

**Nachweis verschiedener *Chlamydiaceae* - Spezies
aus Rachenspülwasser- Proben von
Patienten mit einer nachgewiesenen
ambulant erworbenen Pneumonie**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich - Schiller - Universität Jena

von Peer Heinz
geboren am 26. Juli 1978 in Bad Langensalza

Gutachter:

1. Prof. Dr. Eberhard Straube, Jena
2. Prof. Dr. Gert E. Hein, Bad Kösen
3. Prof. Dr. Andreas Essig, Ulm

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.04.2014

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	3
2	Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	5
3	Zusammenfassung	7
4	Einleitung	9
4.1	Chlamydien	9
4.1.1	Taxonomie	9
4.1.2	Biologie der Chlamydien	10
4.1.3	Pathogenität der einzelnen Chlamydienspezies	12
4.2	Simkania negevensis	18
4.3	CapNetz und Probenherkunft	20
4.4	DNA - Mikroarraytechnik	20
5	Zielstellung der Arbeit	25
6	Methodik	26
6.1	Prinzip des Untersuchungsverfahrens	26
6.2	DNA - Isolation	27
6.3	Screeningverfahren	27
6.3.1	realtime - PCR Protokoll Chlamydiaceae	28
6.3.2	realtime - PCR Protokoll Simkania	30
6.4	Micro - Array - PCR	31
6.4.1	allgemeines Protokoll Micro- Array- PCR	31
6.4.2	Primer für Micro - Array - PCR Protokoll Chlamydiaceae	32
6.4.3	Primer für Micro - Array - PCR Protokoll Simkania negevensis	32
6.5	Gelelektrophorese	33
6.6	Array - Tube - Test (AT-Test)	33
6.6.1	Micro- Array- Hybridisierung	34
6.6.2	Auswertung der Mikroarray - Tests	36
6.7	Sequenzierung	37
6.8	Statistische Methoden	38
7	Ergebnisse	39
7.1	Ergebnisüberblick	39
7.2	Ausgewählte Einzelproben	42
7.3	DNA-Sequenzierungen	47

7.4	Verteilung der Häufigkeit von positiven Proben auf die einzelnen Zentren des CAP-Netz	49
8	Diskussion	51
8.1	Chlamydia - like - Organismen sind bei Pneumoniepatienten weit verbreitet.	51
8.2	Ist Simkania negevensis ein neuer Erreger respiratorischer Infektionen beim Menschen?	52
8.3	Der ArrayTube-Test ist eine gute Möglichkeit Mischinfektionen zu diagnostizieren.....	55
8.4	Ist Simkania negevensis ein prädisponierender Faktor für respiratorische Infektionen beim Menschen?	55
8.5	Wo ist <i>Cp. pneumoniae</i> ?	55
9	Schlussfolgerungen	57
10	Anhang.....	58
10.1	Literaturverzeichnis	58
10.2	Danksagung	63
10.3	Ehrenwörtliche Erklärung	64
10.4	Lebenslauf.....	65
10.5	tabellarische Gesamtübersicht aller bearbeiteten Proben	67

2 Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abkürzungen

AT	Array - Tube
C.	Chlamydia
CAP	community acquired pneumonia (ambulant erworbene Pneumonie)
COPD	chronic obstructive pulmonary disease (chronisch obstructive Lungenerkrankung)
MOMP	engl. major outer membrane protein
KHK	koronare Herzkrankheit
P.	Parachlamydia
PCR	Polymerasekettenreaktion
rt-PCR	Real - Time - Polymerasekettenreaktion
S.	Simkania
SSC	saline sodium citrate
SSPE	Hybridisierungspuffer (EDTA, NaH ₂ PO ₄ und NaCl)

Abbildungen

Abb. 4.1	Stammbaum Chlamydiales (Horn et al.. 2000)
Abb. 4.2	Vermehrungszyklus der Chlamydien
Abb 4.3	Abbildung des „most variable Window“
Abb 4.4	schematische Darstellung der Arbeitsschritte des AT- CHIP
Abb 6.1	schematischer Ablauf der Probenbearbeitung
Abb 7.1	Gesamtergebnis <i>Chlamydiaceae</i>
Abb 7.2	Berechnung Konfidenzintervall
Abb 7.3	Verteilung der einzelnen Spezies
Abb 7.4	Verteilung Rein- und Mischinfektion
Abb 7.5	Grafische Darstellung Realtime - PCR Protokoll Chlamydiaceae - Probe 1530
Abb 7.6	Grafische Darstellung Realtime - PCR Protokoll Simkania – Probe 1530
Abb 7.7	Grafische Darstellung des AT - CHIP - Probe 1530 (Teil A) und Photo der zentralen Einheit - Probe 1530 (Teil B)

- Abb 7.8 Grafische Darstellung Realtime - PCR Protokoll Chlamydiaceae - Probe 262
- Abb 7.9 Grafische Darstellung Realtime - PCR Protokoll Simkania - Probe 262
- Abb 7.10 Grafische Darstellung des AT - CHIP - Probe 262 (Teil A) und Photo der zentralen Einheit - Probe 262 (Teil B)
- Abb 7.11 Grafische Darstellung Realtime - PCR Protokoll Chlamydiaceae - *Probe 344*
- Abb 7.12 Grafische Darstellung Realtime - PCR Protokoll Simkania - *Probe344*
- Abb 7.13 Grafische Darstellung des AT-CHIP - Probe 344 (Teil A) und Photo der zentralen Einheit - Probe 344 (Teil B)

Tabellen

- Tabelle 4.1 Durch den CHIP differenzierbare Chlamydiales - Spezies
- Tabelle 6.1 Pipettierschema Realtime - PCR Protokoll Chlamydiaceae
- Tabelle 6.2 Pipettierschema Realtime - PCR Protokoll Simkania
- Tabelle 7.1 Gesamtergebnis
- Tabelle 7.2 Verteilung der einzelnen Spezies
- Tabelle 7.3 Gesamtergebnis Einzelspezies
- Tabelle 7.4 Übersicht der sequenzierten Proben
- Tabelle 7.5 Verteilung der Häufigkeit von positiven Proben
- Tabelle 8.1 Ergebnisübersicht der Arbeit von Karin Multauf
- Tabelle 8.2 Ergebnisübersicht der Arbeit von Julia Herrmann

3 Zusammenfassung

Nachweis verschiedener *Chlamydiaceae* - Spezies aus Rachenspülwässern von Patienten mit einer nachgewiesenen ambulant erworbenen Pneumonie

Infektionen des Respirationstraktes spielen in der Humanmedizin eine große Rolle. Chlamydien werden dabei als Pathogene des Respirationstraktes diskutiert, ohne dass klar ist, welche Arten mit welcher klinischen Bedeutung im Respirationstrakt vorkommen. Das Ziel dieser Arbeit ist es einen zuverlässigen Test zu finden, der anzeigt, welche Arten von Chlamydien den oberen Respirationstrakt des Menschen besiedeln und somit Infektionen hervorrufen können.

Als Proben wurden Rachenspülwässer von Patienten mit einer klinisch und röntgenologisch nachgewiesenen ambulant erworbenen Pneumonie benutzt. Hierfür standen uns Restproben aus der CAP-Netz-Studie zur Verfügung.

Aus diesen Proben wurde mit Hilfe eines kommerziellen Verfahrens die DNA extrahiert und unserem Untersuchungsschema zugeführt.

Hierfür nutzen wir ein 2 - Stufen - Verfahren. Der erste Schritt bestand aus einer Screening - PCR, welche dazu diente, die Proben zu identifizieren, die chlamydiale DNA enthielten. Im zweiten Schritt erfolgte die eigentliche Identifizierung der Chlamydienspezies mit einem Array - Tube - Micro - Array.

In 63 Proben von 205 Rachenspülwässern konnte DNA von Vertretern der Familie *Chlamydiaceae* nachgewiesen werden.

Der überwiegende Anteil der positiven Proben fiel auf die Spezies *Simkania negevensis*. Diese Art ließ sich in 59 Proben nachweisen. Wohingegen *Chlamydia psittaci* lediglich in 6, *Chlamydia pneumoniae* in 2, *Chlamydia abortus* in einer Probe und *Chlamydia trachomatis* sowie *Chlamydia suis* in einer weiteren Probe festgestellt wurden.

Meistens kamen Monoinfektionen mit nur einer Art vor (27,9 %). 2,9 % der Proben wiesen Mischinfektionen auf.

Mit dem verwendeten Untersuchungsverfahren wurde eine Methode entwickelt, mit deren Hilfe man schnell und kostengünstig die verschiedenen Vertreter der Familie *Chlamydiaceae* mit molekularbiologischer Methodik detektieren kann.

Das Verfahren ist ebenfalls geeignet, sowohl Mono- als auch Mischinfektionen zu erkennen.

Wir haben den Beweis angetreten, dass Organismen der Gattung *Chlamydiaceae* bei Patienten mit einer ambulant erworbenen Pneumonie weit verbreitet sind. Insbesondere die Art *Simkania negevensis* wurde in den Untersuchungen häufig detektiert.

Deshalb stellten wir uns in der Diskussion der Frage: „Ist *Simkania negevensis* ein neuer Erreger respiratorischer Infektionen beim Menschen?“ beziehungsweise „Ist *Simkania negevensis* ein prädisponierender Faktor für eine CAP?“.

4 Einleitung

4.1 Chlamydien

4.1.1 *Taxonomie*

Die von Everett et al. (1999) vorgeschlagene revidierte Taxonomie der Chlamydien gründet sich auf einer systematischen DNA - Analyse und spiegelt die Verwandtschaftsverhältnisse dieser obligat intrazellulär lebenden Bakterien wieder. Durch Analyse der 16 S - und 23 S - rRNA - Gene konnten sowohl stark konservierte als auch hoch variable Segmente nachgewiesen werden. Die konservierten Abschnitte sind bei allen Chlamydiales gleich und bestätigen ihre Zugehörigkeit zu einer Ordnung. Eine weitere taxonomisch und diagnostisch relevante Zielregion ist das ompA - Gen, welches das major outer membrane protein (MOMP) kodiert.

Die variablen Abschnitte in rRNA - und ompA - Genen sind artspezifisch und bilden die Grundlage der neuen Einteilung. Hierbei zeigte sich, dass sich die Familie Chlamydiaceae in 2 Linien, Chlamydia und Chlamydophila, spaltet.

Aus der alten Artenbezeichnung *C. trachomatis* wurde die Gattung Chlamydia, mit den 3 neuen Spezies *C. trachomatis*, *C. muridarum* und *C. suis*.

In der zweiten Gattung Chlamydophila sind aus der alten Artenbezeichnung *C. psittaci* die vier separaten Spezies *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. felis* und *C. caviae* hervorgegangen. Auch *C. pneumoniae* und *C. pecorum* gehören nach neuer Taxonomie zu Chlamydophila und werden jetzt *C. pneumoniae* bzw. *C. pecorum* genannt.

Die Familien Simkaniaceae und Waddliaceae, mit den Spezies Simkania negevensis beziehungsweise Waddlia chondrophila, sowie Parachlamydiaceae wurden erstmals in die Ordnung Chlamydiales aufgenommen.

Die nachfolgende Abbildung zeigt eine Übersicht zur Illustration.

Diese Einteilung wurde von der Chlamydien - Forschergemeinde nicht akzeptiert und so wird das von Everett vorgeschlagene Genus *Chlamydophila* weiterhin mit dem Genus *Chlamydia* zusammengefasst und als *Chlamydia* bezeichnet. Diese Einteilung kann aber dennoch nicht als endgültig angesehen werden, da speziell außerhalb der Familie Chlamydiaceae fortwährend neue Chlamydien-Spezies beschrieben werden.

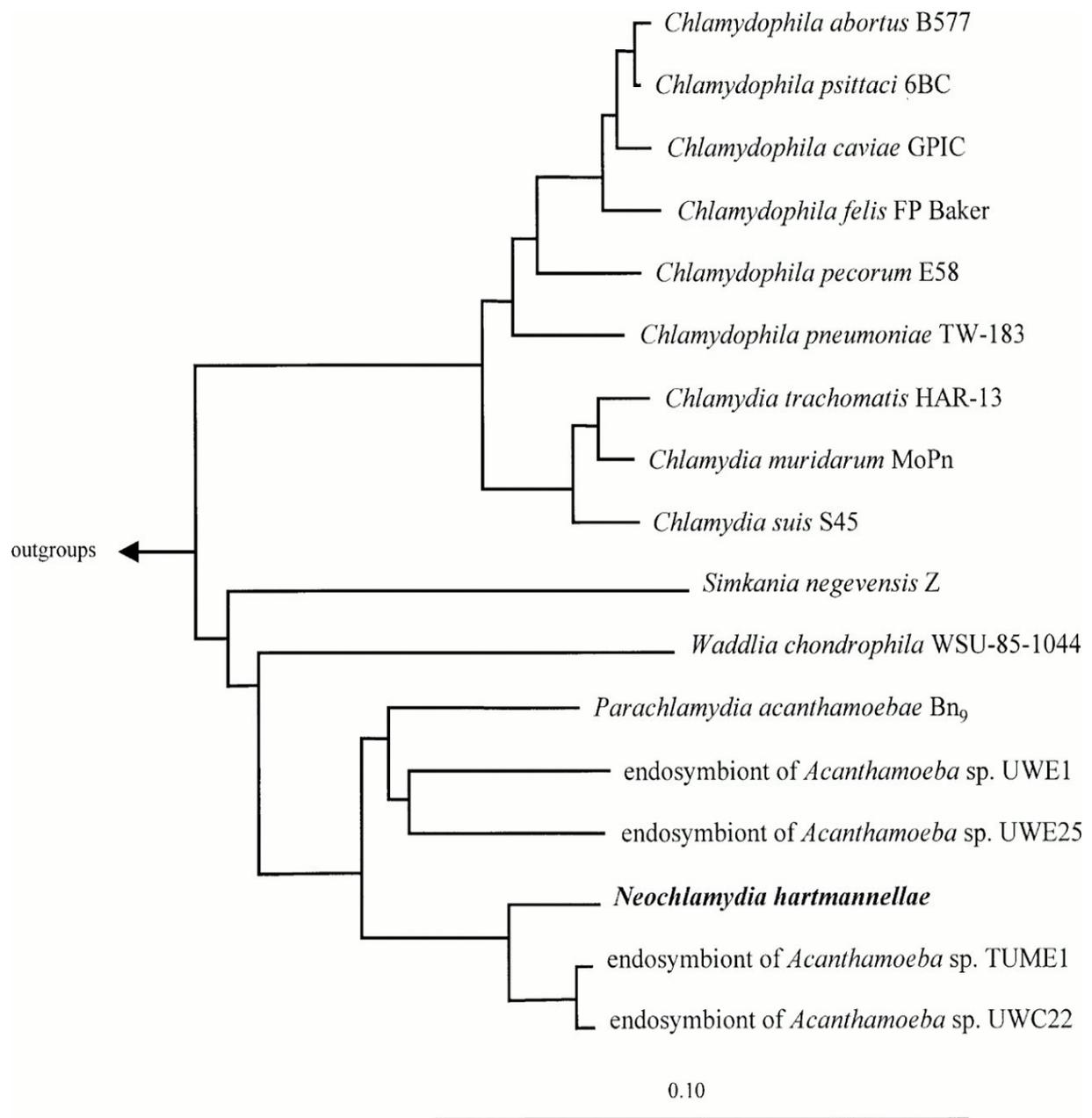


Abb. 4.1 Stammbaum der Ordnung *Chlamydiales*
(aus Horn et al. 2000)

4.1.2 **Biologie der Chlamydien**

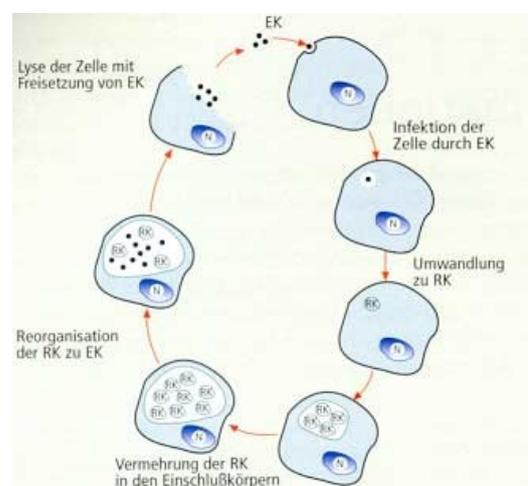
Chlamydien können auf Grund ihres zweiphasigen, obligat intrazellulären Entwicklungszyklus, bei dem sie ATP der Wirtszelle benutzen, auch als "Energieparasiten" in eukaryotischen Zellen angesehen werden, obwohl sie die Genetik zur ATP-Synthese weitgehend besitzen.

Es sind gramnegative Bakterien, in deren Zellwand im Gegensatz zu anderen Bakterien Peptidoglykan praktisch nicht nachweisbar ist. Stattdessen besteht die Zellwand lediglich aus äußerer und innerer Membran, die einen periplasmatischen Raum umschließen, sowie der Zellwand von gramnegativen Bakterien.

Zwei wichtige Bestandteile der äußeren Membran sind das chlamydienspezifische Lipopolysaccharid und das major outer membrane protein (MOMP), welches bis zu 60% der Außenhülle ausmachen kann.

Aufgrund eines funktionellen Defizits der Chlamydien, sie können kein eigenes Adenosintriphosphat bilden, sind Sie in Ihrem Vermehrungsmodus auf die Energielieferung und weitere Substrate der Wirtszelle angewiesen.

Im Verlaufe des Entwicklungszyklus treten Chlamydien in zwei verschiedenen Erscheinungsformen auf. Zum einen als ca. 0,2 bis 0,6 μm großes Elementarkörperchen, welche als kleine kokkoide Zellen das Überleben des Keims außerhalb der Wirtszelle ermöglichen. Hierbei handelt es sich um die eigentliche infektiöse Erscheinungsform, die metabolisch inaktiv und außerhalb einer Wirtszelle nicht zur Vermehrung fähig ist. Um eine Zelle infizieren zu können, muss sich das Elementarkörperchen an die Membran einer Wirtszelle anheften und wird von ihr rezeptorvermittelt phagozytiert.



EK: Elementarkörper

RK: Retikularkörper

Abb. 4.2 Vermehrungszyklus der Chlamydien

Im Phagosom der Wirtszelle wandelt sich innerhalb von 7 bis 9 Stunden das Elementarkörperchen zum 1 bis 1,5 μm großen metabolisch aktiven Retikularkörperchen um. Jetzt kann der Vermehrungszyklus durch Zellteilung der Retikularkörperchen gestartet werden. Dieser endet nach 48 bis 72 Stunden mit der Freisetzung von infektiösen Elementarkörperchen aus den Phagosomen. Um sich vor der Fusion des Phagosomen mit Lysosomen, und damit der intrazellulären Abtötung zu schützen, modifizieren Chlamydien die Phagosomenmembran. Durch Einbau von Transportsystemen in die Phagosomenmembran kommunizieren die Chlamydien mit ihrer Wirtszelle und realisieren damit den Stoffaustausch.

Kurz vor der Freisetzung von lysosomalen Enzymen, welche zur Ruptur der Zelle führen, bilden sich erneut Elementarkörperchen. Diesen Schritt bezeichnet man als Kondensation, da sich die Zellen verkleinern und ihre Zellwand sich verhärtet.

Ein mit Chlamydien in unterschiedlichen Größen und Reifungsstadien gefülltes Phagosom bezeichnet man als Einschlusskörperchen. Diese sind mikroskopisch nachweisbar. (Sachse und Großmann, 2002)

4.1.3 Pathogenität der einzelnen Chlamydienspezies

Hier soll nun ein Überblick über die Pathogenität der einzelnen Chlamydien-Spezies gegeben werden, welche mit dem AT-CHIP (siehe Kapitel 4.4. Mikroarraytechnik) detektiert werden können.

4.1.3.1 *Chlamydia trachomatis*

Die Art mit einer sehr großen Bedeutung für den Menschen ist *C. trachomatis*, welche schleimhautassoziierte Infektionen hervorrufen.

Hierbei befallen die Serovaren A, B und C vor allem die Konjunktivalschleimhäute, die Serovaren L₁ bis L₃ die Urogenitalschleimhäute und die Serovaren D - K sowohl Urogenital- als auch Konjunktivalschleimhäute. Der Respirationstrakt ist nur ausnahmsweise betroffen.

Eine ernste Erkrankung des Auges ist das Trachom oder chronische folliculäre Konjunktivitis. Diese weltweit verbreitete Infektion betrifft vor allem Menschen, welche in schlechten hygienischen Bedingungen leben. Nach rezidivierenden Infektionen kommt es nach Jahren zu einer Keratokonjunktivitis mit narbigen Schrumpfungen der Augenlider zu zellulären Infiltraten sowie zu Neovaskularisierungen und Narbenbildung auf der Kornea. Das Endstadium ist die Erblindung durch die eingetrübte Hornhaut.

Eine leicht abgeschwächte Form findet man in Form der Schwimmbadkonjunktivitis. Hierbei infizieren sich meist Erwachsene beim Schwimmen in öffentlichen Badeeinrichtungen oder geeigneten sexuellen Aktivitäten mit *C. trachomatis*. Diese stammen aus dem Genitalbereich infizierter Badegäste und können, bei ungenügender Chlorierung, im Badewasser überleben.

Nach 2 bis 25 Tagen bildet sich eine eitrige Konjunktivitis die antibiotischer Therapie im Allgemeinen ohne Komplikationen ausheilt. Sehr selten kommt es zu Hornhautnarben oder Eintrübungen der Kornea.

Eine andere Augenerkrankung ist die Einschlusskeratitis der Neugeborenen, die sich bei vaginaler Entbindung in den Geburtswegen der Mutter infiziert haben. Diese Erkrankung heilt ebenfalls im Allgemeinen nach antibiotischer Therapie folgenlos aus.

Bei der Geburt kann das Neugeborene chlamydienhaltiges Vaginalsekret aspirieren und dadurch eine *C. trachomatis* - Pneumonie entwickeln.

Weite Verbreitung hat *C. trachomatis* im Bereich der Genitalinfektionen. So werden ca. 60% der nicht durch Gonokokken bedingten Urethritiden durch Chlamydien verursacht. Daneben können auch Epididymitis und Prostatitis auftreten, sowie bei der Frau Zervizitis, Endometritis und Salpingitis.

Als schwerwiegende Infektionsfolgen treten Peritonitis und Tubenverklebungen auf, die dann zu Infertilität oder extrauterinen Schwangerschaften führen.

Die Therapie von Infektionen mit Chlamydien gelingt mit Antibiotika, welche intrazellulär angereichert werden. Dazu gehören Tetrazykline, Makrolidantibiotika und Chinolone.

Wichtig bei der Behandlung sind eine ausreichend lange Therapie sowie die Mitbehandlung des Sexualpartners, da es sonst zu ständigen Neuinfektionen kommen kann.

Eine weitere von *C. trachomatis* Serovar L₁ bis L₃ hervorgerufene Geschlechtskrankheit ist das Lymphogranuloma venerum bzw. Lymphogranuloma inguinale.

Diese von der Genitalschleimhaut ausgehende Infektion, führt zu einer heftigen Entzündung regionaler inguinaler Lymphknoten. Nachdem das Lymphogranuloma venerum lange Zeit als Tropenkrankheit galt, ist es jetzt vorwiegend durch HIV – infizierte, homosexuelle Männer nach Europa zurückgekehrt.

Nach einer Inkubationszeit von Tagen bis Wochen bildet sich initial eine schmerzlose Ulzera und sekundär eine schmerzhafte, eitrige Einschmelzung der regionalen Lymphknoten. Erfolgt keine Therapie, mit Makrolidantibiotika oder Tetracyclinen, chronifiziert die Erkrankung mit fibrosierendem Verschluss der Lymphbahnen und

Elephantiasis der entsprechenden Körperregionen. Gleichzeitig treten Allgemeinsymptome wie Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit und Arthralgien auf.

Als Komplikationen können sich anale, anorektale, anovaginale oder rektovesikale Fisteln und Mastdarmstrikturen entwickeln.

4.1.3.2 *Chlamydia suis*

C. suis wurde bisher nur bei Schweinen nachgewiesen und führt zu Konjunktivitis, Enteritis, Pneumonie und anderen asymptomatischen Infektionen (Everett, 2000).

4.1.3.3 *Chlamydia muridarum*

Diese Chlamydienspezies wurde bisher bei Mäusen und Hamstern nachgewiesen. Eine Infektion kann zu Pneumonien bei oben genannten Nagetieren führen, wobei ein großer Teil asymptomatisch verläuft (Everett, 2000).

4.1.3.4 *Chlamydia psittaci*

Als Erreger der Ornithose, welche auch auf den Menschen übertragbar ist, spielt *Chlamydia psittaci* eine wichtige Rolle. *Chlamydia psittaci* kann bei verschiedenen Nutztieren Infektionen hervorrufen. Es gelten aber nur die bei Vögeln vorkommenden Stämme als humanpathogen.

Nach Infektion zeigt sich ein unspezifisches, grippehaftes Krankheitsbild mit Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, abdominalen Beschwerden und Lichtscheu. Dieser Symptomkomplex wird bei atypischer Pneumonie beobachtet. Im Röntgen - Thorax imponiert ein vorwiegend interstitielles Infiltrat. Es können Exantheme auftreten, die den Typhusroseolen ähneln. Weiterhin können auch Endocarditiden und Enzephalitiden hervorgerufen werden (Göllner et al. 2006).

Unterbleibt eine antibiotische Therapie, so kann die Ornithose letal verlaufen. Da heute eine wirkungsvolle Therapie existiert, sind letale Ornithosefälle sehr selten geworden. Die Therapie kann mit Doxycyclin oder Erythromycin erfolgen. Als Reserveantibiotika kommen Fluorochinolone wie Ciprofloxacin in Betracht.

Chlamydien haben aber eine veterinärmedizinische Bedeutung, denn Chlamydiosen in Nutzgeflügelbeständen können durch Lethargie, Hyperthermie, Keratokonjunktivitis und verminderter Legeleistung zu Ertragseinbußen führen (Sachse und Großmann, 2002). Im Zusammenhang mit Infektionen bei Geflügel und Ziervögeln besteht auch die Gefahr der zoonotischen Übertragung auf den Menschen (Sachse und Schubert, 2005).

4.1.3.5 *Chlamydia pneumoniae*

Eine weitere wichtige humanpathogene Spezies ist *C. pneumoniae*. Obwohl spezielle Biovare auch in Pferden und Koalas gefunden wurden, spielen sie doch die größte Rolle bei Infektionen des Menschen. *C. pneumoniae* ist weltweit verbreitet. Die Durchseuchungsrate aller 20 - Jährigen beträgt bereits ca. 50 % (Mäurer et al. 2007). *Cp. pneumoniae* ist für eine Reihe von respiratorischen Erkrankungen des Menschen verantwortlich, so zum Beispiel für die persistierende Laryngitis, die ambulant erworbene Pneumonie, die Bronchitis sowie bei persistierenden Infektionen die chronische Heiserkeit.

Allerdings scheint hier die Prävalenz von Personen mit Antikörpern gegen den Erreger sehr vom Alter der Erkrankten abhängig zu sein. So findet man bei Kindern und Jugendlichen bei bis zu 10 % der an Pneumonie - Erkrankten *C. pneumoniae* (Heiskanen-Kosma et al., 1999), wohingegen bei Erwachsenen mit ambulant erworbener Pneumonie der Anteil von *C. pneumoniae* -positiven nur bei ca. 1 % liegt (Wellinghausen et al, 2006).

Eine sehr wichtige Erkrankung des Respirationstraktes ist die chronisch - obstruktive Lungenerkrankung (COPD). Diese mit Husten und Auswurf, später mit Belastungsdyspnoe und Luftnot in Ruhe verbundene Erkrankung endet meist in einer respiratorischen Insuffizienz. Diese mit einer hohen Inzidenz und Mortalität verbundene Erkrankung hat ihre Hauptursache im Zigarettenrauchen und ist die vierthäufigste Todesursache in den Industrieländern. Aber auch die Luftverschmutzung und rezidivierende pulmonale Infektionen führen zu akuten Exazerbationen der COPD.

Tomioka et al. (2007) konnten zeigen, dass in 18 von 27 Patienten mit einer akuten Exazerbation eine Infektion mit *C. pneumoniae* vorlag.

Eine andere Studie von Azzouzi et al. (2005) konnte belegen, dass COPD- Patienten hohe Immunglobulintiter gegen *C. pneumoniae* aufwiesen.

Außerdem konnten bei einer Reihe anderer entzündlicher Erkrankungen Infektionen mit *C. pneumoniae* nachgewiesen werden. Dazu zählen auch neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und vaskuläre Demenz. Paradowski et al. (2007) konnten aufzeigen, dass bei Patienten mit Morbus Alzheimer und vaskulärer Demenz ein signifikant höherer Anteil an Patienten mit *C. pneumoniae* infiziert ist als in einer gesunden Kontrollgruppe. Gerard et al. (2007) erkannten, dass bei 20 von 27 Alzheimerpatienten, aber nur bei 3 von 27 gesunden Probanden, eine Infektion mit *C. pneumoniae* bestand.

Die Ätiologie der Atherosklerose musste neu bewertet werden, so dass man jetzt von einer chronischen Entzündung als Grundlage der Atherombildung ausgeht. Hierbei handelt es sich um eine Volkskrankheit mit einer hohen gesundheitspolitischen Bedeutung. Denn allein eine Form der Atherosklerose, die koronare Herzkrankheit, ist die häufigste Todesursache in den Industrieländern. Hauptrisikofaktoren sind das Rauchen, der arterielle Hypertonus, Fettstoffwechselstörungen, der Diabetes mellitus und das männliche Geschlecht. Neu ist hierbei die Betrachtungsweise, dass die Bildung der atheromatösen Plaques durch rezidivierende Entzündungen der Gefäßintima begünstigt wird. Und hier spielen Infektionen mit *C. pneumoniae* eine wichtige Rolle, wie Saikku et al. (1988) zeigen konnten. Dieser finnische Forscher konnte zeigen, dass Patienten mit einem akutem Myokardinfarkt sowie einer koronaren Herzerkrankung einen signifikant höheren IgG - Antikörper- Titer gegen *C. pneumoniae* haben, als eine gesunde Kontrollgruppe. Hierbei konnten bei 50% der KHK - Patienten und 68% der Myocardinfarktpatienten, aber nur bei 7 % der gesunden Kontrollgruppe, *C. pneumoniae*- IgG nachgewiesen werden.

4.1.3.6 *Chlamydia pecorum*

C. pecorum wurde in Rindern, Schafen, Ziegen und Schweinen festgestellt. Hier lösen sie Aborte, Konjunktividen, Enzephalomyelitiden, Enteritiden und Pneumonien aus.

In Koalas waren sie die Ursache für Infertilität und Harnwegserkrankungen (Everett, 2000).

4.1.3.7 *Chlamydia felis*

C. felis ist ein endemischer Keim für Hauskatzen, welcher weltweite Verbreitung findet. Er verursacht vor allem Konjunktividen, Rhinitis und Entzündungen des Respirationstraktes (Everett, 2002). Vor allen bei älteren Katzen treten Keratokonjunktividen auf, welche bei engem Kontakt auf den Menschen übertragen werden können. So konnte eine japanische Studie zeigen, dass 8,8 % der Tierärzte positiv auf Antikörper gegen *C. felis* getestet wurden, wohingegen die Durchseuchungsrate der Gesamtbevölkerung lediglich bei 1,7 % lag (Yoshinao Azuma et al., 2006) Auch Fälle von atypischen Pneumonien und Endokarditiden sind durch *C. felis* beschrieben worden (Sachse u. Großmann, 2002).

4.1.3.8 *Chlamydia caviae*

C. caviae wurde beim Meerschweinchen nachgewiesen und ruft dort Entzündungen der Konjunktiven hervor. Eine Infektion bei anderen Spezies sowie des Menschen ist bislang nicht bekannt.

4.1.3.9 *Chlamydia abortus*

C. abortus ist ein Keim, der sehr selektiv die Plazenta der infizierten Wirte befällt und dort zu einem Abort oder hypotrophen Neugeborenen führt. Er konnte bislang bei Rindern, Schafen, Ziegen, Pferden, Kaninchen, Mäusen, Meerschweinchen und Schweinen nachgewiesen werden (Everett, 2000). Auch eine Infektion des Menschen scheint möglich. Als Erstbeschreibung gilt hier Waldner (et al. 2003), wo eine 39 jährige Patientin mit rezidivierenden Aborten und pelvic- Pain- Syndrom positiv auf *C. abortus* Antikörper getestet wurde. Eine nachfolgende PCR und Sequenzierung bestätigte die Verdachtsdiagnose.

Weitere Berichte aus der Schweiz (Pospischil, 2002) und den Niederlanden (Mijer et al., 2004) belegen dies. In beiden Fällen hatte eine Schwangere nach Kontakt mit Abortmaterial von Ziegen selbst eine Fehlgeburt, wobei jeweils in den Plazenten *C. abortus* nachgewiesen werden konnte.

4.1.3.10 *Parachlamydiaceae*

Die Parachlamydien infizieren in erster Linie Amöben, vor allem die Spezies der Gattungen *Acanthamoeba* und *Hartmannella*.

Wahrscheinlich ist *P. acanthamoebae* ein opportunistischer Keim des humanen Respirationstraktes, der bei Patienten unter Immunsuppression Erkrankungen auslösen kann. So konnte durch Corsaro und Greub (2006) an 2 Patienten ein Fieberschub durch *P. acanthamoeba* nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um einen Patienten mit einer Vaskulitis (Kawasaki-Syndrom) und um einen nierentransplantierten Patienten. Beide standen unter Immunsuppression. Weiterhin wird eine Parachlamydienpneumonie bei einem HIV - positiven Patienten beschrieben.

Eine hohe Rate von Antikörpertitern gegen *P. acanthamoebae* finden sich bei polytraumatisierten Patienten auf Intensivstationen. Hier konnten bei 5 von 37 Patienten Antikörpertiter nachgewiesen werden. Allerdings ist das pathogene Potenzial noch nicht ausreichend geklärt.

4.1.3.11 *Waddliaceae*

Die Spezies *Waddlia chondrophila* wurde erstmals 1986 aus einem Abortmaterial von Rindern identifiziert. Das pathogene Potenzial war lange Zeit nicht eindeutig belegt. Erst in jüngster Zeit rückt *Waddlia chondrophila* zunehmend in den Fokus der Wissenschaft.

Eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2007 beschäftigt sich zum Beispiel mit der Möglichkeit, dass das Agens humane Fehlgeburten auslösen könnte. Baud et al. (2007) konnte belegen, dass bei Frauen mit stattgehabten Aborten der Anti - *Waddlia* - IgG - Titer signifikant höher war als bei einer Kontrollgruppe ohne Fehlgeburten.

Diese Autoren diskutierten *Waddlia chondrophila* als einen möglichen Auslöser für Aborte beim Menschen.

4.2 *Simkania negevensis*

Ein neuer Vertreter der Ordnung Chlamydiales, *Simkania negevensis*, wurde erstmals von Simona Kahane im Jahre 1998 beschrieben. Die israelische Forscherin

erkannte, dass ein hoher genetischer Verwandtschaftsgrad zu anderen Chlamydienspezies besteht. Dies bestätigten auch Everett et al. (1999). Sie schrieb, dass die 16 S - und 23 S - rDNA - Regionen von *S. negevensis* zu 80 bis 87 % mit den anderen Vertretern von *Chlamydiales* homolog sind.

Allerdings gibt es auch Unterschiede, die die Einordnung in eine eigene Familie (*Simkanaceae*) rechtfertigen. *S. negevensis* unterscheidet sich von anderen Mitgliedern der Ordnung Chlamydiales durch eine Resistenz gegenüber Ampicillin, Penicillin G und Cyclosporin. Das extrachromosomale Plasmid, das manche Chlamydienspezies besitzen, fehlt bei *Simkania*. Weiterhin besitzt es ein Gruppe I - Intron in der 23 S - Region, welches sie von allen anderen Bakterienarten unterscheidet (Kahane et al., 1999).

Ein weiterer Unterschied besteht im Lebenszyklus, denn die Dauer des Vermehrungszyklus ist verlängert. Während dieser bei anderen Chlamydienarten 2 bis 3 Tage dauert, können hier 2 Wochen und länger vergehen, ehe die infektiösen Elementarkörperchen freigesetzt werden.

Das pathogene Potential von *S. negevensis* ist noch nicht ausreichend erforscht. Wie bei anderen Chlamydienarten auch, vermutet man hier, dass vor allem der Respirationstrakt infiziert wird. Dort können dann Erkrankungen wie CAP, COPD oder Asthma ausgelöst oder Krankheitsverläufe gefördert und verstärkt werden.

Die Frage ist, wie ist eine Infektion mit *S. negevensis* zu deuten?

Mehrere Studien der letzten Jahre haben versucht eine Antwort zu finden, aber die Antworten sind recht unterschiedlich.

In einigen Studien wie von Liebermann et al. (2002), in der 120 Patienten mit einer akuten Exacerbation einer COPD untersucht wurden, und die Studie von Kumar et al. (2006) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Keimbelastung zwischen erkrankter Gruppe und gesunder Kontrollgruppe gefunden werden. Durch die Untersuchung von Patienten mit Bronchiolitis, Pneumonie und Asthma in New York konnten ebenfalls keine erhöhten Durchseuchungsraten der Patienten gegenüber den gesunden Kontrollgruppen festgestellt werden.

Andere Arbeiten wiederum erlangten Ergebnisse, wonach die Infektion mit *S. negevensis* durchaus für respiratorische Erkrankungen verantwortlich ist.

So konnten Kahane et al. (2007) nachweisen, dass von 34 Kindern mit Pneumonien 76% *S. negevensis* - positiv im Nasenabstrich waren. Verantwortlich hierfür war das Trinkwasser, welches mit *S. negevensis* kontaminiert war. Eine andere Arbeit,

beschäftige sich mit ambulant erworbener Pneumonie bei Kindern in Italien. Fasoli et al. (2007) entdeckte bei 20-30 %, von 101 Kindern mit CAP, Antikörper gegen *S. negevensis*.

Diese Situation macht deutlich, dass weitere Studien notwendig sind.

4.3 CAPNETZ und Probenherkunft

Wir suchten nach einem geeigneten Probenpool um nachweisen zu können, dass *C. pneumoniae* und *Simkania negevensis* bei Patienten mit respiratorischen Erkrankungen im Respirationstrakt vorkommen und möglicherweise Erreger einer ambulant erworbenen Pneumonie sind.

Einen geeigneten Pool fanden wir in den Proben des Forschungsverbundes CAPNETZ. Hier standen uns Restproben von respiratorischen Proben zur Verfügung, die zuvor mit einer klassischen PCR auf das Vorkommen dieser Bakterien untersucht worden waren. An der CAPNETZ- Studie war das Institut für medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikum Jena beteiligt (Förderkennzeichen: BMBF:01 KI 0104)

CAPNETZ ist eine vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderte, Studie zur Erforschung der ambulant erworbenen Pneumonie (CAP community acquired pneumonia). Hierbei handelt es sich um einer Erkrankung mit jährlich ca. 800.000 Fällen, wovon 240.000 stationär behandelt werden müssen. Die Letalität liegt bei ca. 6 – 8 % liegt.

4.4 DNA-Mikroarraytechnik

Für die Bearbeitung der Proben war es uns wichtig, ein diagnostisches System einzusetzen, das schnell und kostengünstig eine Aussage über die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Infektionserreger liefern kann.

Ein solches System ist die Array - Tube (AT) - Mikroarray - Plattform der Firma Clondiag Jena (Clondiag Chip Technologies, Jena – ab 2006 unter dem Firmenamen Alere Technologies GmbH am Markt).

Das Herzstück ist ein Mikrochip, der sich auf dem Boden eines Mikroreaktionsgefäßes (Eppendorf-Tube) befindet. Dieses Mikroarray ist ca. 2x2 mm groß und

beherbergt an etwa 100 Positionen jeweils eine von 34 spezifischen Sonden, die aus der 23 S - rDNA - Region abgeleitet wurden. Der entsprechende Test erlaubt die Differenzierung der neun verschiedenen Chlamydien-Arten sowie die Identifizierung von *Simkania negevensis* und *Waddlia chondrophila* (Sachse et al., 2005). Eine entsprechende Übersicht gibt Tabelle 4.1.

Tabelle 4.1 Durch den CHIP differenzierbare *Chlamydiales*- Spezies

Ordnung	Familie		Spezies
<i>Chlamydiales</i>	<i>Chlamydiaceae</i>	<i>Chlamydia</i>	<i>C. muridarum</i>
			<i>C. suis</i>
			<i>C. trachomatis</i>
		<i>Chlamydophila</i>	<i>C. abortus</i>
			<i>C. caviae</i>
			<i>C. felis</i>
			<i>C. pecorum</i>
			<i>C. pneumoniae</i>
			<i>C. psittaci</i>
	<i>Simkanaceae</i>		<i>Simkania negevensis</i>
<i>Waddliaceae</i>		<i>Waddlia chondrophila</i>	

Die Sonden stellen Bindungsstellen für DNA - Amplifikate aus der Domäne I der 23 S - Region des Chlamydiengenoms dar. Diese Region enthält sowohl stark konservierte als auch variable Abschnitte. Zwischen zwei konservierten Bereichen wird durch Konsensus-Primer ein PCR-Produkt erzeugt, welches den diskriminierenden Abschnitt, auch als "most variable window" bezeichnet, enthält.

Innerhalb dieses Fensters gibt es Sequenzbereiche, die hochspezifisch für die einzelnen Arten sind und eine genaue Spezieszuordnung zulassen.

Die folgende Abbildung soll dies nochmals veranschaulichen. Man erkennt die konservierten, also bei allen Chlamydien gleichen Sequenzen sowie die speziesvariablen Sequenzen innerhalb der Markierung.

```

(1996) 1996         2010         2020         2030         2040         2050         2060         2070         2080         2095
Waddia_chondr_APU42496(1870) GGGGCAACCCAAATGGGATTAACACCACCATTATCTTTACCTGAAATAAA
Stankane_gervens_k_U68460(1961) GGGGGAAACCCAGTGGAGTTAGTCCCTCCACTATTCCTACCTGAAATAC
Chondrarium_MbPh (384)  GGGGAAACCCCGGTAGA-GTAAATAGTCTTACCATTGTATACTGAAATAC
Cstuf_H5 (381)  GGGGAAACCCCGGTAGA-GTAAATAGTCTTACCATTGTATACTGAAACAC
Chrachonats_D(1917) GGGGAAACCCCGGTAGA-GTAAATAGACTACCATTGCAATGCTGAAATAC
Chrachonats_L2(1921) GGGGAAACCCCGGTAGA-GTAAATAGACTACCATTGCAATGCTGAAATAC
Cstuf_S45(1910) GGGGGAAACCCCGGTAGA-GTAAATAGACTACCATTGTTAGCTGAAACAC
Cpecommu_PA (370)  GGGGAAACCCCGATAGA-TTAAATAGTCTTATCATTATACGCTGAAATCC
Pneumoniae_CMI (366)  GGGGCAACCCGATAGA-CTAATAGTCTTATCATTATATGTTGAAATAC
Pneumoniae_TW183 (368)  GGGGCAACCCGATAGA-TTAAATGCTCTATCATTATATGTTGAAATAC
Cavahe_GPIC (367)  GGGGTAACCCGATAGA-TTAAATGCTCTACCATTATATACTGAAATAC
CdeB_Baker (367)  GGGGCAACCCGATAGA-TTAAATCATCTTACCATTATATGCTGAAATAC
Osthaci6BC(1901) GGGGCAACCCGATAGA-TTAAATCATCTTACCATTATACGTTGAAATAC
Osthaci6MS6 (367)  GGGGCAACCCGATAGA-TTAAATCATCTTACCATTATACGTTGAAATAC
Osthaci1MN (366)  GGGGCAACCCGATAGA-TTAAATCATCTTACCATTATACGTTGAAATAC
Cabonus_A22 (365)  GGGGCAACCCGATAGA-TTAAATCATCTTATCATTGTAAGCGAATAC
Cabonus_B577 (365)  GGGGCAACCCGATAGA-TTAAATCATCTTATCATTGTAAGCGAATAC
Osthaci1WC (367)  GGGGCAACCCGATAGA-TTAAATCATCTTACCATTATACGTTGAAATAC
Site G (Chrach) (1)  -----GCATGCTGAAATACATAGGATATGCAAAAGCGACACCTG-
Site G (Ospsth) (1)  -----CCATTATACGTTGAAATACATAGGCGTATTAAGGCGACA-
Chrachonats_window (1)  -----CTACCATTGCAATGCTGAAATACATAGG-
Cpecommu_window (1)  -----CTATCATTATACGCTGAAATCCATAGG-
Cpsthaci6BC_window (1)  -----CTACCATTATACGTTGAAATACATAGG-
Cpsthaci6MS6_window (1)  -----CTATCATTATATGTTGAAATACATAGG-
Cpneumoniae_window (1)  -----CTATCATTATATGTTGAAATACATAGG-
Cstuf_S45_window (1)  -----CTACCATTGTAAGCTGAAACACATAGG-
Site G (Cpneumoniae) (1)  -----ATAAGTTGAAATACATAGGCATATTAAGGCGACACCCG-
Consensus(1996) GGGG AACCCG TAGA TAAT TCTACCATTATATGCTGAAATACATAGG TA AA GCGACACCTGC GAACCTGAAACATCTTAGTAAGCAGAGGAA

```

Abb 4.3
Abbildung des „most variable window“

Für die weitere Bearbeitung der Probe ist es wichtig, dass ein Primer mit Biotin markiert wurde.

Das biotinylierte PCR - Produkt bindet nun in der Inkubationsphase an die entsprechende Sonde des AT. Es entsteht ein spezielles Bindungsmuster, das sichtbar gemacht werden muss.

Nach weiteren Waschschritten wird Streptavidin zugegeben. Dies bewirkt in Reaktion mit Tetramethylbezidinlösung eine Schwarzfärbung der gebundenen DNA - Amplifivate, so dass auf dem Boden des AT ein schwarzer Spot erkennbar wird.

Zur reproduzierbaren Auswertung des Färbungsmusters werden die gefärbten Arrays mittels Array-Tube- Reader eingelesen und am PC sichtbar gemacht. Die weitere Bearbeitung am PC erfolgt mit der Icono Clust Software Version 2.2. Diese berechnet für jeden Spot die an Referenzspots korrigierte Signalintensität. Dabei wird die mittlere Hintergrundintensität vom Mittelwert der Spot - Intensität abgezogen.

Das Ergebnis ist ein spezifisches Muster von Spots bzw. ein entsprechendes Balkendiagramm, welches eine genaue Zuordnung der Probe zu einer Chlamydienspezies zulässt.

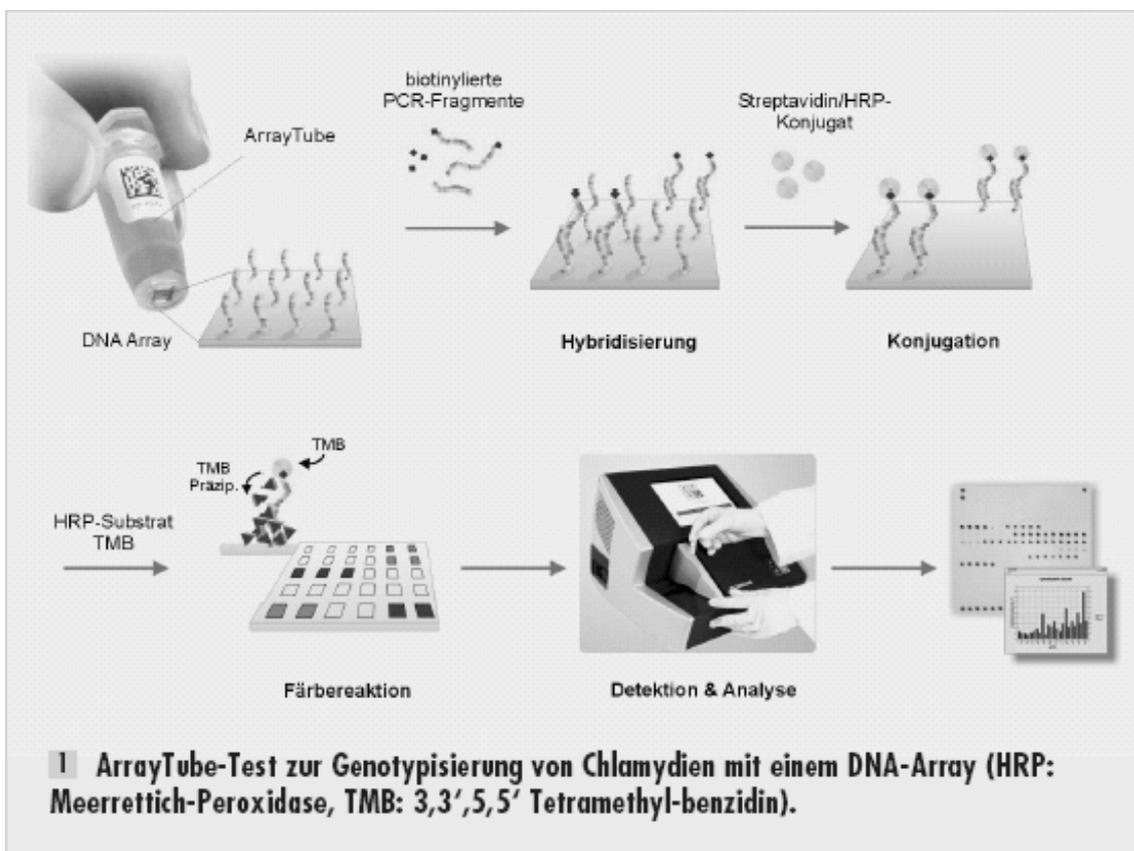


Abb 4.4 schematische Darstellung der Arbeitsschritte des AT- CHIP

Leider wurde bei der Auswahl der ursprünglichen Konsensusprimer das Hauptaugenmerk auf die Zuordnung der einzelnen Chlamydien-Arten Wert gelegt. Die Sonden für *Simkania negevensis* und *Waddlia chondrophila* sollten lediglich der Ausschlussdiagnostik dienen.

Deshalb musste vor Beginn der Probenauswertung ein zusätzliches Primerpaar entwickelt werden, das für *Simkania negevensis* spezifisch war. Dies erfolgte mit Hilfe von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Durch dieses zweite Primerpaar konnte die erwähnte Lücke geschlossen und das von uns benötigte Speziesspektrum erfasst werden.

5 Zielstellung der Arbeit

Infektionen des Respirationstraktes spielen in der Humanmedizin eine große Rolle. Sie haben gleichermaßen eine große gesundheitliche als auch gesundheitsökonomische Bedeutung.

Ziel der Forschung muss es daher sein, die Ursachen von respiratorischen Infektionen zu erkennen, schnelle und kostengünstige Diagnosemethoden zu finden und Möglichkeiten der Therapie zu etablieren.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zur Beantwortung der folgenden Fragen zu leisten:

- Welche Arten von Chlamydien besiedeln den oberen Respirationstrakt von Patienten mit CAP?
- Handelt es sich dabei um Einzel- oder um Mischinfektionen?
- Sind die von uns eingesetzten Tests zuverlässig, kostengünstig und somit auch in der Routinediagnostik einsetzbar?

Unser besonderes Interesse galt einem neuen möglichen Erreger der Pneumonie, *Simkania negevensis*.

Wir wollten herausfinden, ob dieses Bakterium in den Rachenspülwasserproben von Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie enthalten war. Im positiven Falle könnte er für die Entstehung der CAP verantwortlich sein bzw. deren Entstehung als prädisponierenden Faktor unterstützen.

6 Methodik

6.1 Prinzip des Untersuchungsverfahrens

Bei den von uns bearbeiteten Proben handelt es sich ausschließlich um Rachenspülwasserproben, welche als Restproben aus einer vorausgehenden CAPNETZ- Studie verfügbar waren. Die Auswahl erfolgte nach dem Zufallsprinzip ohne Kenntnis des

Herkunftsortes oder des Infektionsstatus. Dabei wurden nur solche Proben untersucht, von denen genügend Material zur Verfügung stand. Aus den

Rachenspülwasserproben wurde dann mit einem kommerziellen Kit (siehe 6.2 Seite 27) die DNA extrahiert und diese einer Screening-PCR zugeführt. Das

Screening-verfahren sah zwei unterschiedliche PCR-Protokolle für jede einzelne Probe vor, wobei jeweils ein Test für die Familie Chlamydiaceae und ein Test für *Simkania negevensis* durchgeführt wurde. Jedes Protokoll und jede Probe erhielt eine Doppelbestimmung.

Wenn mindestens einer der beiden Tests ein positives Ergebnis lieferte, wurde die Probe mittels AT-Microarray (Clondiag Chip Technologies, Jena) weiterbearbeitet. Das Screening- Verfahren wurde in Realtime - PCR - Technik durchgeführt und diente der Identifizierung von positiven bzw. negativen Proben. Dieser Schritt der Bearbeitung wurde eingefügt, um eine Kostenreduktion beim Verbrauch der Array - Tube-Mikroarrays zu erzielen.

Vor der eigentlichen Hybridisierung auf dem Array-Tube-Chip ist eine herkömmliche PCR zur DNA-Amplifikation und-biotinylierung notwendig, wobei die Screening-PCR - Protokolle nicht eingesetzt werden konnten.

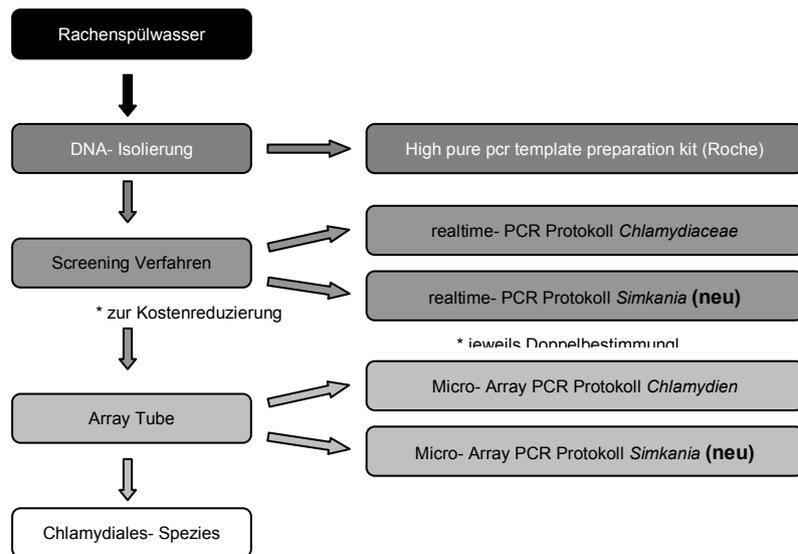


Abb. 6.1. Ablauf der Probenbearbeitung

Für diesen Schritt waren erneut 2 PCR-Protokolle (Array-Tub -PCR) notwendig, einmal das Protokoll für *Chlamydiaceae* und einmal das Protokoll für *Simkania negevensis*. Für jede Probe wurde jeweils eine chlamydienspezifische sowie eine *Simkania*-spezifische PCR durchgeführt und anschließend die PCR-Produkte gepoolt.

Die gepoolten PCR-Produkte wurden dann zum Schluss zur Speziesidentifizierung dem Array-Tube-Test zugeführt.

6.2 DNA-Isolierung

Zunächst wurden die Rachenspülwasserproben bei 14000 rpm für 20 min zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das entstandene Pellett in 200 µl PBS (10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 0,145 M NaCl, pH 7,0) suspendiert. Zur Extraktion wurde das High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet, wobei nach Zellyse die freie DNA in einer Minisäule aufgefangen und dann mit einem Elutionspuffer eluiert wurde. Hierbei gingen wir nach dem Protokoll des Herstellers vor. Abweichend davon setzten wir im letzten Schritt zur besseren Aufkonzentrierung der DNA lediglich 50 µl Elutionspuffer ein.

Die im Elutionspuffer aufgefangene Probe konnte dann direkt dem nachfolgenden Screeningverfahren zugeführt werden.

6.3 Screeningverfahren

Als Screeningverfahren verwendeten wir die Real-Time - PCR, um schnell und kostengünstig positive Proben detektieren zu können. Hierfür benutzen wir 96 - Well - Platten in 25 µl - Ansätzen und führten zur größeren Sicherheit jeweils ein Doppelbestimmung durch.

Zur besseren Wertung der Ergebnisse führten wir auf jeder Platte eine Verdünnungsreihe in den Konzentrationen von 10⁴ bis 10⁻¹ EBE (einschlussbildende Einheiten) eines Chlamydien- bzw. *Simkania negevensis* Stammes aus der Zellkultur als quantitativen Standard mit.

Als Reagenzienkontrolle führten wir jeweils 4 Non-Template Controls (NTC) mit, welche die gleichen Volumina an universellem Master Mix, Primern und Sonde enthielten. Aber anstatt des DNA-Templates lediglich Wasser zugeführt wurde.

Folgendes Temperatur - Zeit-Profil benutzen wir für die Screening-PCR (Standardprogramm des Cyclers):

	2 min	bei	50°C
	10 min	bei	95°C
45 Zyklen	15 sec	bei	95°C
	60 sec	bei	60°C

Der Befund galt als positiv, wenn beide Ansätze einen Ct-Wert (Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert) von unter 40 zeigten.

Falls höhere Ct-Werte gemessen wurden oder nur ein Ansatz einen positiven Ct-Wert zeigte, waren die Proben fraglich positiv.

Ergab sich für beide Bestimmungen kein Ct-Wert, so wurden die Proben als negativ gewertet.

Die in den nachfolgenden Protokollen bezeichneten Mastermix-Ansätze beziehen sich jeweils auf die Verwendung des Mastermix der Firma Jena BioScience.

Als Target für unsere Primer in beiden PCR diente die Domäne 1 des 23S-rRNA-Gen.

6.3.1 realtime - PCR Protokoll *Chlamydiaceae* (Screening- PCR)

Beim Protokoll *Chlamydiaceae* ergab sich für 100 Reaktionsansätze das in Tabelle 6.1. dargestellte Pipettierschema. Wir verwendeten jeweils 1 µl des DNA- Templates, einen Mastermix der Firma Jena BioScience sowie anschließend bezeichnete Primer.

Primer: Ch23S - F/R: (5' - CTGAAACCAGTAGCTTATAAGCGGT - 3')

Stammlösung 100 pmol/µl, Arbeitsverdünnung 1:20, entspr. 5 pmol/µl, davon 1,5µl je Reaktion

Sonde CH23S-FAM:

enthält 35 nmol (Beispiel), lösen in 7ml Puffer (1mM Tris - HCl pH 8.0/0,01mM EDTA), ergibt 5 pmol/µl bzw. 5 µM, in Portionen zu je 200µl einfrieren

IC- Primer EGFP1-F/10-R: (5' - GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC - 3')

Stammlösung 100 pmol/µl, Arbeitsverdünnung 1:10 entspr. 10 pmol/µl

IC-Sonde EGFP-HEX : (5' - AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA - 3')

enthält 47 nmol, lösen in 9,4ml Puffer (1mM Tris - HCl pH 8.0/0,01mM EDTA) ergibt 5 pmol/µl bzw. 5 µM, in Portionen zu je 200µl einfrieren

*IC2-Mix: 1:1:2 mischen (F+R+Sonde)

Tabelle 6.1. Pipettierschema realtime - PCR Protokoll Chlamydiaceae

Mastermix-Ansatz (MM)				
Reagenz	Konz. Arbeitslsg. [pmol/µl]	Konz. im Tube nM	µl je Reaktion	µl gesamt 100 Reaktionen
2XuMM-Puffer	2 x	1 x	5	500
Primer 1 Ch23S-F	5	300	1,5	150
Primer 2 Ch23S-R	5	300	1,5	150
Sonde Ch23S-FAM	5	200	1	100
IC-Primer+Sonde	10 bzw. 5	100 bzw. 50	2	200
IC2-Template			0,25	25
Template	unterschiedl.	unterschiedl.	1	100
Wasser			12,75	1275
Gesamtvolumen [µl]			25	2500

6.3.2 realtime - PCR Protokoll *Simkania* (Screening - PCR)

Beim Protokoll *Simkania* ergab sich für 100 Reaktionsansätze folgendes in Tabelle 6.2. beschriebene Schema. Hier verwendeten wir jeweils 5 µl des DNA-Templates, vom Mastermix der Firma Jena BioScience sowie anschließend bezeichnete Primer.

Primer Sim - 23 S - H1: (5' - AGG CAG AGG AAA AGA AAT CAA TTG - 3')
Stammlösung 100 pmol/µl, Arbeitsverdünnung 1:30, entspricht 3,33 pmol/µl

Primer Sim - 23 S - H2: (5' - AAT TTT CGG TTT GGG CTC TTC - 3')
Stammlösung 100 pmol/µl, Arbeitsverdünnung 1:30, entspricht 3,33 pmol/µl

Sonde Sim - 23 S - P : (5' - ATT CCC GTA GTA GCG GCG AGC GA - 3')
enthält 39 nmol, lösen in 7,8 ml Puffer (1mM Tris - HCl, ph 8,0/0,01mM EDTA)
ergibt 5 pmol/µl bzw. 5 µM

Tabelle 6.2. Pipettierschema realtime- PCR Protokoll *Simkania*

Mastermix-Ansatz (MM)				
Reagenz	Konz. Arbeitslg. [pmol/µl]	Konz. im Tube nM	µl je Reaktion	µl gesamt 100 Reaktionen
2XuMM-Puffer	5 x	1 x	5	500
Primer 1 Sim-23S-H1	3,33	300	4,5	450
Primer 2 Sim-23S-H2	3,33	300	4,5	450
Sonde Sim-23S-P			2	200
Wasser			12,75	1275
Template	unterschiedl.	unterschiedl.	1	100
Gesamtvolumen			25	2500

6.4 Micro-Array-PCR

6.4.1 allgemeines Protokoll Micro- Array- PCR

Bevor die Probe auf den Microarray getestet werden kann, muss eine konventionelle PCR zur Amplifikation in eigenen PCR - Tubes durchgeführt werden. Hierbei ist ein Primer Biotin - markiert und bewirkt damit die Biotinylierung des PCR-Produktes.

Im Folgenden ist der von uns benutzte Mastermixansatz sowie das allgemeine Temperatur-Zeit-Profil beschrieben. Hierfür waren ebenfalls wieder 2 getrennte PCR-Protokolle notwendig. Die Spezifika der einzelnen Protokolle sind in den Unterpunkten 6.4.2. und 6.4.3. aufgeführt.

Je 20 µl Ansatz:

- 2 µl 10x Puffer
- 2 µl 2mM dNTP - Mix
- 1 µl MgCl₂
- 0,2 µl Taq - Polymerase 5U/µl
- 7,8 µl H₂O
- 5 µl DNA - Extrakt.

Hierzu wurden jeweils 2 Primer gegeben (die einzelnen Sequenzen in den Abschnitten 6.4.2 sowie 6.4.3 beschrieben)

- 1 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
- 1 µl Primer 2 (10 pmol/µl)

Das Temperatur- Zeit- Profil gestaltet sich wie folgt:

Initiale Denaturierung	96°C	für	60 sec
Denaturierung	94°C	für	30 sec
Annealing	60°C	für	60 sec
Elongation	72°C	für	30 sec
Finale Extention	72°C	für	240 sec

Dieser Zyklus wurde dann 39-mal wiederholt und das Produkt anschließend auf 4°C herabgekühlt.

6.4.2 Primer für Micro-Array - PCR Protokoll *Chlamydiaceae*

Als Primer benutzten wir ein Protokoll, welches im Friedrich-Loeffler-Institut Jena in Zusammenarbeit mit Clondiag Chip Technologies Jena entwickelt wurde.

Es deckt folgendes Spektrum an Chlamydienpezies ab:

Chlamydia trachomatis, *Chlamydia suis*, *Chlamydia muridarum*,
Chlamydia pneumoniae, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci*,
Chlamydia abortus, *Chlamydia felis* und *Chlamydia caviae*.

Für *Simkania negevensis* und *Waddlia chondrophila* wurden die Primer nur im Sinne einer Ausschlussdiagnostik eingesetzt.

Primer: F - U19 F19 5'-ATT GAM AGG CGA WGA AGG A-3'
R - 23R22 Bio 5'-Biotin-GCY TAC TAA GAT GTT TCA GTT C-3'

Target: Domäne 1 des 23S-rRNA-Gen.

6.4.3 Primer für Micro-Array-PCR-Protokoll *Simkania negevensis*

Oben genannte Primer konnten in einer Vorversuchsreihe *Simkania negevensis* - haltige Proben nicht eindeutig detektieren, so dass wir folgendes neue Primerpaar definieren mussten. Für die Primersuche wurde das Programm Primerexpress 2.0 (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet.

Primer: Sim 23 S - H1 5' - AGG CAG AGG AAA AGA AAT CAA TTG - 3'
Sim 23 S - H2 5' - Biotin-GAA GAG CCC AAA CCG AAA ATT - 3'

Target: Domäne 1 des 23S-rRNA-Gen.

Mit diesen neuen Primern gelang es uns nun, *Simkania negevensis* eindeutig zu detektieren.

Beide PCR - Protokolle wurden nebeneinander mit verschiedenen Mastermixen durchgeführt und die PCR - Produkte im Anschluss gemischt.

Das gemischte Endprodukt wurde dann für den Array - Tube - Test zwecks Speziesidentifizierung eingesetzt.

6.5 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein 2 %-iges Agarosegel in eine handelsübliche Horizontal - Elektrophorese - Apparatur gegossen. Dann wurden 8 µl des PCR-Produktes jeweils mit 5 µl Stopplösung vermischt, auf das Agarosegel aufgetragen und bei einer Spannung von 200 V elektrophoretisch aufgetrennt.

Stopplösung:

20	%	Glyzerin
0,2	mol/l	EDTA
0,01	%	Bromphenolblau
0,2	%	Ficoll 400

Im Ergebnis des Elektrophorese - Laufes können die Amplifikationsprodukte unter UV - Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Kamera dokumentiert werden. Zur Kontrolle wurde ein DNA - Größenmarker (100 bp - DNA-Leiter) mitgeführt.

Eine zuverlässige Differenzierung zwischen positiven oder negativen Proben ist aufgrund der geringen Sensitivität der Gelelektrophorese allerdings nicht möglich.

6.6 Array-Tube-Test (AT-Test)

Der Array - Tube - Test wird zur Spezifizierung der in der Micro - Array - PCR gewonnenen PCR- Produkte eingesetzt.

Auf dem Boden des Array-Tube der Firma Clondiag Technologies Jena befindet sich ein 3,4 x 3,4 mm großer Chip, welcher einen 2 x 2 mm großes Array enthält. Folgende Sonden sind auf diesem Array aufgebracht:

- 28 Sonden für 9 verschiedenen Chlamydienspezies
- 3 Genus - spezifische Sonden
- 5 Sonden für *Simkania negevensis* und *Waddlia chondrophila*
- 4 Kontrollsonden
- 1 Sonde für den Biotinmarker

Durch die Bindung einer mit Biotin markierten DNA und durch Sichtbarmachen dieser, ist es möglich, die einzelnen Chlamydienspezies voneinander zu unterscheiden. Dies gelingt mittels Anfärbetechniken sowie Auswertung am PC.

6.6.1 Micro- Array- Hybridisierung

Hier wurden ebenfalls alle AT-Hybridisierungsschritte streng nach dem Protokoll durchgeführt, das im Friedrich-Loeffler-Institut Jena entwickelt worden ist. Dieses Protokoll besteht aus 9 Arbeitsschritten und wird nachfolgend in den Abschnitten 6.6.1.1. bis 6.6.1.9. beschrieben.

Bei allen Pipetierschritten ist es wichtig, den AT-Chip am Boden des Tubes nicht zu berühren. Alle Inkubationsschritte wurden mit dem Thermomixer comfort (Eppendorf, Köln) bei 550 rpm und den jeweils angegebenen Temperaturen bearbeitet.

6.6.1.1 Konditionierung

Nach der Entnahme aus der Verpackung musste der AT-Chip durch zweimaliges Waschen konditioniert werden. Hierfür wurden 500 µl 3 – DNA- Puffer für 5 min in das Tube verbracht und anschließend geschüttelt.

3 - DNA - Puffer: 0,25 M Na₂HPO₄ + 1 mM EDTA + 4,5 % SDS in 1x SSC,
pH = 7,25

Danach wurde der Überstand abpipettiert und verworfen.

6.6.1.2 Denaturierung der DNA

5 µl des mit Biotin markierten und gepoolten PCR - Produktes wurden in 95 µl 3 - DNA - Puffer in einem separatem Tube verdünnt und anschließend für 5 min bei 95°C erhitzt. Danach wurde das Tube kurz anzentrifugiert und auf Eis gestellt.

6.6.1.3 Hybridisierung

Nach Entfernung des letzten Konditionierungspuffers wurde das gekühlte und denaturierte PCR-Produkt in das Array-Tube eingefüllt und bei 58°C für 60 min in den Thermoschüttler verbracht.

Anschließend wurde der Überstand abpipettiert.

6.6.1.4 Erstes Waschen

Das Waschen erfolgte in 3 Schritten, wobei jeweils 500 µl des entsprechenden Waschpuffers in den AT-Chip eingefüllt, für 5 min bei 30°C geschüttelt und der Überstand verworfen wurde.

Die entsprechenden Waschpuffer sind:

1. Waschpuffer: 2 x SSC / 0,1 % Triton
2. Waschpuffer: 2 x SSC
3. Waschpuffer: 0,2 x SSC

6.6.1.5 Blockieren

Es wurde eine frisch zubereitete und auf 30°C vortemperierte Blocking-Lösung verwendet. Es wurden 500 µl pro Tube eingefüllt, für 15 min bei 30°C geschüttelt und anschließend der Überstand verworfen.

Blocking-Lösung: 2%-ige BioLasana - Milchpulverlösung in Hybridisierungspuffer B

Hybridisierungspuffer B: 6 x SSPE / 0,005% Triton X-100 (Quantifoil Micro Tolls GmbH, Jena)

6.6.1.6 Inkubation mit Poly- HRP

Jetzt wurde Streptavidin-konjugiertes Poly-HRP Konjugat 1:10.000 in Hybridisierungspuffer B gelöst, so dass eine Endkonzentration von 10 pmol/µl

entstand. 100 µl dieser Lösung wurden dem Tube zugegeben und für weitere 15 min bei 30°C geschüttelt.

HRP ist der Verdünnungspuffer für das konzentrierte Streptavidin der Firma Clondiag.

Auch hier wurde anschließend der Überstand verworfen.

6.6.1.7 Zweites Waschen

Der zweite Waschschritt erfolgte wie der erste unter Verwendung derselben Chemikalien und desselben Protokolls.

6.6.1.8 Sichtbarmachung der reagierenden Spots

Nach Entfernung der letzten Waschlösung wurde das leere AT auf äußere Verschmutzung geprüft und gegebenenfalls mit Zellstoff äußerlich reinigt. Außerhalb des Readers gaben wir 100 µl Peroxidase-Substrat (SeramunGrün prec, S-011-2-ODI, Fa. Seramun Diagnostica) in das AT.

Aufgrund der enzymatischen Spaltung von SeramunGrün, einem 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin-Derivat (Enzym: Meerrettich-Peroxidase) kommt es zu einem blauschwarzen Niederschlag am positiven Spot.

Dann konnte nach einer Wartezeit von 10 Minuten die Bildaufnahme beginnen.

6.6.1.9 Messung

Wir führten eine Endpunktmessung durch. Dies bedeutet, dass 30 min nach Zugabe der Tetramethylbenzidinlösung das oben offene Mikroarray-Tube in einen auf 25°C vorgeheizten Reader gestellt und damit das angefärbte Muster auf dem Boden des Tubes sichtbar gemacht wurde.

6.6.2 Auswertung der Mikroarray - Tests

Die Hybridisierungssignale wurden mit Hilfe der Software IconoClust, AT-Version 2.5 (Clondiag, Jena) ausgewertet.

Man erhält ein Balkendiagramm, aus dem die Intensitäten der den einzelnen Sonden zuzuordnenden Signale ersichtlich sind.

Folgende Kriterien wurden bei der Auswertung zu Grunde gelegt:

- Ausschlaggebend für die Spezieszuordnung der jeweiligen untersuchten Probe war das Signal der Sonde mit der höchsten Signalintensität (Bsp. für *Simkania negevensis*).
- Zeigten die Sonden zweier unterschiedlicher Spezies ähnlich hohe Intensitäten, kann von einer Mischbesiedlung ausgegangen werden (Bsp. *Simkania negevensis* und *Chlamydia psittaci*).
- Eine Probe wurde als negativ befundet wenn alle Signalintensitäten (siehe Kapitel 6.6.1.8.), ausgenommen den internen Färbekontrollen für den Biotinmarker, unter einer Signalstärke von 0,07 lagen. Zwischen 0,07 und 0,1 existiert eine Grauzone von fraglich positiven Proben. Ab 0,1 wurden alle Proben als positiv bewertet.
- Alle Proben, die in die Grauzone fielen, wurden nochmals durch eine unabhängige Methode (z.B. Sequenzierung) getestet.

6.7 Sequenzierung

Zur Bestätigung unserer Nachweismethode sequenzierten wir einige Proben. Hierbei schnitten wir die betreffenden Banden im Agarose-Gel unter einem UV-Transluminator aus und reinigten die DNA mit QIA- Quick Gel Extraction Kit (Quiagen, Hilden) heraus. Wir gingen streng nach Vorschrift der Firma Qiagen für QIA- Quick Gel Extraktion Kit vor.

Nach der Aufreinigung wurde die Menge an enthaltener DNA mittels spektroskopischer Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt.

Anschließend erfolgte die Sequenzierung mit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Darmstadt). Die Sequenzierungsprodukte wurden mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Darmstadt) analysiert. Die Auftrennung erfolgt in diesem Gerät mittels Kapillarelektrophorese.

Die erhaltene DNA-Sequenz wurde gegen eine vorhandene Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) geblasted, sodass eine genaue Zuordnung der Sequenz zu einer Spezies erfolgen kann.

6.8 Statistische Methoden

Für die statistische Aufarbeitung der Proben wurde Microsoft Office Excel benutzt. Außerdem diente uns dazu ein Konfidenzintervall einer unbekannt Wahrscheinlichkeit. In diesem Fall handelt es sich um das Wilson-Konfidenzintervall. Bei diesem auch als Vertrauensintervall bezeichneten Verfahren kann eine Aussage über die Präzision der Lageschätzung eines Parameters getroffen werden.

Bei der Berechnung unseres Konfidenzintervalles zogen wir die Homepage <http://faculty.vassar.edu/lowry/prop1.html> zu rate.

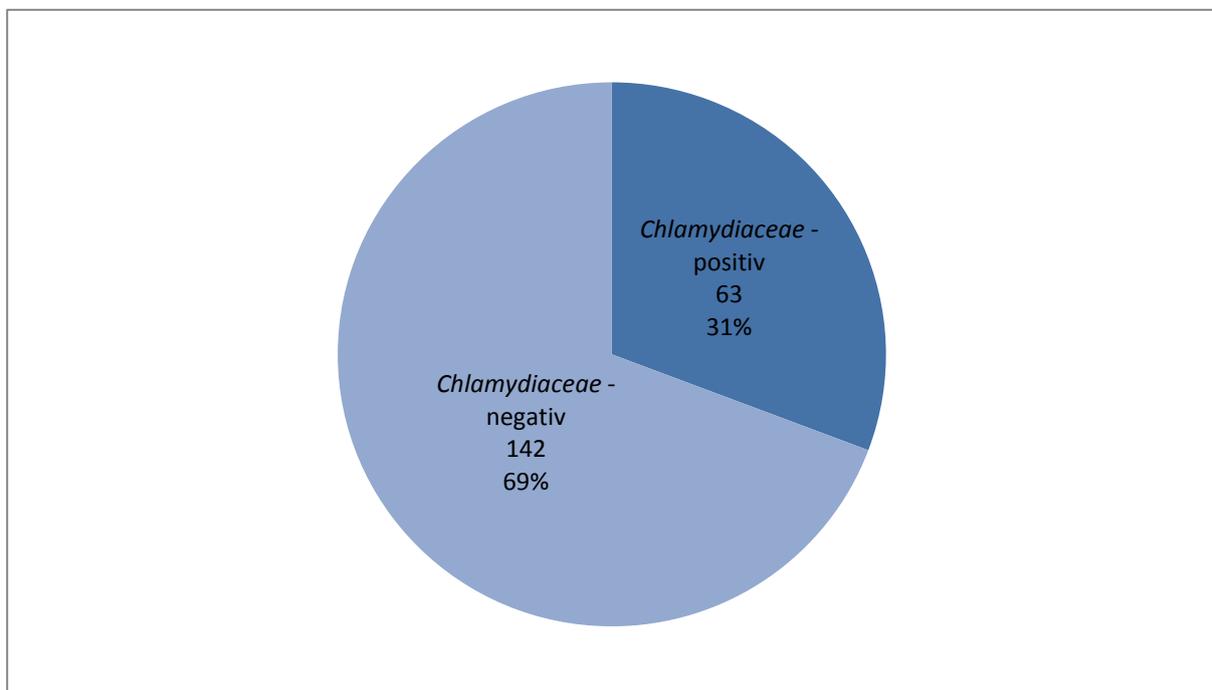
Eine andre statistische Betrachtung wurde nicht angestellt, weil nur eine Gruppe von Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie, jedoch keine gesunde Kontrollgruppe untersucht wurde.

7 Ergebnisse

7.1 Ergebnisüberblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 205 Rachenspülwasser- Proben bearbeitet. In 63 Proben fanden wir DNA von Bakterien der Gattung *Chlamydiaceae*. 142 der untersuchten Proben waren in unseren Testansätzen negativ. Die Ergebnisse sind in Abb. 7.1 zusammengefasst.

Abb 7.1 Gesamtergebnis *Chlamydiaceae*



Bei der statistischen Auswertung stützten wir uns auf die Gesamtanzahl der untersuchten Proben ($n=205$) sowie auf die Anzahl der positiven Proben ($k=63$). Hieraus ergibt sich nun eine Wahrscheinlichkeit von 0,3058, dass eine beliebige Probe aus unserem Probenpool positiv ist.

Im Konfidenzintervall nach WILSON errechneten wir nun für die doppelte Standardabweichung ein Intervall von 0,2469 (untere Grenze) bis 0,3718 (obere Grenze). Dies entspricht einer 95%igen Wahrscheinlichkeit für den Fall, dass die Probenanzahl, im besten Fall auf unendlich viele Proben, vergrößert wird.

Hiermit haben wir bewiesen, dass die Anzahl der untersuchten Proben ausreichend ist, um eine statistisch relevante Aussage zu treffen.

k = <input type="text" value="63"/>	Proportion = <input type="text" value="0,3058"/>
n = <input type="text" value="205"/>	
Reset Calculate	
<i>95% confidence interval: no continuity correction</i>	
Lower limit = <input type="text" value="0,2469"/>	Upper limit = <input type="text" value="0,3718"/>

Abb. 7.2. Berechnung Konfidenzintervall

Interessant war hierbei ein hoher Anteil an *Simkania negevensis*. Dieses Bakterium kam sowohl als allein als auch als Gemisch mit anderen Chlamydien gehäuft vor. Insgesamt waren 59 der mittels AT - Mikroarraytest untersuchten Proben positiv für *S. negevensis*.

Eine weitere relativ häufig gefundene Spezies war *C. psittaci* mit 6 positiven Proben.

Unerwartet niedrig war jedoch der Anteil an *C. pneumoniae*. Lediglich 2 Proben waren hierfür positiv. Alle anderen gefundenen Spezies spielen nur eine untergeordnete Rolle (siehe Abb. 7.2).

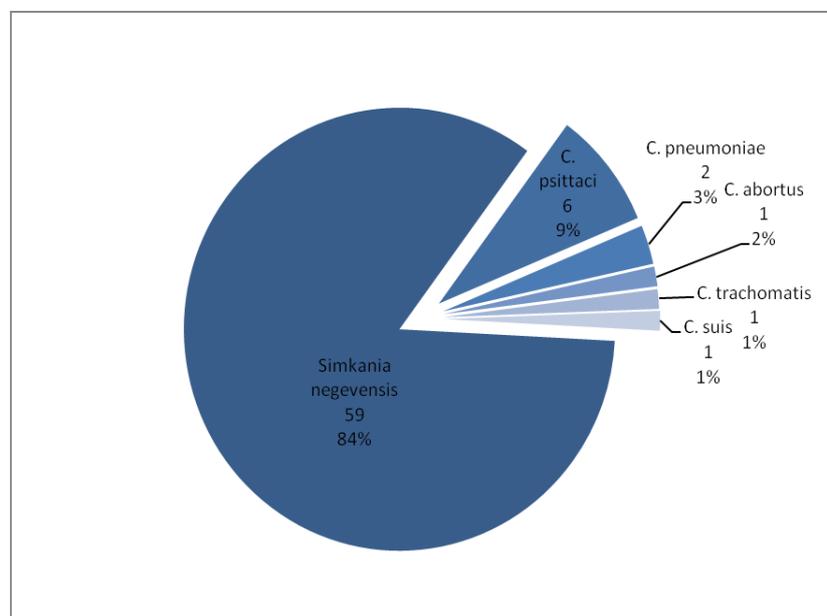


Abb 7.3 Verteilung der einzelnen Spezies

Wichtig für uns war auch die Unterscheidung zwischen dem alleinigen Nachweis einer Spezies und dem Nachweis verschiedener Chlamydien in einer Probe. In einigen Proben konnten wir bis zu 3 Spezies in einer Probe nachweisen. Hierbei zeigte sich, dass der Großteil von 57 Infektionen durch lediglich einen Infektionserreger aus der Gattung *Chlamydiaceae* ausgelöst wurde. In 6 Proben konnten wir eine verschiedene Chlamydien nachweisen.

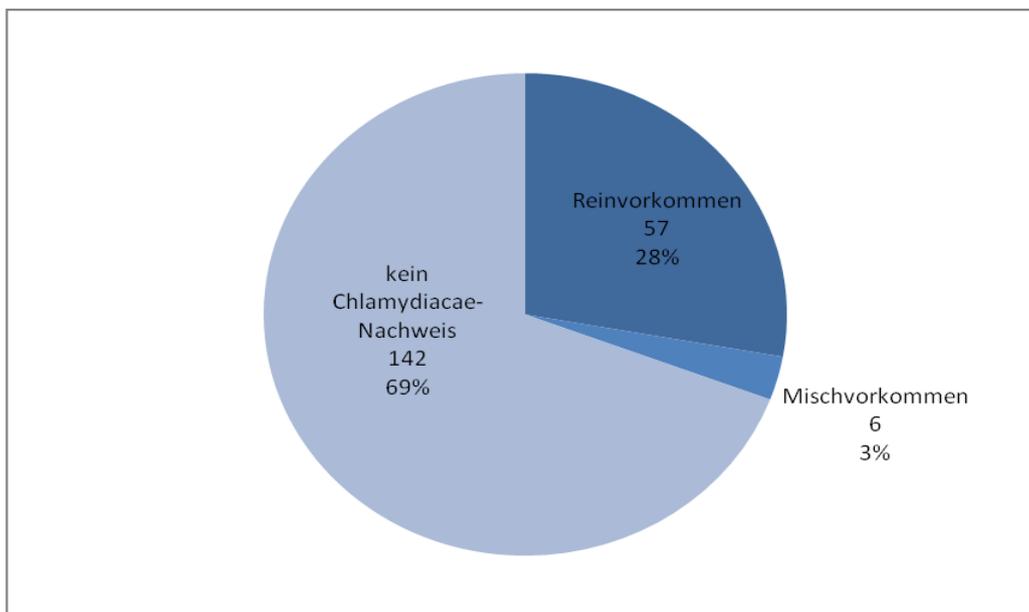


Abb 7.4 Verteilung Rein- und Mischvorkommen

Folgende Tabelle (Tabelle 7.3) gibt nochmals einen Überblick über die erzielten Ergebnisse.

Tabelle 7.3 Gesamtergebnis Einzelspezies

	Spezies	Anzahl	%
Rein- vorkommen	<i>S. negevensis</i>	53	25,9
	<i>C. pneumoniae</i>	2	1,0
	<i>C. psittaci</i>	1	0,5
	<i>C. abortus</i>	1	0,5
Misch- vorkommen	<i>S. negevensis</i> + <i>C. psittaci</i>	4	1,9
	<i>S. negevensis</i> + <i>C. suis</i>	1	0,5
	<i>S. negevensis</i> + <i>C. trachomatis</i> + <i>C. psittaci</i>	1	0,5
	negatives Ergebnis	142	69,3

7.2 Ausgewählte Einzelproben

An den Ergebnissen einzelner Proben soll die von uns entwickelte Vorgehensweise demonstriert werden.

Bei den unten aufgezeigten Diagrammen zeigt die x- Achse jeweils die Anzahl der PCR- Zyklen und die y- Achse die Intensität des Fluoreszenzsignals, welches direkt proportional zum Target- Produkt steht.

Im Fall der Probe 1530 ergab die erste real - time - PCR mit dem Protokoll Simkania ein positives Ergebnis. Die unten links stehende PC - technisch aufgearbeitete Auswertung (Abb 7.5) zeigt sehr klar, dass beide Ansätze positiv sind. Der Ct - Wert als Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert liegt in beiden Fällen unter 40.

In der zweiten real - time - PCR nach Protokoll Chlamydiaceae zeigte nur eine Sonde einen positiven Ausschlag (Abb 7.6), wohingegen der zweite Ansatz sich in der Intensität nicht vom Untergrund abhob. Diese Probe wurde als ein fraglich positives Ergebnis gewertet.

Amplification Plots

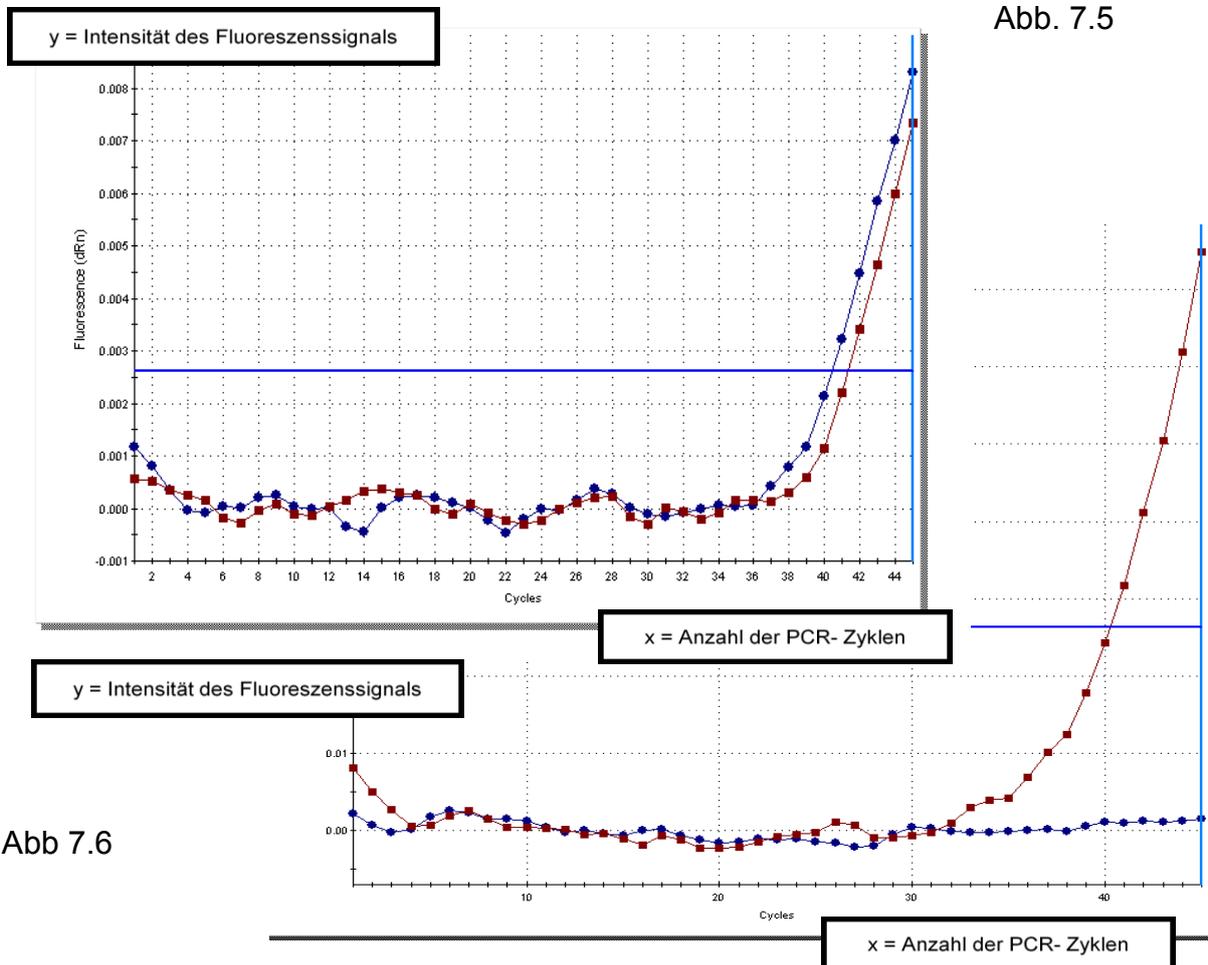


Abb. 7.5

Abb 7.6

Der AT - Test erbrachte eine Klärung. In den folgenden Abbildungen sieht man die Auswertung der Signale, sowohl als Foto des entwickelten Mikroarrays (Abb 7.7 Teil B) als auch als grafische Darstellung der Signalintensitäten (Abb 7.7 Teil A). Dabei wurden ausschließlich die spezifischen Hybridisierungssignale der beiden *Simkania*-Sonden gemessen, so dass eine eindeutige Zuordnung zum Keim *Simkania negevensis* erfolgen konnte.

Bei unten gezeigter Grafik, wie auch bei allen anderen AT- Chip- Auswertungen, zeigt die y- Achse die jeweilige Intensität des Signals, also der in Kapitel 6.6.1.8 beschriebenen Färbung der Spots. Auf der x- Achse sind die Chlamydienspezifischen Sonden aufgeführt. Der Pfeil zeigt jeweils die spezifischen Sonden an, welche reagiert haben und uns damit die Spezies genau anzeigen.

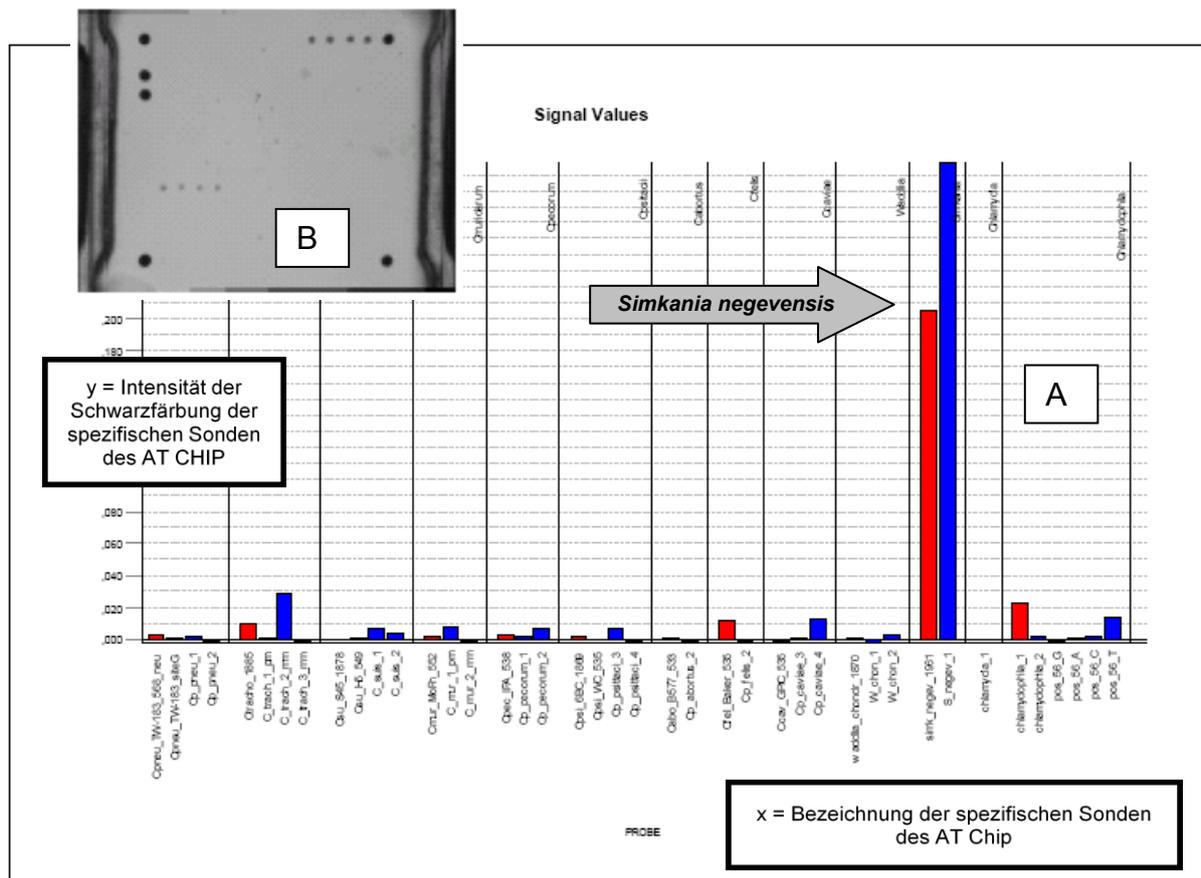
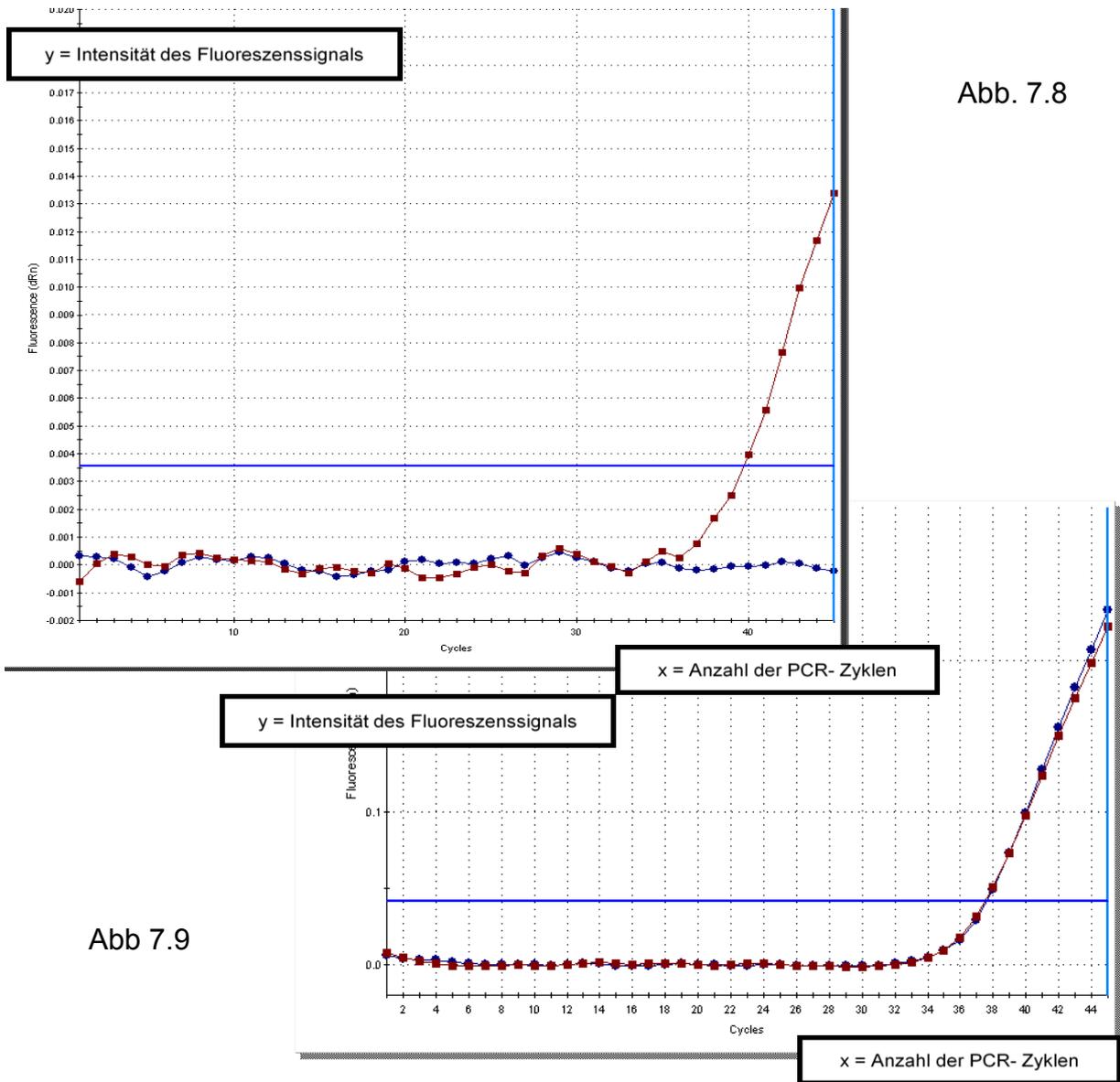


Abb. 7.7 Grafische Darstellung der AT- CHIP- Probe 1530 (Teil A) sowie einem Photo der zentralen Einheit der Probe 1530 (Teil B)

Die anschließend durchgeführte Sequenzierung bestätigte dieses Ergebnis.

Eine weitere wichtige humanpathogene Spezies ist *C. pneumoniae*. Diese Spezies konnten wir ebenfalls mit unserer Methode nachweisen.

Probe 262 zum Beispiel zeigte nach Protokoll *Simkania* in nur einem Ansatz ein positives Ergebnis (Abb 7.8). Die Probe wurde deshalb vorerst als fraglich positiv bewertet. Die zweite Screening - PCR nach Protokoll Chlamydiaceae (Abb 7.9) zeigte zwei positive Kurven und wurde somit als positiv bewertet.



Die Untersuchung mit dem AT-Test führte zur Identifizierung von *C. pneumoniae*.

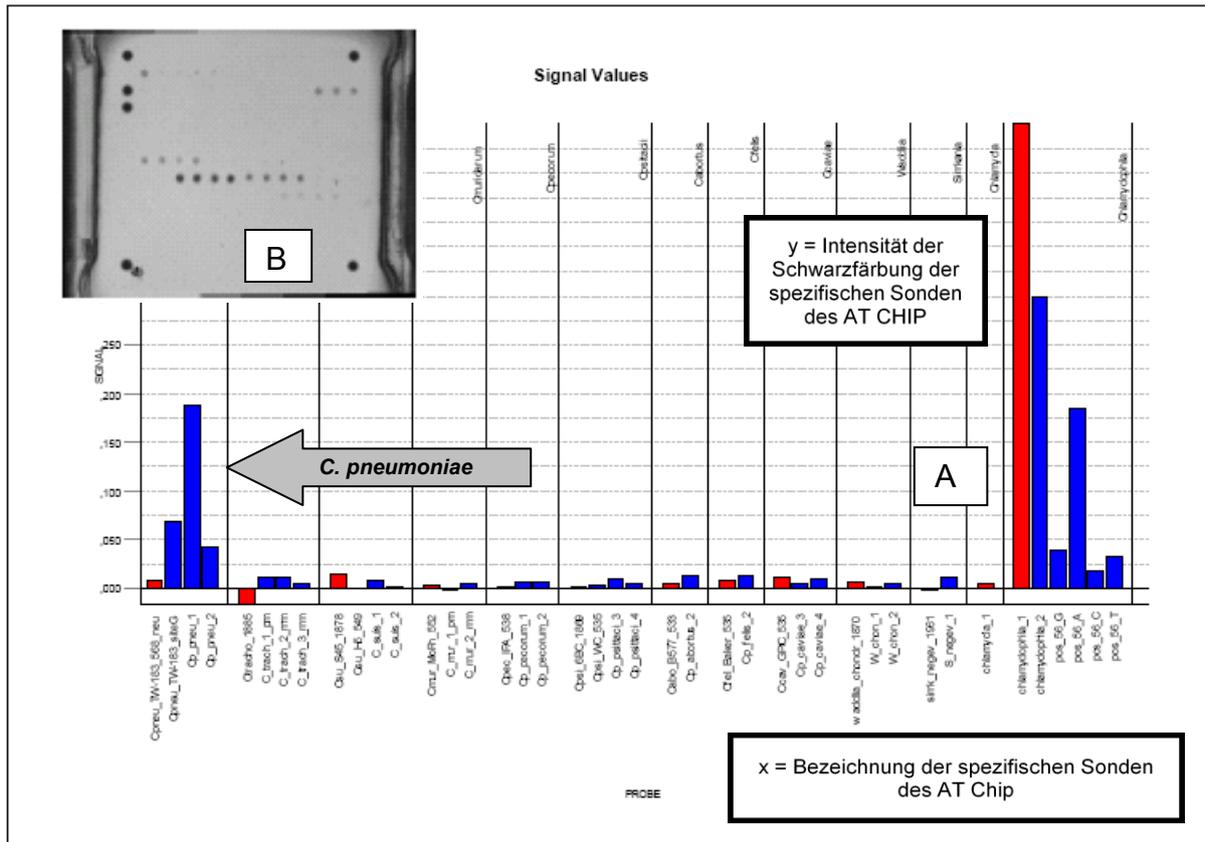
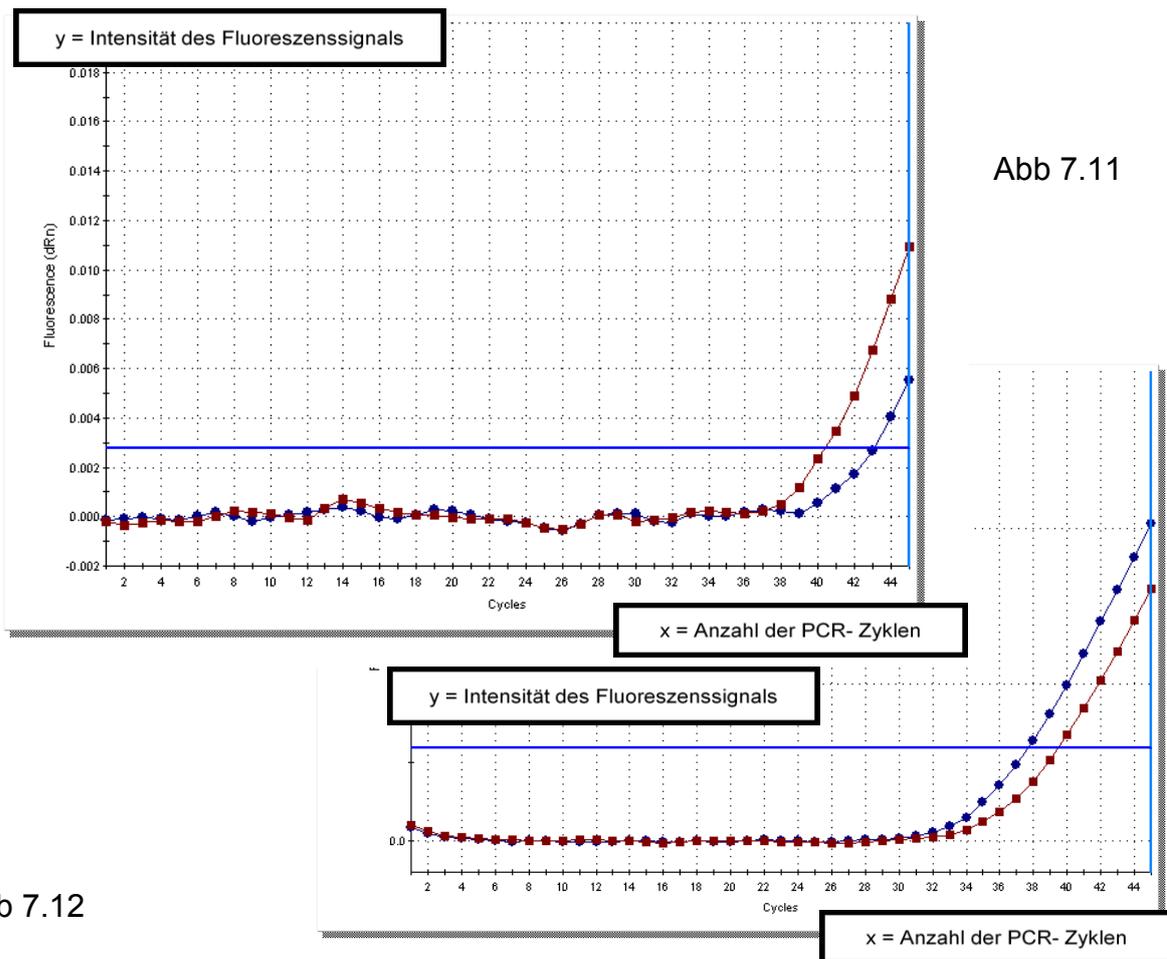


Abb. 7.10 Grafische Darstellung der AT- CHIP- Probe 262 (Teil A) sowie einem Photo der zentralen Einheit der Probe 262 (Teil B)

Wichtig ist auch die Diagnose von chlamydialen Mischinfektionen. Gerade hier liegt die Stärke der Mikroarray - Nachweismethode. Wenn man sonst mit verschiedenen PCR - Protokollen gezielt jeweils nach einer Spezies sucht, reicht es hier aus, nur einen AT - Chip zu bestücken.

Wie wir im Screening feststellten, zeigte sich bei Probe 344 sowohl nach Protokoll *S. negevensis* (Abb 7.11) als auch nach Protokoll Chlamydiaceae (Abb 7.12) ein positives Ergebnis.

Amplification Plots



Der später durchgeführte AT - Test bestätigte dann eine Mischinfektion von *S. negevensis* und *Cp. psittaci* (Abb. 7.13).

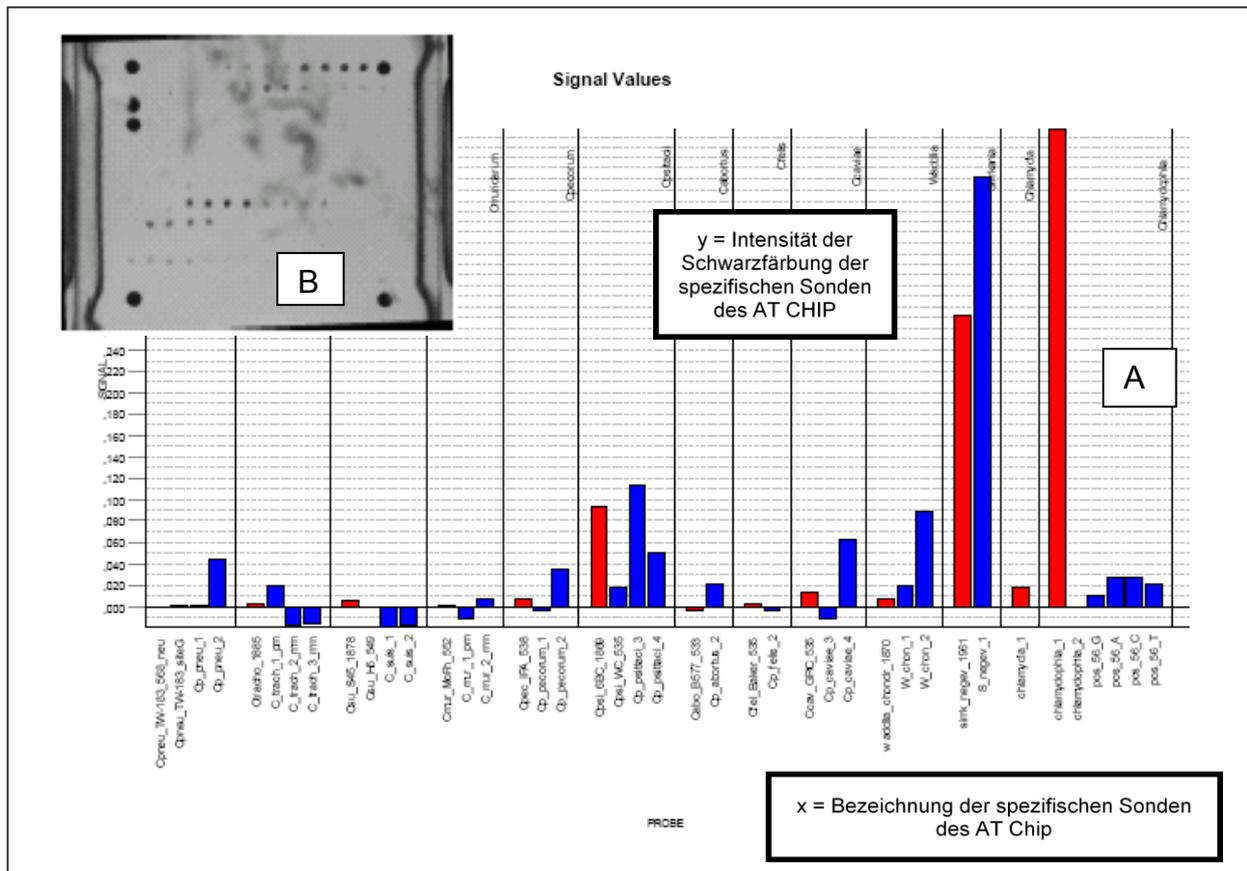


Abb. 7.13 Grafische Darstellung der AT- CHIP- Probe 344 (Teil A) sowie einem Photo der zentralen Einheit der Probe 344 (Teil B)

7.3 DNA-Sequenzierungen

Tabelle 7.4 gibt einen Überblick über die im Rahmen der Arbeit sequenzierten Proben.

Es handelt sich dabei zum einen um Positivkontrollen zur Evaluierung der Versuchsreihe und zum anderen um Proben, die bei der Auswertung aus Screening-PCR und AT-Test im „Graubereich“ lagen und daher nachuntersucht werden mussten.

Tabelle 7.4 Übersicht der sequenzierten Proben.

Probe	Ergebnis			Sequenzierung
	Screening (real - time - PCR)		AT-Test	
	<i>Simkania</i>	<i>Chlamydiaceae</i>		
645	positiv	negativ	<i>S. negevensis</i>	<i>S. negevensis</i>
791	positiv	fraglich positiv	<i>S. negevensis</i>	<i>S. negevensis</i>
1533	fraglich positiv	negativ	<i>S. negevensis</i>	nicht eindeutig
2757	fraglich positiv	positiv	<i>C. psittaci</i>	<i>C. psittaci</i>
2781	negativ	positiv	<i>S. negevensis</i>	<i>S. negevensis</i>
1083	fraglich positiv	negativ	<i>S. negevensis</i>	nicht eindeutig
1299	fraglich positiv	positiv	<i>S. negevensis</i>	nicht eindeutig
2796	negativ	fraglich positiv	<i>S. negevensis</i>	nicht eindeutig
1530	positiv	negativ	<i>S. negevensis</i>	<i>S. negevensis</i>
2236	positiv	negativ	<i>S. negevensis</i>	<i>S. negevensis</i>

Im Anhang dieser Dissertation befindet sich eine Liste mit allen bearbeiteten Proben und den Ergebnissen aus beiden real time-PCR und der Array-Tube-Test-Auswertungen.

Beim genauen Studium werden sich manchmal Abweichungen zwischen dem Screening-Befund und dem Array in der Sequenzierung finden.

Diese erklären sich aus der unterschiedlichen Sensitivität (Nachweisgrenzen) der eingesetzten Methoden. Auch bei aller Sorgfalt gibt es immer wieder Befunde, welche nicht eindeutig in das im Methodenteil beschriebene Schema einzuordnen sind. Deshalb haben wir eine Dreifachdiagnostik aus drei unterschiedlichen DNA-basierten Nachweismethoden, verwendet und alle fraglichen Proben immer im Kontext aller 3 Ergebnisse bewertet. Gab es dann noch Unklarheit, so führten wir eine Sequenzierung durch.

Ein weiteres Problem, welches jede DNA basierte Methode hat, ist die Tatsache, dass in ein solches System immer nur die zum jeweiligen Zeitpunkt bekannten DNA - Sequenzen eingehen können. Mögliche Mutationsformen im Genom der verschiedenen Spezies oder auch unbekanntes atypische Stämme können vom

Nachweissystem nicht erkannt und möglicherweise als falsch - negativ interpretiert werden.

So kam es zum Beispiel vor, dass eine Probe im Screening für *Simkania* negativ, allerdings für *Chlamydiaceae* positiv war. Der anschließende Mikroarraytest erbrachte dann doch eindeutig den Nachweis von *Simkania negevensis* - DNA.

7.4 Verteilung der Häufigkeit von positiven Proben auf die einzelnen Zentren des CAP - Netz

Der hohe Anteil an positiven Proben legte die Frage nahe, ob dies eventuell durch eine Kontamination verursacht sein könnte. So wäre es zum Beispiel denkbar, dass im Puffer der Rachenspülwässer in einem Zentrum des CAPNETZ eine Kontamination vorhanden gewesen könnte, die sich dann in allen Einzelproben wiederfinden würde.

Deshalb überprüften wir die Verteilung der positiven Proben über die jeweiligen Zentren (s. Zusammenstellung in Tabelle 7.5).

Tabelle 7.5 Regionale Verteilung der Häufigkeit von positiven Proben

Herkunftsort	Gesamtzahl der Proben	positive Proben		negative Proben	
		absolut	in Prozent	absolut	in Prozent
Berlin	44	15	34,1%	29	65,9%
Lübeck	44	17	38,6%	27	61,4%
Köln/Bonn	36	8	22,2%	28	77,8%
Rotenburg	35	11	31,4%	24	68,6%
Lüdenschied	16	6	37,5%	10	62,5%
Magdeburg	15	1	6,7%	14	93,3%
Bochum	4	1	25,0%	3	75,0%
Ulm	3	1	33,3%	2	66,7%
Würzburg	1	1	100,0%	0	0,0%

Aus den aufgeführten Daten kann geschlussfolgert werden, dass die Verteilung der positiven Proben in den einzelnen Zentren nicht auf eine Kontamination schließen lässt.

8 Diskussion

8.1 *Chlamydia*-like-organisms sind bei Pneumonieklienten weit verbreitet

Chlamydienähnliche Organismen sind an der Pathogenese von respiratorischen Infektionen beteiligt. Diese Erkenntnis ist nicht neu und in zahlreichen Arbeiten belegt worden.

Wichtige respiratorische Erreger sind *C. pneumoniae* (Heiskanen - Kosma et al., 1999 und Mäurer et al., 2007), *C. psittaci* (Göllner et al., 2006) und *C. abortus* (Pospischil, 2002 und Mijer et al., 2004), die jeweils Pneumonien hervorrufen können. Dies waren auch die Erreger, welche wir in erster Linie bei unserem Probenkollektiv erwarteten.

Infektionen mit *C. trachomatis* waren ebenfalls zu erwarten, denn neben den urogenitalen Infektionen und Erkrankungen der Augen können von diesem Erreger auch Pneumonien bei Neugeborenen hervorgerufen werden.

Für *C. felis* sind zwar Infektionen bekannt, wie beschrieben bei japanischen Tierärzten (Yoshinao Azuma et al., 2006), aber hier erschien uns die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises auf Grund des relativ seltenen Auftretens gering.

Nachweise der anderen Chlamydienspezies, d.h. *C. muridarum*, *C. suis*, *C. caviae* und *C. pecorum*, aus den vorliegenden Proben erwarteten wir nicht, da hierfür auch die Literatur keine Beschreibung einer humanen Infektion liefert.

Es ergab sich eine erste Überraschung, denn eine unserer Proben wies DNA von *C. suis* gemeinsam mit der von *S. negevensis* auf. Dies wurde beim Menschen so bislang noch nicht beschrieben.

Das festgestellte geringe Auftreten von *C. abortus*, *C. psittaci* und *C. trachomatis* war im Bereich des Vermuteten, denn hier spricht auch die Literatur im Zusammenhang mit Pneumonien beim Menschen nur von gelegentlichen Infektionen.

Gerade für *C. abortus* und *C. psittaci* beschränken sich Infektionen meist nur auf Personen mit engem Kontakt zu Vögeln oder Wiederkäuern.

C. psittaci ist als bekannter Erreger der Ornithose und von Infektionen bei anderen Nutztieren, auch für Erkrankungen des menschlichen Respirationstraktes

verantwortlich. Somit war das Vorkommen dieses Keims nicht unerwartet und bestätigte die Ergebnisse vorangehender Arbeiten, wie zum Beispiel Kaibu et al. (2006) und Gaede et al. (2008). Beide Arbeiten beschreiben Erkrankungen durch *C. psittaci* bei Personen mit engem Kontakt zu Zier - bzw Nutzgeflügel. Hierbei ist es wichtig zu erwähnen, das lediglich aviäre Stämme von *C. psittaci* für oben beschriebenes Krankheitsbild ursächlich sind.

Für *C. abortus* liegen Beschreibungen aus der Schweiz vor (Pospischil, 2002), die bei Bergbauern mit engem Kontakt zu Ziegen vermehrt menschliche Aborte zeigten.

Da es sich bei den Probanden allerdings um eine Gruppe von Erkrankten aus ganz Deutschland und aus verschiedenen sozialen Schichten handelte, ist der zu erwartenden Anteil an Landwirten und Ziervogelbesitzern eher gering.

Auf *C. pneumoniae* soll in einem separaten Abschnitt eingegangen werden.

Eine weitere Überraschung dieser Untersuchung war der sehr hohe Anteil an Infektionen mit *S. negevensis*.

Daraus schlussfolgerten wir folgende These:

8.2 Ist *Simkania negevensis* ein neuer Erreger respiratorischer Infektionen beim Menschen?

Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, haben wir in 25,9% der untersuchten Proben *Simkania negevensis* allein und in 2,9 % eine Mischung aus DNA verschiener Chlamydien finden können.

Da alle Proben von Patienten mit einer diagnostizierten ambulant erworbenen Pneumonie stammten, lassen die von uns ermittelten diagnostischen Daten vermuten, dass *S. negevensis* ein neuer Erreger respiratorischer Infektionen beim Menschen ist

Einige Arbeiten aus der Literatur sprechen für diese These. So haben Kahane et al. (2007) nachgewiesen, dass von 34 Kindern mit Pneumonien 76% *S. negevensis*-positiv im Nasenabstrich waren. Fasoli et al. (2007) zeigten, dass sich bei 101 italienischen Kindern mit CAP in 20 - 30 % Antikörper gegen *S. negevensis* fanden.

Auch zwei weitere Arbeiten aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena beschäftigen sich mit der Prävalenz von *S. negevensis*. Beide benutzten eine spezifische PCR als Nachweismethode.

In der einen Arbeit untersuchte Frau Karin Multauf, wie auch diese Dissertation, Proben aus dem CAPNETZ.

Hier wurden von 520 untersuchten Proben 35 positiv auf *S. negevensis* getestet. Dies entspricht 6,7 %.

Tabelle 8.1 Ergebnisübersicht der Arbeit von Karin Multauf

Anzahl der Proben	Simkania negativ	Simkania positiv
520	485	35

Die zweite Arbeit von Frau Julia Herrmann bewertete eine gesunde Kontrollgruppe, also Probanden, die nicht an einer CAP erkrankt waren. Es handelte sich dabei um zufällig rekrutierte Freiwillige aus verschiedenen Alterstufen und sozialen Schichten nach Geschlecht getrennt.

Hier wurde ebenfalls eine spezifische Simkania - PCR als Nachweismethode genutzt. In diesem Probenpool fand sich bei insgesamt 236 Probanden nicht ein einziger Fall einer *Simkania negevensis* - Infektion.

Tabelle 8.2 Ergebnisübersicht der Arbeit von Julia Herrmann

	weiblich n=150	männlich n=86
18-39 J.	132	69
40-59 J.	17	14
60-79 J.	1	3

Wenn wir nun diese Ergebnisse mit den Resultaten unserer Arbeit vergleichen, so stellen wir fest, dass in den Proben mit nachgewiesener Erkrankung *S. negevensis* gefunden wurde und in Proben von gesunden Probanden keine Infektion zu finden war. Dies lässt uns zu dem Schluss kommen, dass *Simkania negevensis* ambulant erworbene Pneumonien hervorrufen kann oder zumindest daran beteiligt ist.

8.3 Der Array-Tube-Test ist eine gute Möglichkeit Mischinfektionen zu diagnostizieren

Ein großer Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit Mischinfektionen in nur einem Test zu diagnostizieren, so dass dadurch eine Reduzierung des Arbeitsaufwandes erreicht werden kann.

Nach dem Aufarbeiten der Proben-DNA und der vorbereitenden PCR, ist der AT - Test in der Lage, verschiedene Proben-DNAs an den entsprechenden Sonden zu binden. So entsteht ein genaues Bild der enthaltenen DNA, welche dann am PC qualifiziert und quantifiziert werden kann. Für die Bestimmung einer Mischinfektion sind keine zusätzlichen Arbeitsschritte nötig.

Eine Alternative wäre eine Reihe separater PCR-Protokolle zum Nachweis für je eine Spezies.

Eine solche Versuchsanordnung wäre aber sehr störanfällig und langwierig, denn für jede einzelne Chlamydienpezies müsste ein eigenes PCR - Protokoll entwickelt, validiert und später in der Routine eingesetzt werden.

Methodenbedingt hätte jede einzelne PCR in der Versuchsanordnung ihre spezifischen Fehlerquellen, wie zum Beispiel das Fehlpipettieren.

Wie bereits beschrieben, fanden wir in 6 Proben Mischinfektionen, wobei jeweils *S. negevensis* mit nachgewiesen wurde, darunter in 4 Proben vergesellschaftet mit *C. psittaci*, in einer Probe mit *C. suis* und in einer weiteren Probe mit *C. trachomatis* und *C. psittaci*.

Auf *C. psittaci* und *C. trachomatis* wurde bereits im Kapitel 8.1 eingegangen.

Das Auftreten von *C. suis* war von uns nicht erwartet worden, denn dieser Erreger konnte bisher lediglich bei Schweinen nachgewiesen werden. Allerdings führt er dort neben Konjunktivitis und Enteritis auch zu Pneumonien.

Es besteht die Möglichkeit, dass hier humane Infektionen auftreten können, ähnlich wie *C. psittaci* und *C. abortus*, welche initial nur bei Vögeln bzw. Rindern gefunden wurden, und sich später auch beim Menschen nachweisen ließen. Hier sind noch weiterführende Untersuchungen nötig.

8.4 Bleibt noch die Rolle von *S. negevensis* bei Mischinfektionen zu klären, denn jede von uns identifizierte Mischinfektionsprobe wies diesen Keim auf. Dies lässt uns die

Frage stellen: „Ist *Simkania negevensis* ein prädisponierender Faktor für respiratorische Infektionen?“Ist *Simkania negevensis* ein prädisponierender Faktor für respiratorische Infektionen beim Menschen?

Im Jahre 2005 veröffentlichten Friedmann et. al (2005) eine Studie, welche sich diesem Thema widmete.

Hier wurden IgG - sowie IgA - Antikörper aus Serumproben von 120 Patienten mit respiratorischen Infektionen mit einer Kontrollgruppe verglichen.

Hierbei zeigte sich, dass in 62% der Patientengruppe und in 46% in der gesunden Kontrollgruppe Antikörper gefunden wurden. Dies beweist eine hohe Durchseuchung mit *Simkania negevensis* in der Bevölkerung.

Auch in unserer Arbeit fanden wir einen hohen Anteil an *Simkania - negevensis* - positiven - Patienten.

Wir denken deshalb, das *Simkania negevensis* eine prädisponierende Rolle bei der Pathogenese der ambulant erworbenen Pneumonie spielt.

8.5 Wo ist *C. pneumoniae* ?

In diesem Probenkollektiv und mit diesem Methodenspektrum fand sich nur eine sehr niedrige Nachweisrate (1,0 %) von *C. pneumoniae*.

Anders als es der Name vermuten lässt, spielt *C. pneumoniae* wahrscheinlich nur eine sehr geringe Rolle in der Pathogenese der CAP. Wenn man in den Lehrbüchern liest, dass *C. pneumoniae* ein wichtiger Erreger respiratorischer Infektionen sei, so scheint sich diese Meinung doch allmählich zu relativieren.

Vor allem, wenn man Proben von erwachsenen Probanden untersucht, erscheint die Quote an *C. pneumoniae* niedrig. Wir fanden unter unseren Proben nur 2 positive, was einer Nachweisrate von 1% entspricht.

In anderen Arbeiten wurden ähnlich niedrige Zahlen gefunden, wie A. Kuhnke (2006), welcher die erregerbasierte oder konstellationsbasierte Therapie der Pneumonie diskutierte. Er beschrieb einen *C. pneumoniae* - Anteil von ca. 2,5%.

Auch in der Arbeit von Wellinghausen et al. (2006), die 578 Proben aus dem CAPNETZ untersuchte, fanden sich lediglich 5 positive Proben. Dies bedeutet 0,9% des Probenmaterials.

Zusammenfassend kann man wohl davon ausgehen, dass *C. pneumoniae* in dem untersuchten Kollektiv nur eine untergeordnete Rolle in der Pathogenese der CAP spielte.

9 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, einen Beitrag zur Erforschung des Erregerspektrums bei ambulant erworbenen Pneumonien zu leisten.

Ambulant erworbene Pneumonien stellen mit ca. 800.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland und einer Letalität von ca. 6-8 %, eine der häufigsten Infektionen in den Industrieländern dar. Trotzdem ist das Erregerspektrum sowie deren Antibiotikaresistenz nicht ausreichend bekannt und damit wirkungsvolle Behandlungskonzepte noch nicht hinreichend etabliert.

Diese Arbeit zielte darauf ab, einen möglichen Beitrag der Chlamydien für die Pathogenese der ambulant erworbenen Pneumonie zu untersuchen.

Weitere Forschungen werden notwendig sein, um zu klären, ob mit der Diagnostik und angepassten Therapie der von uns gefundenen Spezies auch die Prävalenz der CAP gesenkt werden kann.

Es muss auch geklärt werden, ob *Simkania negevensis* für das Auftreten von Pneumonien verantwortlich ist oder ob es sich bei den von uns geführten Erregernachweisen um Fälle mit temporärer Besiedlung des Respirationstraktes durch *Simkania negevensis* gehandelt hat oder ob diesem Bakterium eine äthiologische Rolle bei der Entstehung von CAP zukommt.

In der Diskussion haben wir mögliche Lösungsansätze aufgezeigt, welche durch weitere Arbeiten bestätigt werden müssen.

10 Anhang

10.1 Literaturverzeichnis

PubMed:

Azuma Y., Hirakawa H., Yamashita A., Cai Y., Rahman M.A., Suzuki H., Mitaku S., Toh H., Goto S., Murakami T., Sugi K., Hayashi H., Fukushi H., Hattori M., Kuhara S., Shirai M. (2006)

Genome Sequence of the Cat Pathogen, *Chlamydophila felis*, Oxford Journals

Azzouzi N, Elhataoui M, Bakhatar A, Takourt B, Benslimane A (2007)

Part of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease and asthma, Ann Biol Clin (Paris) 2005 Mar-Apr; 63(2):p. 179-84

Baud D, Thomas V, Arafa A, Regan L, Greub G (2007)

Waddlia chondrophila, a Potential Agent of Human Fetal Death, Emerging Infectious Diseases, Vol.13, No.8 pp.1239-1243

Corsaro D. and Greub G. (2006)

Pathogenic Potential of Novel Chlamydiae and diagnostic Approaches to Infections Due to These Obligate Intracellular Bacteria, Clinical Microbiology Reviews, Apr. 2006, p.283-397

Everett K.D.E., Bush R.M., Andersen A.A. (1999)

Emedes description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including an new genus and five new species, and standards for the identification of organisms, International Journal of Systematic Bacteriology (1999), 49, p. 415 - 440

Everett K.D.E. (2000)

Chlamydia an Chlamydiales: more than meet the eye, Veterinary Microbiology 75 (2000), p.109 – 126

Fasoli L, Paldanius M, Don M, Valent F, Vetrugno L, Korppi M, Canciani M (2007)

Simkania negevensis in community-acquired pneumoniae in Italian children; Scand J Infect Dis 2007 Sep. 28

Friedmann M.G., Dvoskin B., Kahane S. (2003)

Infections with the chlamydia-like micro organism Simkania negevensis, a possible emerging pathogen; Microbes and Infection 5 (2003), pp. 1013-21

Friedmann M.G., Kahane S, Dvoskin B, Hartley J W (2005)

Detection of Simkania negevensis bei culture, PCR and serology in respiratory tract infection in Cornwall, UK; J Clin Pathol 2006;59:331-333

Gaede, W., Reckling, K.-F., Dresenkamp, B., Kenklies, S., Schubert, E., Noack, U., Irmischer, H.-M., Ludwig, C., Hotzel, H., and Sachse, K. (2008) *Chlamydophila psittaci* infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany. Zoonoses & Public Health 55, 184-188

Gerard HC, Dreses- Werringloer U, Wildt KS, Deka S, Oszust C, Balin BJ, Frey WH 2nd, Bordayo EZ, Wittum-Hudson JA, Hudson AP (2006)

Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae in the Alzheimer's brain; FEMS Immunol Med Microbiol. 2006 Dec; p. 355-66

Goellner S., Schubert E., Liebler-Tenorio E., Hotzel H., Saluz H.P., Sachse K. (2006)

Transcriptional Response Patterns of *Chlamydophila psittaci* in Different In Vito Models of Persistent Infection, *Infection and Immunity*, Aug. 2006, p. 4801-4808

Goyal P., Kale S.C., Chaudhry R., Chauhan S., Shah N. (2007)

Association of common chronic infections with coronary artery disease in patients without any conventional risk factors; Indian J Med Res 125, February 2007, pp. 129-136

Heiskanen-Kosma T, Korppi M, Laurila A, Jokinen C, Kleemola M, Saikku P (1999)

Chlamydia pneumoniae is an important cause of community-acquired pneumoniae in school-age children: serological results of a prospective, population-based study, Scand J Infect Dis., 1999; 31(3)

Matthias Horn, Michael Wagner, Karl-Dieter Müller, Ernst N. Schmid, Thomas R. Fritsche, Karl-Heinz Schleifer and Rolf Michel

Neochlamydia hartmannellae gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*, Microbiology, 2000

Kaibu H., Iida K., Ueki S., Ehara H., Shimasaki Y., Watanabe S., Anzai H., Tabeku W., Muta T., Kusaba T., Kishimoto T., Ando S. (2006)

Psittacosis in All Four Members of a Family in Nagasaki, Japan, Jpn. J. Infect. Dis., 59, 2006

Kahane S., Everett K.D.E., Kimmel N., Friedmann M.G. (1999)

Simkania negevensis strain ZT: growth, antigenic and genome characteristics; Intern J of Systematic Bacteriology (1999), 49, pp. 815-20

Kahane S, Greenberg D, Newman N, Dvoskin B, Freidman MG (2007)

Domestic water supplies as a possible source of infection with *Simkania*; J Infect. 2007; 54 (1): pp.75-81

Kuhnke A., Welte T., Suttorp N. (2006)

Pneumonie – erregerbasierte oder konstellationsbasierte Therapie?
Internist 2006 (1) S.14-19

Kumar S, Kohlhoff SA, Gelling M, Roblin PM, Kutlin A, Kahane S, Friedman MG, Hammerschlag MR (2005)

Infection with *Simkania negevensis* in Brooklyn, New York., Pediatr Infect Dis J. 2005 Nov; 24 (11): 989-92

Liebermann D, Dvoskin B, Liebermann DV, Kahane S, Friedmann MG (2002)

Serological evidence of acute infection with the Chlamydia-like micro organism *Simkania negevensis* (Z) in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease; Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002 Apr; 21 (4) pp. 307-9

Mäurer A.P., Mehlitz A., Mollenkopf H.J., Meyer T.F., (2007)

Gene Expression Profiles of *Chlamydophila pneumoniae* during the Developmental Cycle and Iron Depletion-Mediated Persistence, PLoS Pathogens, June

Mijer A, Brandenburg A, de Vries J, Beentjes J, Roholl P, Dercksen D (2004)

Chlamydophila abortus infection in a pregnant woman associated with indirect contact with infected goats, Eur J Clin Microbiol Infect Dis., Jun 2004

Paradowski B, Jaremko M, Dobosz T, Leszek J, Noga L (2007)

Evaluation of CSF- *Chlamydia pneumoniae*, CSF- Tau, and CSF- Abeta42 in Alzheimer's disease and vaskulär dementia; J Neurol. 2007 Feb. p. 154-9

Pospischil A, Thoma R, Hilbe M, Grest P, Zimmermann D, Gebbers JO, (2002)

Abortion in humans caused by *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1), Schweiz Arch Tierheilkd., Sep. 2002

Sachse K., Grossmann E. (2002)

Chlamydial diseases of domestic animals – Zoonotic potential of the agents and diagnostic issues, Dtsch. tierärztliche Wochenschrift 109, S. 142 - 148

Sachse K., Hotzel H., Slickers P., Ellinger T., Ehrlich R. (2005)

DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila* ssp., Molecular and Cellular Probes 19, p. 41 – 50

Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Mäkelä PH, Huttunen JK, Valtonen V. (1988) Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. Lancet. 1988 Oct 29;2(8618):983-6.

Tomioka H, Sakurai T, Hashimoto K, Iwasaki H (2007)

Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: role of Chlamydomphila pneumoniae infection; Respirology 2007, 12 (5), p.700-6

Walder G, Meusburger H, Hotzel H, Oehme A, Neunteufel W, Dierich MP, Würzner R.: Chlamydomphila abortus pelvic inflammatory disease. Emerg Infect Dis. 2003 Dec;9(12):1642-4

Wellinghausen N, Straube E, Freidank H, von Baum H, Marre R, Essig A (2006)

Low prevalence of Chlamydia pneumoniae in adults with community-acquired pneumoniae, Int J Med Microbiol., 2006 Nov; p. 458-91

Internet:

<http://www.clondiag.com/products>

www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/

www.capnetz.de

<http://faculty.vassar.edu/lowry/prop1.html>

Lehrbücher:**Herbert Hof, Rüdiger Dörries**

Duale Reihe - Medizinische Mikrobiologie, 2005, 3. Auflage, Georg Thieme Verlage, S. 447 – 451

Hartmut Lode und Ralf Stahlmann

Taschenbuch der angewandten Infektiologie, 1996, Zett-Verlag, Steinen, S.63 – 68

Gerd Herold

Innere Medizin, 2006,

10.2 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre nicht zustande gekommen, wenn ich nicht breite Unterstützung und Hilfe gehabt hätte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Eberhard Straube für die Übernahme und Betreuung meiner thematischen Fragestellung. Insbesondere danke ich ihm auch für die Unterstützung, die er mir während unserer Zusammenarbeit gewährt hat und für die Ansprechbarkeit und Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit.

Ferner sei an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Konrad Sachse sowie Herrn Dr. Helmut Hotzel vom Friedrich- Löffler-Institut in Jena gedankt, für die Hilfe bei der Entwicklung und praktischen Durchführung des Versuchsaufbaus sowie für die kreativen Diskussionen und fachlichen Hinweise.

Ein großes Dankeschön auch für die Geduld und Unterstützung bei der Laborarbeit an Christine Grajetzki, Simone Bettermann und Byrgit Hofmann

Meinen Eltern, Schwiegereltern und Großeltern sei gedankt, dass sie mir meinen Lebensweg, das Studium und die Promotion ermöglicht und mich in allen Lebenslagen unterstützt haben. Danke auch für die stilistischen und orthografischen Korrekturvorschläge.

Zum Schluss sei meiner Ehefrau Franzi für die allgegenwärtige Geduld, Unterstützung und Aufmunterung gedankt.

10.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller- Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. Eberhard Straube

Dr. Konrad Sachse

Dr. Helmut Hotzel

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum Unterschrift des Verfassers

10.4 Lebenslauf

Peer Heinz

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 26. Juli 1978 in Bad Langensalza
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

Juni 1997 Abitur am Salza- Gymnasium in Bad Langensalza

Medizinische Ausbildung

10/2002 - 12/2008 vorklinisches und klinisches Studium an der FSU Jena
Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

01/2009 - 09/2009 Klinik für Urologie Südharzkrankenhaus Nordhausen
CA Dr. Beintger

10/2009 - 09/2010 Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie Hufeland
Krankenhaus Bad Langensalza
CA PD Dr. Schreiber

10/2010 - 07/2012 Belegabteilung für Urologie Hufeland Krankenhaus Bad
Langensalza
CA Dr. Al- Ani

ab 08/2012 Klinik für Urologie Helios Klinikum Gotha
CA Dr. Krautschick-Wilkens

Promotion

Bearbeitet seit 2005

Institut für medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller- Universität Jena

betreuender Hochschullehrer: Prof. Dr. Eberhard Straube

10.5 tabellarische Gesamtübersicht aller bearbeiteten Proben