	1	0	0	1
1062	w	55	0				0	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0
1063	w	59	2	1	0		1	1,019	1	4	1	0	1	0	0	0
1064	w	62	2	1	0		0	0,063								
1065	m	56	0				0	0,18	0	0	0	0	0	0	0	0
1066	m	54	0				0	0,061	0	0	0	0	0	0	0	0
1067	w	21	0				0	0,062	0	0	0	0	0	0	0	0
1068	w	21	0				0	0,118	0	0	0	0	0	0	0	0
1069	m	46	0				0	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0
1070	w	42	0				0	0,019	1	2	1	0	0	0	0	0
1071	m	59	0				0	0,145	0	0	0	0	0	0	0	0
1072	w	78	1	1	1	0	1	2,34	1	2	1	0	0	0	0	0
1073	m	67	2	1	0		0	0,353								
1074	m	56	0				0	0,019	0	0	0	0	0	0	0	0

1075	w	43	2	1	0		1	2,641	1	4	1	0	1	0	0	0
1077	m	39	2				1	0,717	1	4	1	0	1	0	0	0
1078	m	60	0				0	0,066	0	0	0	0	0	0	0	0
1079	m	57	1	2	2	0	1	3,05	1	7	1	1	1	1	0	0
1080	w	15	0				0	0,063	0	0	0	0	0	0	0	0
1081	w	66	2				1	0,49	1	2	0	0	1	0	0	0
1082	w	66	0				0	0,116	1	2	0	0	1	0	0	0
1083	w	68	2				0	0,349								
1084	w	67	1	2	2	0	1	2,931	1	5	1	0	1	1	0	0
1085	w	20	1	2	1	0	0	0,118	1	2	0	0	0	0	1	1
1086	m	36	2	1	0		0	0,122								
1087	w	17	0				0	0,087	0	0	0	0	0	0	0	0
1088	m	23	0				0	0,181	0	0	0	0	0	0	0	0
1089	w	59	2	1	0		0	0,106								
1090	m	49	0				0	0,066	0	0	0	0	0	0	0	0
1091	m	20	0				0	0,077	0	0	0	0	0	0	0	0
1093	w	49	2	1	0		1	1,37	1	2	0	0	1	0	0	0
1094	w	61	0				0	0,059	0	0	0	0	0	0	0	0
1095	m	26	1	2	0	0	1	3,256	1	4	1	0	1	0	0	0
1096	w	42	0				0	0,121	0	0	0	0	0	0	0	0
1097	w	18	0				0	0,135	0	0	0	0	0	0	0	0
1098	w	62	1	2	2	0	1	2,079	1	6	1	0	1	0	1	1
1099	m	48	0				0	0,094	0	0	0	0	0	0	0	0
1100	w	54	0				0	0,126	0	0	0	0	0	0	0	0
1101	m	66	2	1	0		1	0,543	1	2	1	0	0	0	0	0
1102	w	32	0				0	0,082	0	0	0	0	0	0	0	0
1103	m	57	0				0	0,287	0	0	0	0	0	0	0	0
1104	m	72	0				0	0,178	0	0	0	0	0	0	0	0
1105	w	58	0				0	0,248	0	0	0	0	0	0	0	0
1106	w	70	2				0	0,179								
1108	w	40	0				1	2,143	1	2	1	0	0	0	0	0
1109	w	41	0				0	0,108	0	0	0	0	0	0	0	0
1110	w	77	0				0	0,246	0	0	0	0	0	0	0	0
1111	w	29	0				0	0,155	0	0	0	0	0	0	0	0
1112	w	46	0				0	0,075	0	0	0	0	0	0	0	0
1113	w	18	0				0	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0
1114	w	81	2	1	0		1	0,632	1	2	1	0	0	0	0	0
1115	m	25	0	1	0		0	0,067	0	0	0	0	0	0	0	0
1116	m	63	1	2	1	0	1	2,946	1	8	1	1	1	1	0	1
1117	m	78	2	1	0		1	0,888	1	4	1	0	1	0	0	0
1118	m	70	2				0	0,317								
1119	w	63	0				0	0,081	0	0	0	0	0	0	0	0
1120	w	56	2				0	0,189								
1121	w	87	0				0	0,219	0	0	0	0	0	0	0	0
1122	m	73	0				0	0,095	0	0	0	0	0	0	0	0
1123	m	50	0				0	0,095	0	0	0	0	0	0	0	0
1124	m	71	1	2	2	0	1	1,32	1	3	0	0	1	0	0	1
1125	w	81	2	1	0		1	0,55	1	5	1	0	1	0	1	0
1126	w	55	0				0	0,108	0	0	0	0	0	0	0	0
1127	w	64	0				0	0,173	0	0	0	0	0	0	0	0
1128	w	41	0				0	0,091	0	0	0	0	0	0	0	0

1129	w	55	1	2	2	2	1	1,622	1	5	1	0	1	0	0	1
1130	w	37	2	1	0		0	0,095								
1131	m	51	1	2	2	0	1	2,185	1	3	0	0	1	0	1	0
1132	w	52	0				0	0,091	0	0	0	0	0	0	0	0
1133	w	31	2	1	0		0	0,075								
1134	m	57	0				0	0,068	0	0	0	0	0	0	0	0
1135	w	47	1	1	1	0	0	0,066	0	0	0	0	0	0	0	0
1136	m	77	2				0	0,338								
1137	m	48	1	2	1	2	1	3,31	1	9	1	1	1	1	1	1
1138	m	54	0				0	0,132	0	0	0	0	0	0	0	0
1139	w	22	0				0	0,053	0	0	0	0	0	0	0	0
1140	m	44	1	2	2	0	1	1,935	1	6	1	0	1	0	1	1
1141	m	54	0				0	0,022	0	0	0	0	0	0	0	0
1142	m	53	0				0	0,114	0	0	0	0	0	0	0	0
1143	m	48	0				0	0,349	1	2	1	0	0	0	0	0
1144	w	47	0				0	0,075	0	0	0	0	0	0	0	0
1145	m	60	0				0	0,069	0	0	0	0	0	0	0	0
1146	w	23	0				0	0,207	0	0	0	0	0	0	0	0
1147	w	84	2	1	0		1	1,877	0	0	0	0	0	0	0	0
1148	m	74	2	2	0		1	2,548	1	4	0	0	1	1	1	0
1149	m	56	0				0	0,056	0	0	0	0	0	0	0	0
1150	m	60	2				0	0,159								
1151	w	31	2	1	0		0	0,049								
1152	w	46	0				0	0,082	0	0	0	0	0	0	0	0
1153	m	72	0				0	0,122	0	0	0	0	0	0	0	0
1154	m	65	2	2	0		1	1,779	1	2	0	0	1	0	0	0
1155	w	27	0				0	0,109	0	0	0	0	0	0	0	0
1156	m	19	0				0	0,112	0	0	0	0	0	0	0	0
1157	w	24	1	1	1	0	1	0,985	1	3	0	0	1	0	1	0
1158	m	47	1	2	1	0	1	2,302	1	4	0	0	1	1	0	1
1159	w	51	0				0	0,246	0	0	0	0	0	0	0	0
1160	w	46	0				0	0,096	0	0	0	0	0	0	0	0
1161	w	60	0				0	0,17	0	0	0	0	0	0	0	0
1162	w	23	0				0	0,152	0	0	0	0	0	0	0	0
1164	m	73	1	2	1	0	0	0,342	1	2	0	0	1	0	0	0
1165	m	83	1	2	1	0	1	3,15	1	7	1	0	1	1	1	1
1166	w	45	1	1	1	0	1	3,283	1	4	0	0	1	0	1	1
1167	m	18	0				0	0,066	0	0	0	0	0	0	0	0
1168	w	49	0				0	0,116	0	0	0	0	0	0	0	0
1169	m	64	0				0	0,083	0	0	0	0	0	0	0	0
1170	m	71	0				0	0,108	0	0	0	0	0	0	0	0
1171	w	38	0				0	0,093	0	0	0	0	0	0	0	0
1172	w	39	0				0	0,124	0	0	0	0	0	0	0	0
1173	w	58	2				1	3,071	1	3	1	0	0	0	1	0
1174	w	39	2	1	0		0	0,164								
1175	w	50	0				0	0,077	0	0	0	0	0	0	0	0
1176	m	55	1	2	1	2	1	2,767	1	4	1	0	1	0	0	0
1177	w	58	2	1	0		1	1,409	1	2	1	0	0	0	0	0
1178	m	63	1	2	3	0	1	2,597	1	5	0	0	1	1	1	1
1179	w	67	1	1	2	2	1	2,885	1	4	1	0	1	0	0	0
1180	w	23	0				0	0,102	0	0	0	0	0	0	0	0

1181	w	38	2				1	1,783	1	4	1	0	1	0	0	0
1182	m	50	0				0	0,144	0	0	0	0	0	0	0	0
1183	m	57	2	1	0		1	0,799	1	2	1	0	0	0	0	0
1184	m	52	1	1	1	0	1	3,209	1	4	0	0	1	1	1	0
1185	m	42	0				0	0,105	0	0	0	0	0	0	0	0
1186	m	20	0				0	0,137	0	0	0	0	0	0	0	0
1187	w	56	0				0	0,246	0	0	0	0	0	0	0	0
1188	m	52	1	2	1	0	1	3,246	1	6	1	0	1	0	1	1
1189	m	56	0				0	0,065	0	0	0	0	0	0	0	0
1190	m	19	2	1	0		0	0,058								
1191	w	80	2				1	2,221	1	2	1	0	0	0	0	0
1192	m	69	2				0	0,359								
1193	m	56	0				0	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0
1194	m	37	2	1	0		1	1,558	1	3	1	0	0	0	1	0
1195	w	32	0				0	0,207	0	0	0	0	0	0	0	0
1196	m	70	1	2	1	0	1	3,485	1	8	1	1	1	1	0	1
1197	w	70	1	2	1	0	1	3,405	1	4	0	0	1	0	1	1
1198	m	44	0				0	0,338	0	0	0	0	0	0	0	0
1199	m	73	0				0	0,084	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	m	41	1	2	2	0	1	3,302	1	5	1	0	1	0	1	0
1201	w	46	1	2	1	0	1	1,306	1	2	0	0	1	0	0	0
1202	w	51	2	1	0		0	0,297								
1203	w	68	0				0	0,049	0	0	0	0	0	0	0	0
1204	w	66	1	3	3	2	1	0,54	1	3	1	0	0	1	0	0
1205	w	28	1	2	2	0	0	0,375	1	3	0	0	1	0	1	0
1206	w	73	0				0	0,106	0	0	0	0	0	0	0	0
1207	w	51	0				0	0,065	0	0	0	0	0	0	0	0
1208	m	22	0				0	0,074	0	0	0	0	0	0	0	0
1209	w	45	2	1	0		0	0,327								
1210	m	48	0				0	0,161	0	0	0	0	0	0	0	0
1211	m	41	0				0	0,095	0	0	0	0	0	0	0	0
1212	w	77	2				0	0,394								
1213	m	47	1	2	1	0	1	1,213	1	3	1	0	0	0	1	0
1214	m	61	2	1	0		0	0,077								
1215	w	43	0				0	0,066	0	0	0	0	0	0	0	0
1216	m	77	1	2	1	0	1	0,613	1	2	0	0	1	0	0	0
1217	w	50	0				0	0,083	0	0	0	0	0	0	0	0
1218	m	35	1	2	2	0	1	0,987	1	2	0	0	1	0	0	0
1219	w	47	2	1	0		0	0,097								
1220	m	83	2	1	0		0	0,218								
1221	m	50	0				0	0,089	0	0	0	0	0	0	0	0
1222	w	57	0				1	0,577	0	0	0	0	0	0	0	0
1223	w	63	2	1	0		1	1,245	1	2	1	0	0	0	0	0
1224	w	41	2	1	0		1	0,858	1	2	1	0	0	0	0	0
1225	m	58	0				0	0,054	0	0	0	0	0	0	0	0
1226	m	43	1	2	2	0	1	3,349	1	7	1	1	1	0	1	0
1227	w	71	2				1	0,369	1	2	1	0	0	0	0	0
1229	m	56	0				1	0,676	1	2	1	0	0	0	0	0
1230	m	70	0				0	0,331	1	2	1	0	0	0	0	0
1231	w	46	0				0	0,076	0	0	0	0	0	0	0	0
1232	w	66	0				0	0,068	0	0	0	0	0	0	0	0

1233	w	53	0				0	0,055	0	0	0	0	0	0	0	0
1234	m	56	2	1	0		1	1,345	1	2	1	0	0	0	0	0
1235	m	48	0				0	0,047	0	0	0	0	0	0	0	0
1236	m	52	2	1	0		1	0,687	1	5	1	0	1	0	1	0
1237	m	75	0				0	0,312	0	0	0	0	0	0	0	0
1238	w	37	0		0		0	0,061	0	0	0	0	0	0	0	0
1239	m	58	0				0	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0
1240	w	71	2				1	0,597	1	2	1	0	0	0	0	0
1241	w	61	0				0	0,091	0	0	0	0	0	0	0	0
1242	w	64	2	1	0		1	2,921	1	2	1	0	0	0	0	0
1243	m	42	2	1	0		1	1,879	1	2	1	0	0	0	0	0
1244	w	74	2	1	0		1	2,23	1	6	1	0	1	1	1	0
1245	w	40	1	2	2	0	1	1,518	1	2	1	0	0	0	0	0
1246	m	51	2				0	0,083								
1247	m	69	2	1	0		0	0,068								
1248	w	45	0				0	0,069	0	0	0	0	0	0	0	0
1249	w	55	0				0	0,054	0	0	0	0	0	0	0	0
1250	w	41	2	1	0		1	2,532	1	2	1	0	0	0	0	0
1251	m	32	2	1	0		0	0,081								
1252	m	80	2	1	0		1	0,564	1	2	1	0	0	0	0	0
1253	w	38	0				0	0,081	0	0	0	0	0	0	0	0
1254	m	75	2				0	0,217								
1255	w	62	0				1	1,58	1	2	1	0	0	0	0	0
1256	w	57	2	1	0		0	0,097								
1257	m	48	0				0	0,066	0	0	0	0	0	0	0	0
1258	m	75	0				0	0,052	0	0	0	0	0	0	0	0
1259	m	65	2				1	1,44	1	2	1	0	0	0	0	0
1260	w	35	1	2	2	0	1	1,703	1	3	0	0	1	0	1	0
1261	m	40	1			0	1	0,795	1	2	0	0	1	0	0	0
1262	m	51	2				0	0,339								
1263	w	72	2				0	0,119								
1264	m	70	2				0	0,036								
1265	w	22	2	1	0		0	0,109								
1266	w	55	1	2	1	0	1	3,079	1	6	1	1	1	0	0	0
1268	w	70	2				1	0,379	1	2	1	0	0	0	0	0
1269	w	29	2	1	0		0	0,361								
1270	w	54	0				0	0,052	0	0	0	0	0	0	0	0
1271	w	51	2	1	0		1	0,514	1	2	1	0	0	0	0	0
1272	w	75	0				0	0,058	0	0	0	0	0	0	0	0
1273	m	35	0				0	0,074	0	0	0	0	0	0	0	0
1274	m	57	2	1	0		1	0,585	1	2	0	0	1	0	0	0
1275	w	70	2				0	0,241								
1276	w	25	0				0	0,094	0	0	0	0	0	0	0	0
1277	w	82	2	1	0		0	0,058								
1278	m	20	2	1	0		0	0,068								
1279	m	66	1	2	1	0	1	3,159	1	8	1	1	1	1	1	0
1280	w	70	0				0	0,048	0	0	0	0	0	0	0	0
1281	m	70	0				0	0,072	0	0	0	0	0	0	0	0
1282	m	54	0				0	0,061	0	0	0	0	0	0	0	0
1283	w	87	2	1	0		0	0,058								
1284	w	21	2	1	0		0	0,059								

1285	m	30	2	1	0		0	0,146								
1286	w	66	0				1	0,539	1	3	1	0	0	1	0	0
1287	w	28	2	1	0		0	0,109								
1288	w	42	1	2	2	2	1	3,213	1	6	1	0	1	0	1	1
1289	w	60	2	2	0		1	0,761	1	2	1	0	0	0	0	0
1290	m	59	0				0	0,165	0	0	0	0	0	0	0	0
1291	m	57	0				0	0,072	0	0	0	0	0	0	0	0
1292	w	49	0				0	0,079	0	0	0	0	0	0	0	0
1293	w	43	0				0	0,138	0	0	0	0	0	0	0	0
1294	w	61	1	2	1	0	1	1,737	1	7	1	1	1	1	0	0
1295	m	44	0				0	0,057	0	0	0	0	0	0	0	0
1296	m	61	2	1	0		1	0,642	1	5	1	0	1	0	1	0
1297	w	26	0				0	0,159	0	0	0	0	0	0	0	0
1298	w	58	1	2	2	4	1	2,456	1	4	1	0	1	0	0	0
1299	m	57	2	1	0		1	0,827	1	4	1	0	1	0	0	0
1300	w	68	2	1	0		1	1,441	1	4	1	0	1	0	0	0
1301	m	74	1	3	2	0	1	1,794	1	4	1	0	1	0	0	0
1302	m	60	0				0	0,096	0	0	0	0	0	0	0	0
1303	m	33	0				0	0,053	0	0	0	0	0	0	0	0
1304	w	30	0				0	0,076	0	0	0	0	0	0	0	0
1305	w	38	1	2	1	2	1	2,601	1	8	1	1	1	0	1	1
1306	m	64	0				0	0,063								
1307	w	40	1	3	2	0	1	3,062	1	5	1	0	1	0	1	0
1308	m	48	0				0	0,035								
1309	m	62	0				0	0,066								
1310	m	21	1	2	1	0	1	1,963	1	4	1	0	1	0	0	0
1311	w	58	0				0	0,047								
1312	m	41	2				1	1,939	1	5	1	0	1	0	1	0
1313	w	61	2	1	0		1	1,104	1	2	0	0	1	0	0	0
1314	m	66	0				0	0,142								
1315	m	37	2				0	0,064								
1316	w	68	2				1	1,038	1	2	1	0	0	0	0	0
1317	m	56	2	1	0		1	0,403	1	2	1	0	0	0	0	0
1318	w	55	2	1	0		1	2,004	1	5	1	0	1	0	1	0
1320	m	81	1	1	1	0	1	0,828	1	5	1	0	1	0	0	1
1321	w	40	0				0	0,077								
1322	m	38	1	1	1	0	1	2,85	1	3	0	0	1	0	0	1
1323	w	56	0				0	0,07								
1324	w	78	2	1	0		0	0,036								
1325	w	56	0				0	0,052								
1326	w	50	1	2	2	0	1	2,762	1	5	1	0	1	0	1	0
1327	w	42	0				0	0,105								
1328	m	71	0				0	0,151								
1329	m	46	2	1	0		1	0,964	1	2	1	0	0	0	0	0
1330	m	56	0				0	0,071								
1331	w	73	1	2	1	0	1	1,839	1	5	1	0	1	0	1	0
1332	m	48	0				0	0,042								
1333	w	50	2	1	0		0	0,297								
1334	w	30	0				0	0,065								
1335	m	30	0				0	0,065								
1336	w	66	0				0	0,054								

1337	m	50	0				0	0,055								
1338	m	34	0				0	0,049								
1339	m	45	0				0	0,153								
1340	m	68	2	1	0		0	0,066								
1341	w	22	0				0	0,078								
1342	m	47	0				0	0,068								
1343	w	52	2	1	0		1	0,565	1	3	0	0	1	0	1	0
1344	m	41	0				0	0,039								
1345	m	72	0				0	0,128								
1346	w	61	2	1	0		1	2,618	1	7	1	1	1	0	1	0
1347	w	50	2				1	0,495	1	3	1	0	0	0	1	0
1348	w	40	1	2	3	3	1	1,891	1	6	1	0	1	1	0	1
1349	w	53	2	1	0		0	0,213								
1350	m	48	2				0	0,102								
1351	w	80	0				0	0,199								
1352	m	73	1	2	2	3	1	2,029	1	4	1	0	1	0	0	0
1353	m	50	1	2	1	0	1	2,084	1	6	1	0	1	0	1	1
1354	m	44	0				0	0,064								
1355	m	15	0				0	0,127								
1356	m	47	0				0	0,083								
1357	w	59	0				0	0,097								
1358	w	40	1	2	1	0	1	3,406	1	6	1	0	1	1	0	1
1359	m	59	0				0	0,178								
1360	w	49	0				0	0,07								
1361	m	53	1	2	1	2	1	2,909	1	4	0	0	1	1	1	0
1362	w	69	2				1	0,551	1	4	1	0	1	0	0	0
1363	w	75	2	1	0		0	0,253								
1364	w	50	2	1	0		1	2,043	1	3	1	0	0	1	0	0
1365	m	11	0				0	0,198								
1366	w	75	2	1	0		1	0,522	1	3	0	0	1	0	1	0
1367	w	37	2				1	1,605	1	3	1	0	0	0	1	0
1368	m	55	0				0	0,054								
1369	m	60	1	2	1	2	1	2,667	1	6	1	0	1	1	0	1
1370	w	60	0				0	0,059								
1371	w	52	2	1	0		0	0,058								
1372	m	76	0				0	0,295								
1373	w	69	1	1	1	0	1	2,799	1	4	0	0	1	1	0	1
1374	w	22	2	1	0		0	0,079								
1375	w	70	0				0	0,113								
1376	w	61	1	2	1	0	1	1,457	1	5	1	0	1	0	1	0
1377	w	86	0				1	0,448	1	2	1	0	0	0	0	0
1378	w	73	2				1	0,552	1	2	1	0	0	0	0	0
1380	w	77	0				0	0,076								
1381	w	40	0				0	0,037								
1382	w	73	2				1	0,385	1	2	1	0	0	0	0	0
1383	w	49	0				0	0,051								
1384	m	24	0				0	0,017								
1385	m	50	2	1	0		0	0,068								
1386	w	31	0				0	0,093								
1387	w	56	2	1	0		0	0,199								
1388	m	71	2				0	0,16								

1389	w	15	0				0	0,072								
1390	w	49	2	1	0		1	1,566	1	2	1	0	0	0	0	0
1391	m	87	2	1	0		0	0,035								
1392	m	33	0				0	0,072								
1393	m	39	0				0	0,1								
1394	m	58	0				0	0,055								
1395	m	72	2	1	0		0	0,121								
1396	w	63	2	1	0		0	0,145								
1397	w	42	0				0	0,098								
1398	w	38	0				0	0,139								
1399	w	17	0				0	0,096								
1400	w	47	2				0	0,108								
1401	m	76	2	1	0		1	0,829	1	3	0	0	1	0	1	0
1402	w	60	0				0	0,1								
1403	m	75	2				0	0,197								
1404	w	33	1	2	2	0	1	2,582	1	6	1	0	1	0	1	1
1405	m	45	2	1	0		1	0,51	1	2	0	0	1	0	0	0
1406	m	59	2	1	0		1	1,37	1	5	1	0	1	0	1	0
1407	w	71	2	1	0		1	0,913	1	3	0	0	1	0	1	0
1408	m	68	2	2	0		1	0,381	1	2	1	0	0	0	0	0
1409	m	73	0				0	0,281								
1410	m	22	0				0	0,072								
1411	w	74	2	1	0		1	2,095	1	2	1	0	0	0	0	0
1412	m	43	1	2	1	0	1	3,185	1	5	1	0	1	1	0	0
1413	w	45	0				0	0,09								
1414	m	53	0				0	0,088								
1415	w	76	2	2	0		0	0,085								
1416	w	34	2				0	0,181								
1417	w	37	0				0	0,046								
1418	m	44	0				0	0,21								
1419	w	72	0				0	0,159								
1420	w	41	2	1	0		0	0,046								
1421	m	54	1	2	3	2	1	2,817	1	4	1	0	1	0	0	0
1422	m	37	1	2	2	3	1	1,108	1	5	1	0	1	0	0	1
1423	m	50	2				0	0,343								
1424	m	45	0				0	0,142								
1425	w	65	2				0	0,253								
1426	w	56	0				0	0,085								
1427	w	51	2	1	0		0	0,227								
1428	w	51	0				0	0,099								
1429	w	84	1	3	2	0	1	2,821	1	6	1	1	1	0	0	0
1430	m	70	0				1	0,83	1	4	1	0	1	0	0	0
1431	w	45	0				0	0,096								
1432	m	58	0				0	0,068								
1433	w	40	0				0	0,241								
1434	m	44	1	2	1	0	1	1,143	1	2	0	0	1	0	0	0
1435	m	53	2	1	0		1	0,794	1	3	1	0	0	1	0	0
1436	w	71	1	1	2	0	1	2,19	1	5	0	0	1	1	1	1
1437	w	32	2	1	0		1	0,92	1	3	1	0	0	0	1	0
1438	m	35	1	1	1	2	1	1,346	1	6	1	0	1	0	1	1
1439	w	67	0				0	0,134								

1440	m	47	2				0	0,199								
1441	m	79	1	2	2	0	1	2,901	1	6	1	0	1	0	1	1
1442	w	81	1	2	1	1	1	3,113	1	4	1	0	1	0	0	0
1443	w	49	0				0	0,139								
1444	m	48	2	1	0		1	0,592	1	6	1	1	1	0	0	0
1445	m	43	2	1	0		0	0,119								
1446	m	62	0				0	0,066								
1447	w	30	2	1	0		1	2,085	1	2	1	0	0	0	0	0
1448	m	19	0				0	0,051								
1449	w	53	0				0	0,068								
1450	w	60	0				0	0,257								
1451	w	33	0				0	0,076								
1452	m	61	0				0	0,134								
1453	m	58	0				0	0,045								
1454	m	44	2	2	0	3	1	2,633	1	8	1	1	1	1	1	0
1455	m	67	1	2	1	0	1	2,112	1	4	0	0	1	1	1	0
1456	w	33	2	1	0		0	0,077								
1457	m	76	2				0	0,094								
1458	m	44	2	1	0		1	0,589	1	4	1	0	1	0	0	0
1459	w	46	0				0	0,226								
1460	w	30	0				0	0,096								
1461	m	63	0				0	0,089								
1462	w	53	0				0	0,133								
1463	w	59	1	1	1	0	1	1,858	1	5	1	0	1	0	0	1
1464	m	54	0				0	0,058								
1465	w	38	0				0	0,068								
1466	m	52	0				0	0,107								
1467	m	41	2	1	0		0	0,116								
1468	m	49	0				0	0,072								
1469	m	68	0				0	0,148								
1470	m	71	2				0	0,174								
1471	m	36	0				0	0,063								
1472	w	45	0				0	0,057								
1473	m	50	0				0	0,219								
1474	w	55	2	1	0		1	2,232	1	5	1	0	1	0	1	0
1475	w	57	2		0		0	0,051								
1476	m	47	0				0	0,087								
1477	w	34	1	2	1	0	0	0,205	1	3	0	1	0	0	1	0
1478	w	78	0				0	0,069								
1479	m	58	2	1	0		1	1,122	1	5	1	0	1	0	0	1
1480	w	70	0				1	0,28	0	0	0	0	0	0	0	0
1481	m	56	1	2	2	0	1	2,619	1	4	0	0	1	1	0	1
1482	m	61	0				0	0,106								
1483	m	17	1	2	1	0	1	1,572	1	2	1	0	0	0	0	0
1484	m	60	2	1	0		0	0,082								
1485	w	36	2	1	0		1	0,32	1	2	0	0	0	1	1	0
1486	w	29	0				0	0,207								
1488	w	55	0				0	0,089								
1489	w	62	0				0	0,077								
1490	m	56	2				1	0,278	2	1	0	0	0	0	1	0
1491	m	56	0				0	0,174								

1492	m	55	0				0	0,121								
1493	m	52	0				0	0,184								
1494	m	48	0				0	0,103								
1495	w	48	2				1	0,366	0	0	0	0	0	0	0	0
1496	m	63	0				0	0,149								
1497	m	26	1	2	1	2	1	2,324	1	6	1	0	1	1	0	1
1498	m	50	0				0	0,093								
1499	w	81	0				0	0,081								
1500	w	51	0				0	0,13								
1501	m	59	0				0	0,109								
1502	w	44	2				1	0,39	1	2	1	0	0	0	0	0
1503	w	46	0				0	0,103								
1504	m	33	0				0	0,133								
1505	w	63	2	1	0		1	0,493	0	0	0	0	0	0	0	0
1506	w	71	1	2	1	1	1	3,101	1	4	1	0	1	0	0	0
1507	m	78	2	1	0		1	3,085	1	6	1	0	1	1	1	0
1508	w	55	2	1	0		0	0,107								
1509	w	67	2	1	0		0	0								
1510	m	17	1	1	1	0	0	0,092	0	0	0	0	0	0	0	0
1511	m	68	2				0	0,001								
1512	w	55	2	1	0		0	0,04								
1513	w	63	1	2	2	0	1	2,888	1	6	1	0	1	1	1	0
1514	w	58	0				0	0,032								
1515	w	69	0				0	0,205								
1516	w	76	2	1	0		0	0,173								
1517	m	88	2	1	0		0	0,073								
1518	w	50	2				0	0,218								
1519	w	61	0				0	0,078								
1520	m	49	2				0	0,116								
1521	w	59	0				1	0,365	1	2	1	0	0	0	0	0
1522	m	54	0				0	0,071								
1523	w	41	2	1	0		0	0,029								
1524	m	52	2	1	0		1	0,394	1	2	1	0	0	0	0	0
1525	w	69	2	1	0		1	0,397	1	2	1	0	0	0	0	0
1526	m	20	0				0	0,038								
1527	w	52	0				0	0,144								
1528	m	48	0				0	0,076								
1530	w	32	1	2	2	0	1	3,179	1	2	1	0	0	0	0	0
1531	w	32	0				0	0,062								
1532	w	43	0				0	0,184								
1533	w	49	2	1	0		2	0,29	1	4	1	0	1	0	0	0
1534	w	48	1	1	0	0	1	0,394	1	3	0	0	1	0	1	0
1535	w	66	1	2	1	0	2	0,32	1	4	1	0	1	0	0	0
1536	w	66	0				0	0,061								
1537	w	72	2				1	0,36	1	2	1	0	0	0	0	0
1539	m	37	2	1	0		0	0,215								
1540	w	40	1	2	1	0	1	1,29	1	4	1	0	1	0	0	0
1541	w	66	2	1	0		0	0,095								
1542	w	47	0				1	0,376	1	3	0	0	1	0	1	0
1543	m	53	1	2	1	3	1	1,601	1	4	1	0	0	1	1	0
1544	w	56	0				0	0,082								

1545	w	53	0				0	0,054								
1546	m	70	0				0	0,168								
1547	w	86	2				0	0,093								
1548	m	26	0				0	0,075								
1549	w	72	0				0	0,184								
1550	w	71	0				0	0,052								
1551	m	44	2	1	0		1	3,24	1	3	0	0	1	0	0	1
1552	m	26	0				0	0,088								
1553	w	40	1	1	1	0	1	2,213	1	4	0	0	1	1	0	1
1554	m	79	0				1	0,42	1	2	0	0	1	0	0	0
1555	m	35	2	1	0		0	0,095								
1556	w	48	1	2	1	0	1	3,045	1	7	1	1	1	0	0	1
1557	w	47	2				1	0,532	1	2	1	0	0	0	0	0
1558	w	42	1	2	1	0	2	0,329	1	3	0	0	1	0	1	0
1559	w	45	2				1	0,927	1	2	1	0	0	0	0	0
1560	m	33	2	1	0		1	0,399	1	3	1	0	0	0	1	0
1561	m	26	0				0	0,075								
1562	m	54	0				0	0,242								
1563	w	63	1	2	1	2	1	3,373	1	4	1	0	1	0	0	0
1564	m	64	2	1	0		0	0,051								
1565	w	49	0				0	0,086								
1566	w	70	0				0	0,237								
1567	m	40	0				0	0,093								
1568	m	66	1	2	3	0	1	1,338	1	3	0	0	1	1	0	0
1569	w	70	0				0	0,057								
1570	m	65	0				0	0,064								
1571	w	49	0				0	0,251								
1572	w	55	0				0	0,064								
1573	w	40	2				1	1,639	1	2	1	0	0	0	0	0
1574	w	32	0				0	0,071								
1575	w	70	2	1	0		1	0,466	1	2	1	0	0	0	0	0
1576	m	66	1	2	1	0	0	0,127	0	0	0	0	0	0	0	0
1578	m	60	2	1	0		1	0,439	0	0	0	0	0	0	0	0
1579	w	68	1	1	1	2	1	2,876	1	5	1	0	1	0	0	1
1580	w	34	2	1	0		0	0,119								
1581	w	71	2	1	0		1	0,85	1	4	1	0	1	0	0	0
1582	m	43	0				0	0,07								
1583	m	49	2	1	0		0	0,146								
1584	m	46	1	2	1	0	1	0,806	1	2	0	0	1	0	0	0
1585	w	76	0				0	0,247								
1586	m	55	2				1	2,062	1	2	1	0	0	0	0	0
1587	m	39	0				0	0,071								
1588	m	69	2	1	0		1	0,672	1	2	1	0	0	0	0	0
1589	w	59	2				0	0,057								
1590	w	48	1	1	2	3	1	1,966	1	8	1	1	1	1	0	1
1591	w	45	0				0	0,114								
1592	w	72	2	2	0		0	0,233								
1593	m	77	2				2	0,284	1	3	0	0	1	0	1	0
1594	m	36	0				0	0,126								
1595	w	23	0				0	0,14								
1596	m	83	2	1	0		0	0,079								

1597	m	41	0				0	0,059								
1598	m	45	0				0	0,045								
1599	w	22	2	1	0		0	0,071								
1600	w	71	0				0	0,217								
1601	m	55	0				0	0,101								
1602	w	62	0				0	0,077								
1603	m	70	2	1	0		1	0,752	1	3	0	0	1	1	0	0
1604	m	31	0				0	0,092								
1605	w	31	0				0	0,047								
1606	m	62	1	2	2	2	1	3,281	1	6	1	0	1	0	1	1
1607	w	75	2	1	0		1	0,428	1	2	0	0	1	0	0	0
1608	w	41	2	1	0		0	0,261								
1609	m	61	1	1	1	0	1	0,961	1	3	0	0	1	1	0	0
1610	m	71	2	1	0		1	1,008	1	2	0	0	1	0	0	0
1611	m	29	0				0	0,127								
1612	m	26	0				0	0,192								
1613	m	42	2	1	0		0	0,086								
1614	w	20	0				0	0,083								
1615	m	67	2	1	0		2	0,325	1	2	1	0	0	0	0	0
1616	m	68	0				0	0,129								
1617	w	74	2				0	0,086								
1618	m	23	0				0	0,071								
1619	w	52	0				0	0,082								
1620	m	81	0				0	0,092								
1621	m	54	1	2	1	0	1	0,391	1	2	0	0	1	0	0	0
1622	m	53	0				0	0,086								
1623	m	70	0				0	0,076								
1624	m	31	1	2	1	0	1	3,362	1	8	1	1	1	0	1	1
1625	w	49	1	1	1	0	1	2,878	1	5	1	0	1	0	0	1
1626	w	70	2				1	0,539	1	2	1	0	0	0	0	0
1627	w	37	2	2	0		0	0,314								
1628	m	70	2	1	0		1	0,511	1	3	0	0	1	0	0	1
1629	m	48	0				0	0,081								
1630	w	73	2	1	0		0	0,094								
1631	w	54	2	1	0		1	0,406	1	4	1	0	1	0	0	0
1632	m	57	1	1	1	2	1	0,972	1	4	1	0	1	0	0	0
1633	w	26	0				0	0,113								
1634	w	52	0				0	0,099								
1635	w	40	2	1	0		0	0,101								
1636	w	75	2	1	0		1	1,996	1	4	1	0	1	0	0	0
1637	m	26	1	2	1	0	1	2,379	1	6	1	0	1	0	1	1
1638	m	56	0				0	0,098								
1639	m	60	2	1	0		0	0,067								
1640	w	60	2	1	0		1	1,417	1	5	1	0	1	1	0	0
1641	w	30	2	1	0		0	0,131								
1642	w	59	0				0	0,149								
1643	w	51	0				0	0,107								
1644	w	54	1	2	1	0	1	3,129	1	6	1	0	1	0	1	1
1645	w	84	2	1	0		0	0,175								
1646	m	30	2	1	0		0	0,103								
1647	w	53	0				0	0,14								

1649	m	59	2				0	0,127								
1650	w	75	2	1	0		1	0,663	1	4	0	0	1	0	1	1
1651	w	49	2		0		0	0,094								
1652	w	54	2	1	0		1	0,518	1	5	1	0	1	0	1	0
1653	m	67	2	1	0		1	0,451	1	2	0	0	1	0	0	0
1654	w	71	2				0	0,105								
1655	w	59	2	1	0		0	0,064								
1656	m	72	0				0	0,2								
1658	w	26	0				0	0,073								
1659	m	53	1	1	1	3	1	2,456	1	5	1	0	1	1	0	0
1660	m	38	1	2	1	0	1	3,055	1	6	1	0	1	0	1	1
1661	w	40	0				0	0,181								
1662	w	63	1	2	2	0	1	1,7	1	4	1	0	1	0	0	0
1663	m	37	2	1	0		0	0,092								
1664	m	30	2				0	0,08								
1665	m	51	2	1	0		1	2,414	1	4	1	0	1	0	0	0
1667	w	67	2	1	0		0	0,232								
1668	w	38	1	2	1	0	1	2,534	1	4	1	0	1	0	0	0
1669	m	22	0				1	1,055	1	2	1	0	0	0	0	0
1670	w	74	2	1	0		1	0,52	1	5	1	0	1	1	0	0
1671	m	49	2				0	0,319								
1672	m	26	2				0	0,096								
1673	m	53	1	2	2	0	1	0,483	1	3	0	0	1	1	0	0
1674	w	15	0				0	0,11								
1675	w	70	2	1	0		1	1,199	1	4	1	0	1	0	0	0
1676	w	74	2	1	0		0	0,223								
1677	m	82	2	1	0		1	1,293	1	2	1	0	0	0	0	0
1678	m	35	1	2	2	0	1	1,753	1	5	1	0	1	0	0	1
1679	w	70	2				1	1,981	1	4	1	0	1	0	0	0
1680	w	53	2	1	0		0	0,148								
1681	m	37	0				0	0,098								
1682	w	19	0				0	0,072								
1683	m	71	0				0	0,23								
1684	m	29	2	1	0		1	2,389	1	3	1	0	0	0	1	0
1685	m	38	0				0	0,081								
1686	w	50	0				0	0,09								
1687	w	52	0				0	0,133								
MRI0 03	m	59	0				0	0,189								
MRI0 09	w	19	0				0	0,203	0	0	0	0	0	0	0	0
MRI0 11	w	33	0				0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0
MRI0 13	w	41	2				0	0,242								
MRI0 15	m	41	2	1		4	1	1,664	1	8	1	1	1	0	1	1
P001	m	19	0				0	0,135	0	0	0	0	0	0	0	0
P002	w	25	0				0	0,116	0	0	0	0	0	0	0	0
P003	w	25	0				0	0,192	0	0	0	0	0	0	0	0
P004	m	73	0				0	0,155								
P005	w	27	1	2	2	1	1	2,503	1	5	1	0	1	0	0	1
P006	w	23	0				0	0,067	0	0	0	0	0	0	0	0
P008	m	34	1	2	2	0	1	1,439	1	2	1	0	0	0	0	0

P009	w	61	1	2	2	3	1	2,739	1	8	1	1	1	0	1	1
P010	w	76	1	2	1	0	1	2,248	1	5	0	0	1	1	1	1
P011	w	43	0				0	0,13								
P012	m	69	0				0	0,09								
P013	w	66	0				1	0,989	1	6	1	0	1	0	1	1
P014	w	43	0				0	0,159								
P015	w	59	0				0	0,213								
P016	w	70	1	2	1	0	1	2,52	1	4	0	0	1	0	1	1
P017	m	54	1	2	2	0	1	2,117	1	7	0	1	1	1	1	1
P018	m	63	1			4	1	3,062	1	7	1	1	1	0	0	1
P019	w	54	1	2	3	0	1	2,33	1	3	0	0	1	0	0	1
P020	w	63	2	2	2		1	0,752	1	6	1	0	1	0	1	1
P021	w	61	1	3	3	2	1	2,427	1	5	1	0	1	0	0	1
P022	w	32	0				0	0,123	0	0	0	0	0	0	0	0
P023	w	47	0				0	0,254								
P024	m	42	0				0	0,114								
P025	m	59	2				0	0,134	0	0	0	0	0	0	0	0
P026	w	20	0				0	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0
P027	w	34	0				0	0,191	0	0	0	0	0	0	0	0
P028	w	79	2				1	0,428	1	2	1	0	0	0	0	0
P029	w	63	0				0	0,096								
P030	m	48	0				0	0,077								
P031	w	66	0		1		1	0,523	1	2	1	0	0	0	0	0
P032	w	45	0				1	0,683	1	2	1	0	0	0	0	0
P033	w	22	2		1		1	1,195	1	2	1	0	0	0	0	0
P034	m	32	0				0	0,076	0	0	0	0	0	0	0	0
P035	m	60	0				0	0,099								
P036	m	58	0				0	0,085								
P037	w	63	0				0	0,315								
P038	m	34	1	2	2	0	1	2,191	1	6	0	1	1	0	1	1
P039	m	52	1	3	2	0	1	2,087	1	5	0	0	1	1	1	1
P040	m	52	1	3	3	1	1	1,113	1	7	1	1	1	0	0	1
P041	w	30	0				0	0,112	0	0	0	0	0	0	0	0
P042	m	61	0				1	0,521	1	3	1	0	0	0	0	1
P043	m	42	0				0	0,183								
P044	w	58	0				0	0,284								
P045	w	55	2				0	0,321	1	2	1	0	0	0	0	0
P046	m	46	1	3	2	1	1	0,43	1	3	1	0	0	0	0	1
P047	w	66	1			0	0	0,231	1	2	1	0	0	0	0	0
P049	m	69	1	2	2	3	1	3,268	1	8	1	1	1	1	0	1
P050	w	55	0				0	0,092	0	0	0	0	0	0	0	0
P051	w	66	1	3	3	2	1	2,618	1	6	1	0	1	1	0	1
P052	m	68	1	2	1	0	1	2,985	1	5	1	0	1	0	0	1
P053	w	22	1	2	1	3	1	3,314	1	6	1	0	1	0	1	1
P054	w	61	0				1	0,679	1	4	0	0	1	0	1	1
P055	m	43	0				0	0,106								
P056	w	53	0				0	0,294								
P058	w	28	1	1	1	0	1	1,441	1	6	1	0	1	0	1	1
P059	m	48	1	2	2	0	1	3,331	1	5	1	0	1	1	0	0
P060	m	42	0				0	0,148								
P061	m	44	0				0	0,098								

P062	w	48	1	2	1	0	1	1,456	1	4	0	0	1	1	1	0
P063	w	51	0				1	1,52	1	5	1	0	1	0	1	0
P064	w	20	0				0	0,106	0	0	0	0	0	0	0	0
P065	w	42	1	2	2	2	1	2,14	1	9	1	1	1	1	1	1
P066	w	74	0				0	0,163								
P067	w	28	0				0	0,084	0	0	0	0	0	0	0	0
P068	m	71	0				0	0,266								
P069	w	45	0				0	0,307								
P070	m	52	0				0	0,208								
P071	w	78	1	2	1	0	0	0,103	1	3	0	0	0	1	1	1
P072	w	69	0				0	0,084								
P073	m	21	1	3	2	2	1	2,813	1	6	1	0	1	0	1	1
P074	w	33	0				0	0,094	0	0	0	0	0	0	0	0
P075	m	72	1	3	3	4	1	2,577	1	8	1	1	1	0	1	1
P076	w	28	0				0	0,12	0	0	0	0	0	0	0	0
P077	m	47	0				0	0,214								
P078	w	31	0				0	0,086	0	0	0	0	0	0	0	0
P079	w	49	1	2	1	0	0	0,091	2	1	0	0	0	0	1	0
P080	m	29	1	2	1	0	1	3,054	1	7	1	0	1	1	1	1
P081	m	25	0				0	0,122	0	0	0	0	0	0	0	0
P082	m	55	2				0	0,272	1	4	1	0	1	0	0	0
P083	w	19	0				0	0,131	0	0	0	0	0	0	0	0
P084	w	26	0				0	0,096	0	0	0	0	0	0	0	0
P085	m	58	1	2		1	1	3,277	1	4	1	0	1	0	0	0
P086	w	60	0				0	0,264								
P087	w	41	2	1	0		1	2,243	1	5	1	0	1	0	0	1
P088	w	66	0				0	0,079								
P089	w	20	1	2	1	0	1	0,424	1	4	0	0	1	0	1	1
P090	m	32	0				0	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0
P091	m	20	2				1	2,107	1	5	1	0	1	0	1	0
P092	m	72	0				0	0,142								
P093	m	44	0				0	0,071								
P094	w	41	0				0	0,141								
P095	m	46	0				0	0,099								
P096	m	35	0				0	0,101	0	0	0	0	0	0	0	0
P097	m	46	0				1	1,881	1	8	1	1	1	0	1	1
P098	w	26	0				0	0,128	0	0	0	0	0	0	0	0
P099	w	28	0				0	0,184	0	0	0	0	0	0	0	0
P100	m	46	0				0	0,09								
P101	m	69	0				0	0,056								
P102	m	30	0				0	0,167	0	0	0	0	0	0	0	0
P103	w	63	0				0	0,078								
P104	m	36	1	3	2	0	1	1,442	1	4	0	0	1	1	0	1
P105	w	27	0				0	0,079	0	0	0	0	0	0	0	0
P106	m	70	2				0	0,15	1	2	0	0	1	0	0	0
P107	w	56	1	3	2	0	1	3,22	1	9	1	1	1	1	1	1
P108	w	55	1	2	1	0	1	3,049	1	3	0	0	1	0	1	0
P109	w	37	0				0	0,102	0	0	0	0	0	0	0	0
P110	w	64	0				0	0,07								
P111	w	35	0				0	0,167	0	0	0	0	0	0	0	0
P112	w	46	2				0	0,11	0	0	0	0	0	0	0	0

P113	m	36	1	2	1	0	1	1,55	1	4	1	0	1	0	0	0
P114	w	59	0				0	0,262								
P115	m	35	1			0	1	2,356	1	6	0	1	1	0	1	1
P116	m	36	0				0	0,114	0	0	0	0	0	0	0	0
P117	m	68	2				1	1,188	1	5	1	0	1	0	0	1
P118	m	41	0				0	0,086								
P119	w	46	0				0	0,159								
P120	w	31	0				0	0,102	0	0	0	0	0	0	0	0
P121	w	35	2				1	0,596	1	2	0	0	1	0	0	0
P122	w	52	0				0	0,149								
P123	m	34	2				1	0,916	1	2	1	0	0	0	0	0
P124	m	68	1	3	2	0	1	2,651	1	5	1	0	1	0	0	1
P125	m	69	1	1	0	0	1	3,265	1	5	1	0	1	0	1	0
P126	m	71	0				0	0,117								
P127	w	49	0				0	0,187								
P128	w	68	0				0	0,101								
P129	w	66	1	3	1	1	1	3,15	1	4	0	0	1	1	1	0
P130	m	41	1	1	0	0	1	1,586	1	2	1	0	0	0	0	0
P131	w	42	0				0	0,064								
P132	w	53	0				0	0,202								
P133	m	44	0				0	0,071								
P134	w	68	1	2	3	0	1	3,251	1	5	1	0	1	1	0	0
P135	m	63	1	2	1	0	1	2,92	1	6	1	0	1	0	1	1
B1	m	46	1	2	2	0	1	2,529	1	5	0	0	1	1	1	1
B4	m	74	1	2	2	2	1	0,623	1	6	1	0	1	1	0	1
B8	w	80	1	2	1	0	1	0,955	1	4	0	0	1	1	0	1
B21	m	57	1	2	1	0	1	0,564	1	5	0	0	1	1	1	1
B23	w	62	1	2	1	0	1	1,643	1	4	1	0	1	0	0	0
B26	w	69	1	2	2	0	1	2,492	1	6	1	0	1	0	1	1
B33	m	49	1	2	2	2	1	0,754	1	6	1	1	1	0	0	0
B35	m	55	1	2	2	0	1	2,181	1	4	0	0	1	0	1	1
B45	m	74	1	2	1	1	1	1,775	1	6	1	0	1	1	0	1
1107	w	76	1	1	2	0	1	0,66	1	4	1	0	1	0	0	0

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Markus Gerhard, der meine wissenschaftliche Dissertation mit großem Engagement unterstützt und mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Forschungsgruppe zu arbeiten. Er hatte stets ein offenes Ohr für meine Anliegen und trug mit seinen wertvollen Ratschlägen maßgeblich zu dem Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. med. Dirk H. Busch, Leiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München, möchte ich für die Möglichkeit an seinem Institut zu forschen, herzlich Danken.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dipl.-Ing. Luca Formichella bedanken. Er stand mir während meiner Zeit im Labor mit seinem Wissen und seinen technischen Fertigkeiten mit Rat und Tat zur Seite.

Auch den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Gerhard sowie des Instituts danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit.

Weiterhin danken möchte ich Herrn Dr. med. Berndt Birkner, PD Dr. med. Michael Vieth und Dr. med. Michael Geppert für Ihre Unterstützung.

Schließlich danke ich meinen Eltern, ohne die mein Studium und diese Doktorarbeit niemals möglich gewesen wären, sowie meiner Schwester für die aufbauenden Worte und die vielen Anregungen. Meinem Freund danke ich für die immerwährende Unterstützung. Ohne deine Geduld, unermüdlichen Aufmunterungen und Hilfe hätte diese Arbeit nicht vollendet werden können.