

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene

Direktor: Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel

**Bedeutung
von Antikörpernachweisen
gegen *Chlamydomyxa pneumoniae*
bei intubierten Patienten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung

der medizinischen Doktorwürde

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von

Jan Guggemos

aus Berlin

Referent: PD Dr. Ralf Ignatius

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Chr. Bauer

Gedruckt mit Genehmigung der
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am 19. 9. 2008

Erklärung

Ich, Jan Guggemos, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationschrift mit dem Thema: „Bedeutung von Antikörpernachweisen gegen *Chlamydophila pneumoniae* bei intubierten Patienten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den

Jan Guggemos

Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

AEP: Ambulant erworbene Pneumonie	IFU: Einschlusskörper formierende Einheit (inclusion forming unit)
AK: Antikörper	IOP: interdisziplinäre Intensivstation
BAL: bronchoalveoläre Lavage	IgA: Immunglobulin A
BGA: arterielle Blutgasanalyse	IgG: Immunglobulin G
BSA: bovines Serumalbumin	IgM: Immunglobulin M
CAP: ambulant erworbene Pneumonie (community aquired pneumonia)	ITS: Intensivstation
CAPNETZ: Kompetenznetz Ambulant Erworbene Pneumonie	LPS: Lipopolysaccharid
CBF: Charité, Campus Benjamin Franklin	MIF: Mikroimmunofluoreszenztest
CFR: case fatality rates	MOMP: Hauptprotein der äußeren Zellmembran (major outer membrane protein)
COPD: Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)	NCBS: Serum neugeborener Kälber (new born calf serum)
CMV: Cytomegalievirus	NH ₄ -Puffer: Ammonium-Puffer
CRP: C-reaktives Protein	OD-Wert: Wert der optischen Dichte
DNA: Desoxyribonukleinsäure	PAC: arterieller Pulmonalkatheter (pulmonalis artery catheter)
DTT: Dithiotreitol	PBMC: Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (peripheral blood mononuclear cells)
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure (ethylendiamintetraacetic acid)	PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
EK: Erythrozytenkonzentrat	PCR: Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
ELISA: enzymgebundener Antigen-Antikörper-Reaktionstest (enzyme linked immunosorbent assay)	RNS: Ribonukleinsäure
FDA: Föderale Medikamenten- und Nahrungsmitteladministration der Vereinigten Staaten von Amerika (Federal Drug and Food Administration, USA)	TK: Thrombozytenkonzentrat
FFP: gefrorenes Plasmakonzentrat (fresh frozen plasma)	TBE: Trisborate-EDTA (endothelin derived tissue activating factor)
FKS: fötales Kälberserum	TRIS/BOR: Trisborate
HIV: menschliches Immunschwäche Virus (human immunodeficiency virus)	TMB: Tetramethylbenzidin 3,3',5,5'
HRP: Meerrettich Peroxidase (horse radish peroxidase)	ZVK: zentraler Venenkatheter

1 Einleitung

1.1 Pneumonie	8
1.1.1 Epidemiologie	8
1.1.2 Erregerspektrum	9
1.1.3 Bakterielle Erreger interstitieller Pneumonien	10
1.2 <i>C. pneumoniae</i>	11
1.2.1 Teilungszyklus	11
1.2.2 Epidemiologie	12
1.2.3 Übertragung	13
1.2.4 Klinische Symptome	13
1.2.5 Therapie	16
1.3 Mikrobiologische Diagnostik bei Infektionen durch <i>C. pneumoniae</i>	17
1.3.1 Serologische Erregernachweise	17
1.3.2 Molekularbiologischer Nachweis	19
1.3.3 Kulturnachweis	19
1.4. Beobachtung und Fragestellungen	20

2 Material und Methoden

2.1 Materialverzeichnis	21
2.2 Retrospektiver Untersuchungsteil	23
2.2.1 Patientenauswahl	23
2.2.2 Untersuchungsdaten, die für den Vergleich der beiden Gruppen herangezogen wurden	23
2.2.3 Auswahl der Daten	25
2.3. Prospektiver Untersuchungsteil	27
2.3.1 Patientenauswahl	27
2.3.2 Untersuchungsmaterial	27
2.3.3 Untersuchungsmethoden	28
2.3.3.1 Kommerzieller ELISA-Testkit für den Nachweis von IgG – bzw. IgA-Antikörpern gegen <i>C. pneumoniae</i>	28
2.3.3.2 PCR für den Direktnachweis von <i>C. pneumoniae</i> ..	31

Inhalt

2.3.3.3 Etablierung von PCR und Nested-PCR	41
2.3.4 Analyse des Aktenmaterials der Patienten mit positiven Seroantikörpern und positivem Direktnachweis	42
2.4 Statistik	42
3 Ergebnisse	
3.1 Retrospektiver Untersuchungsteil	43
3.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse des retro- spektiven Teils	43
3.2 Prospektiver Untersuchungsteil	44
3.2.1 Ergebnisse der Untersuchung von BAL-Proben	46
3.2.2 Korrelation von PCR- zu ELISA –Ergebnissen	48
3.2.3 Analyse der Krankenakten der Patienten mit Antikörpernachweis gegenüber Chlamydia pneumoniae-spezifischem Antigen und positiver PCR in der BAL-Flüssigkeit	50
4 Diskussion	61
5 Anhang	71
6 Zusammenfassung	75
7 Literatur	77
8 Lebenslauf und Danksagungen	91

1 Einleitung

1.1 Pneumonie

1.1.1 Epidemiologie

Die ambulant erworbene Pneumonie ist die fünfthäufigste Todesursache weltweit, sowie die häufigste Infektionskrankheit in der westlichen Welt (LOPEZ 1998).

In den USA ist die Letalität für Pneumonien im Zeitraum von 1975–1995 nicht gesunken, obwohl zur selben Zeit diverse gut wirksame Antibiotika auf den Markt kamen, die gegen bakterielle Erreger von Pneumonien wirksam sind. Die Pneumonie steht daher nach wie vor an 6. Stelle der Todesursachen in den USA (CDC 1995). Keine andere Infektion führt dort so oft zum Tod wie die Pneumonie (BARTLETT 1995). 5,6 Millionen Fälle ambulant erworbener Pneumonien treten jedes Jahr in den USA auf. 1,1 Millionen müssen davon in ein Krankenhaus aufgenommen werden; von diesen Patienten sterben 12% (Letalität bei hospitalisierten Patienten) (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2001). Vergleichbare epidemiologische Daten liegen für die Bundesrepublik Deutschland nicht vor, aber auch in der Bundesrepublik Deutschland ist die Pneumonie die am häufigsten zum Tod führende Infektion. Allein 20.976 Menschen starben im Jahr 2005 in der Bundesrepublik Deutschland an Pneumonien. Dies entsprach 2,5% aller Todesfälle (STATISTISCHES BUNDESAMT 2005). Genauere Daten liegen nur für die im Krankenhaus behandelten Patienten vor (WELTE 2003). Das statistische Bundesamt gibt für das Jahr 1998 insgesamt 239.000 Patienten an, die mit der Hauptdiagnose Pneumonie in deutschen Krankenhäusern behandelt wurden. Da das Verhältnis zwischen ambulant und stationär behandelten Pneumoniepatienten wahrscheinlich 2:1 liegt, muss mit ungefähr 750.000 Fällen ambulant erworbener Pneumonien (Community Acquired Pneumonia, CAP) pro Jahr in Deutschland gerechnet werden (WELTE 2004).

1.1.2 Erregerspektrum

Man unterscheidet ambulant erworbene und nosokomial erworbene Pneumonie. Pneumonien, die außerhalb des Krankenhauses entstehen, werden als ambulant erworben bezeichnet. Unter nosokomialer Pneumonie wird dagegen jede Infektion verstanden, die im Krankenhaus erworben wurde und mindestens 48 Stunden nach Aufnahme oder in den ersten 14 Tagen nach Entlassung auftritt. Ferner wird klinisch bei Pneumonien eine Lobär- und eine interstitielle Pneumonie unterschieden.

Das Erregerspektrum der Pneumonie verursachenden Bakterien, Viren und Pilze ist breit. Bakterielle Erreger, die vorwiegend eine interstitielle Pneumonie verursachen, sind in Tabelle 1 fett gedruckt.

Anzumerken ist, dass Viren ebenfalls vorwiegend interstitielle Pneumonien verursachen.

Tabelle 1: Häufige Erreger von Pneumonien (MAUCH 1999)

Erreger	Ambulant erworben	% Häufigkeit	Nosokomial erworben	% Häufigkeit
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Pneumokokken)	40–60	Enterobacteriaceae	60
	<i>Haemophilus influenzae</i>	4–15	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2–18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	4–15	<i>Legionella pneumophila</i>	< 1
	<i>Legionella pneumophila</i>	1–5	Candida	< 1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2–10	Aspergillen	< 1
	Viren (Influenza-, Adeno-, RS-, Parainfluenza-, Entero-, ECHO-Viren)	5–20	Viren	10

1.1.3 Bakterielle Erreger interstitieller Pneumonien

M. pneumoniae, *C. pneumoniae* und *Chlamydophila psittaci* verursachen vorwiegend interstielle Pneumonien. Circa 50% aller ambulant erworbenen Pneumonien werden durch Erreger interstitieller Pneumonien verursacht oder mit verursacht, da Mischinfektionen vorkommen (RUIZ-GONZALEZ 1999, PORATH 1997, MARRIE 1996, STEINHOFF 1996, MARSTON 1997). Der Zusammenhang zwischen Klinik und Nachweis der einzelnen Erreger ist mitunter schwer herzustellen. Auch ist zu vermuten, dass einige Erreger von Pneumonien noch nicht entdeckt worden sind und somit die Rate der „Pneumonien unklarer Ursache“ relativ hoch ist. Fang et al. (FANG 1990) hatten bereits 1990 auf die Bedeutung einer Erregerdiagnose der ambulant erworbenen Pneumonie hingewiesen.

Nur in 40–50% der Fälle kann eine Erregerdiagnose bei ambulant erworbenen Pneumonien gestellt werden (PLOUFFE 2000). So berichten Marston et al. (MARSTON 1997) in einer Studie über 14.000 Patienten aus einer Population von ca. 1.038.000 Einwohnern einer Gemeinde in den USA, bei denen Inzidenz und Mortalität von ambulant erworbenen Pneumonien ermittelt wurden. Von diesen 14.000 im Krankenhaus aufgenommenen Patienten wurden 2.776 mit der Diagnose „ambulant erworbene Pneumonie“ behandelt. Bei einer Inzidenz von 267/100.000 betrug die Mortalität 8,8/100.000 und nur bei 40% wurde eine Erregerdiagnose gestellt. Bates et al. (BATES 1992) konnten in einer Untersuchung an 154 Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie trotz eines hohen diagnostischen Aufwandes in nur 79 Fällen einen Erreger nachweisen. Ishida et al. (ISHIDA 1998) wiesen bei 61% von 318 hospitalisierten Patienten mit CAP mikrobiologisch Erreger nach, die eine ambulant erworbene Pneumonie verursachten. Vier Prozent der Patienten wiesen positive Antikörper gegen *C. pneumoniae* auf. Die Studie wurde prospektiv über 3 Jahre durchgeführt.

1.2 *C. pneumoniae*

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien. Es gibt drei human-pathogene Spezies der Gattung: *C. trachomatis*, *C. psittaci* und *C. pneumoniae*. Zunächst 1986 als TWAR, wegen der zuerst isolierten Stämme TW-183 und AR-39 nach den Initialien der betroffenen Patienten bezeichnet (GRAYSTON 1986), wurde die zuletzt entdeckte Spezies ab 1989 *Chlamydia pneumoniae* (GRAYSTON 1989) und ab 1999 *Chlamydophila pneumoniae* genannt (EVERETT 1999).

1.2.1 Teilungszyklus

Die Reproduktionsweise von *C. pneumoniae* ähnelt dem viralen Vermehrungszyklus. Das Bakterium ist für seine obligat intrazelluläre Vermehrung auf eukaryote Zellen angewiesen, die ihm die Energie in Form von Nukleotiden (Adenosintriphosphat oder Guanosintriphosphat) zur Teilung zur Verfügung stellen; es verhält sich somit als Energieparasit. *C. pneumoniae* kann in einer extrazellulären, stoffwechsellinaktiven und einer intrazellulären, stoffwechselaktiven Form vorliegen. Die extrazelluläre Form (Elementarkörperchen) ist die metabolisch inaktive, aber infektiöse Form des Erregers. Die Elementarkörperchen haben eine kräftige Zellwand, bestehend aus LPS, die ihnen das Überleben außerhalb der Wirtszelle ermöglicht (KUO 1995). Vermehren sich die Chlamydien intrazellulär zu hohen Zahlen, so bilden sie Einschlusskörperchen. Nach 24–48 h füllen die Einschlüsse die Wirtszellen nahezu komplett aus und führen letztlich zur Lysis der Zelle und Freisetzung infektiöser Elementarkörperchen (Abb. 1, RUPP 2003).

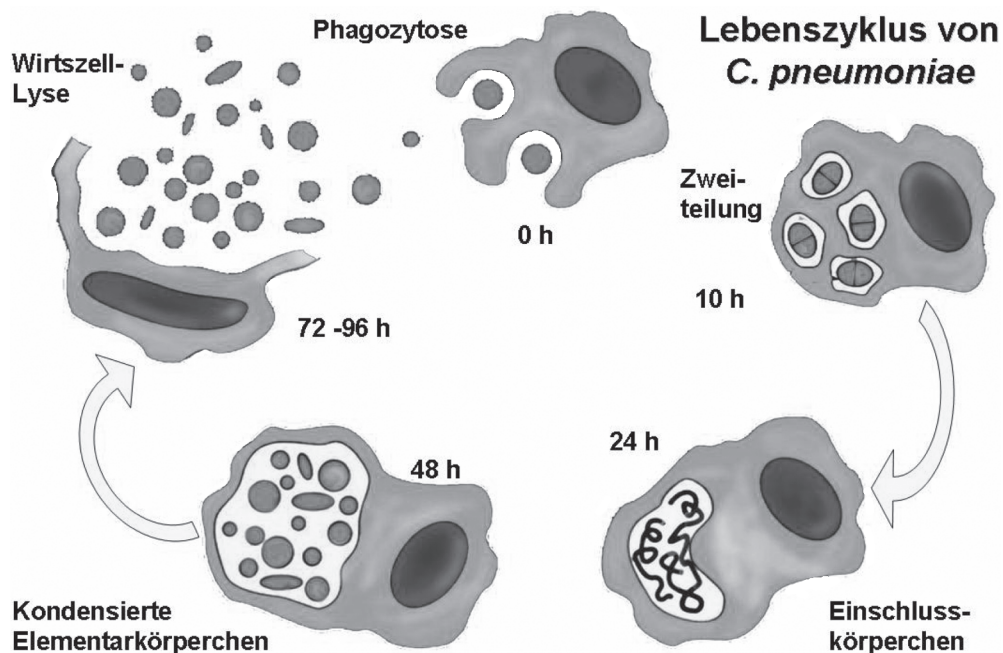


Abb. 1 Lebenszyklus von *C. pneumoniae*, (RUPP 2003)

Der obligat intrazelluläre Vermehrungszyklus erschwert den Nachweis von *C. pneumoniae* (MAAS 1994)

1.2.2 Epidemiologie

Nach Aldous und Kauppinen (ALDOUS 1992, KAUPPINEN 1995), verursacht *C. pneumoniae* etwa 10% aller ambulant erworbenen Pneumonien (siehe auch Tabelle 1).

Die Seroprävalenz von *C. pneumoniae* liegt in den USA bei über 50% bei Erwachsenen (FORSEY 1986, WANG 1986, WANG 1990). In vielen anderen Ländern wie z. B. Spanien, Finnland und Israel liegen die Durchseuchungstiter ähnlich hoch (MARTON 1992, MONTES 1992, KAUPPINEN 1995, BEN-YAAKOV 2002, TRIGA 2002), in Japan etwas niedriger (ISHIDA 1998).

Die Erstinfektion mit *C. pneumoniae* findet vor allem im Schulkindalter statt. Die Seroprävalenz steigt bei Kindern zwischen 5 und 14 Jahren

stark an und hat mit 20 Jahren 50% erreicht (GRAYSTON 1990). Bei den > 60-jährigen beträgt sie 75% (THOM 1994). Dieser Anstieg der Durchseuchungstiter lässt vermuten, dass Menschen im Laufe ihres Lebens infiziert und reinfiziert werden, der Erreger eventuell sogar persistiert (PATNODE 1990, HAMMERSCHLAG 1992).

1.2.3 Übertragung

Menschen sind das einzig bekannte Reservoir für *C. pneumoniae*. Die Übertragung erfolgt wahrscheinlich per Tröpfcheninfektion (ALDOUS 1992) (GRAYSTON 1993). Dabei scheint nicht nur die Übertragung von Bakterien durch akut kranke Personen sondern vor allem durch symptomfreie Personen in der Ausheilungsphase eine Rolle zu spielen (KLEEMOLA 1988). Die Inkubationszeit der Infektion beträgt mehrere Wochen und ist damit länger als bei den meisten anderen pathogenen Bakterien, die Krankheiten der Atemwege hervorrufen, wie z. B. *S. pneumoniae*, *H. influenzae* oder *M. pneumoniae* (MORDHORST 1994, KISHIMOTO 1994).

1.2.4 Klinische Symptome

C. pneumoniae kann bei immunkompetenten Patienten Pneumonie, Bronchitis und Sinusitis verursachen (GRAYSTON 1986, GRAYSTON 1992, GRAYSTON 1993, THOM 1990, STEINHOFF 1996). Die Infektion bleibt häufig asymptomatisch oder nicht entdeckt, da aufgrund der milden Symptomatik kein Arzt aufgesucht wird (KUO 1995). Myashita et al. (MYASHITA 2001) wiesen bei 60,9% von 1.018 asymptomatischen Patienten positive Antikörper gegen *C. pneumoniae* nach. Die Arbeitsgruppe von Hyman et al. (HYMAN 1995) wies bei 19 von 104 asymptomatischen Patienten positive Antikörpernachweise gegen *C. pneumoniae* nach. In etwa 10% aller Infektionen kommt es zu einer schweren symptomatischen Manifestation im Sinne einer CAP (KUO 1995). Es gibt kein spezifisches Muster von Symptomen, die mit einer Infektion mit *C.*

pneumoniae einhergehen, und sie ist schwierig von Infektionen des Atemtrakts anderer Genese abzugrenzen (FILE 1999, MARRIE 2003). Häufige Symptome sind Pharyngitis, eventuell verbunden mit Heiserkeit, sowie prolongierter Husten. Charakteristisch ist der subakute Verlauf der Erkrankung (MIYASHITA 2003). Fieber besteht seltener zum Zeitpunkt der Untersuchung, ist häufiger aber in der vorherigen Anamnese eruierbar. Die Mehrzahl der Patienten hat keine Leukozytose, die Blutsenkungsgeschwindigkeit ist mitunter erhöht, ebenso das CRP. Im Röntgen-Thorax kann eine interstitielle pulmonale Zeichnungsvermehrung und ein diffuses feinfleckiges interstitielles Infiltrat nachweisbar sein (McCONNEL 1994).

Abb. 2 zeigt den Verlauf einer *C. pneumoniae*-assoziierten Pneumonie. Im Röntgen-Thoraxbild links ist eine homogene Verdichtung peripher und ein vergrößerter linker Hilus gegenüber der Voraufnahme (rechtes Bild) zu erkennen.

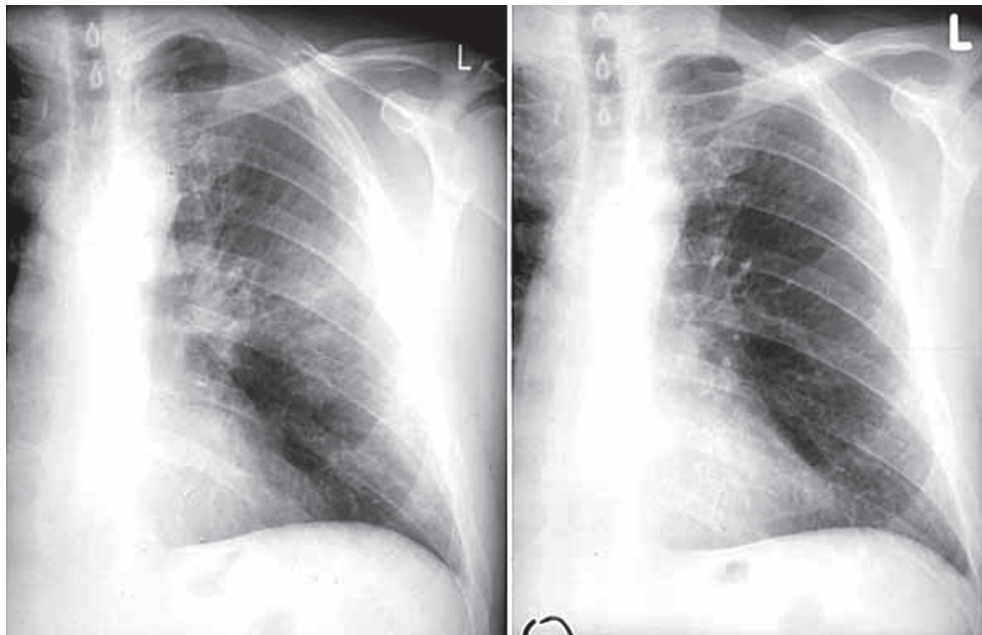


Abb. 2 Verlauf einer *C. pneumoniae*-assoziierte Pneumonie
(JEND, Die Lunge im Netz)

Es können auch Mischinfektionen Pneumonien verursachen. So wiesen Kauppinen et al. (KAUPPINEN 1996) bei 46 von 125 hospitalisierten Patienten mit ambulant erworbenen Pneumonien *C. pneumoniae* oder *S. pneumoniae* serologisch nach. Der Titerverlauf legte eine akute Infektion nahe. Bei 24 Patienten bestand eine alleinige *C. pneumoniae*-Infektion, in 9 Fällen waren *C. pneumoniae* und *S. pneumoniae* die Erreger und in 13 Fällen *S. pneumoniae* allein.

Die Mischinfektionen verlaufen klinisch apperenter und sind schwerwiegender (KAUPPINEN 1996).

Pleuraergüsse wurden im Zusammenhang mit *C. pneumoniae*-Pneumonien beschrieben (AUGENBRAUN 1991), ebenso Fälle von akuter Otitis media, die nicht direkt im Zusammenhang mit einer Infektion des Atemtrakts standen (STORGAARD 1997, BLOCK 1997).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die meisten Infektionen relativ mild verlaufen, so dass kein Krankenhausaufenthalt notwendig wird. Ist der Krankheitsverlauf jedoch so schwer, dass eine Krankenhausaufnahme erforderlich ist, liegt der Infektion in ca. 50% der Fälle eine weitere Krankheit (z. B. Koinfektionen mit *S. pneumoniae*) zu Grunde (GRAYSTON 1989, GAYDOS 1994, KAUPPINEN 1994).

Die Rolle von *C. pneumoniae* bei immunsupprimierten Patienten wird diskutiert. In einer italienischen Studie konnten Antikörper gegen *C. pneumoniae* im Blut bei ehemals Drogenabhängigen und jetzt HIV-Infizierten mit einer signifikant höheren Seroprävalenz (60%) als bei Immunkompetenten (32%) nachgewiesen werden. Die Fallzahl war jedoch mit 26 Patienten gering (BLASI 1994). Gaydos et al. (GAYDOS 1993) wiesen mittels PCR *C. pneumoniae* in BAL-Proben bei 12 von 108 (11,1%) Patienten mit Immunsuppression aufgrund von HIV oder Malignität nach. In die untersuchte Gruppe wurden aber auch Patienten eingeschlossen, die respiratorische Erkrankungen wie Bronchitis oder Pneumonie, sowie zystische Fibrose aufwiesen. Dem gegenüber konnte bei sieben gesunden freiwilligen Studienteilnehmern *C. pneumoniae* nicht nachgewiesen werden.

In einer deutschen Untersuchung wurden drei Patientengruppen verglichen: 57 immunkompetente Patienten mit diagnostizierter Pneumonie, 47 HIV-infizierte Patienten, die wegen des Verdachts oder wegen bestehender opportunistischer Lungenerkrankungen behandelt wurden und 100 Kontrollpatienten mit nichtinfektiösen pulmonalen Störungen. Mittels PCR wurden BAL-Proben analysiert: 16% der Proben der immunkompetenten Patienten, sowie 13% der Proben der Patienten mit HIV waren positiv für *C. pneumoniae*, während keine Probe aus der Kontrollgruppe ein positives Ergebnis ergab (DALHOFF 1996). Diesen Ergebnissen zu folge, scheint die erhaltene zelluläre Immunität nur einen geringen Einfluss auf das Vorhandensein von *C. pneumoniae* zu haben.

Außerdem wird ein Zusammenhang von *C. pneumoniae* und chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen, insbesondere Asthma bronchiale, diskutiert. Eine chronische Infektion mit *C. pneumoniae* könnte einen immunpathologischen Prozess auslösen, der in epithelialen Schäden der Lunge und Mediatorenfreisetzung mündet und somit zu einer chronischen Entzündung des Lungenparenchyms beiträgt. In mehreren Studien wurde *C. pneumoniae* mit einer höheren Prävalenz in Patientengruppen mit COPD/Asthma bronchiale nachgewiesen (HAHN 1991, BEATY 1991, EMRE 1995, HAHN 2000), in anderen wiederum nicht (COOK 1998, SMIEJA 2002).

1.2.5 Therapie

Intrazellulär wirksame Antibiotika, wie Makrolide (Erythromycin) oder Tetracycline, (Doxycyclin/Tetracyclin) sind geeignet für die Therapie von Infektionen mit *C. pneumoniae* (KUO 1998). Das Azalid Azithromycin sowie Clarithromycin und Roxithromycin sind ebenfalls gut wirksam bei niedrigen Serumkonzentrationen (BLOCK 1995, ROBLIN 1998, KUO 1996, FREIDANK 1999). Neuere Makrolide weisen eine bessere Verträglichkeit im Vergleich zu Erythromycin auf, sind aber auch teurer (KUO 1996). Fluorchinolone wie Ofloxacin (PLOUFFE 1996) Levofloxacin (FILE 1997)

und Moxifloxacin (HAMMERSCHLAG 2000, ROBLIN 2003) sind klinisch getestet und gut wirksam. In vitro sind neu entwickelte Fluorchinolone der 4. Generation, wie Gemifloxacin (HAMMERSCHLAG 2000) und Garenoxacin (ROBLIN 2003) ebenfalls gut wirksam.

Nicht wirksam sind β -Lactam-Antibiotika (Penicillin, Ampicillin) oder Sulfonamide.

Die Therapiedauer sollte bei ambulant erworbener Pneumonie 7–10 Tage betragen.

Eine Therapiekontrolle durch eine Röntgen-Thorax-Aufnahme ist frühestens nach 7 Tagen sinnvoll, da sich Veränderungen radiologisch erst nach einigen Tagen beurteilen lassen.

1.3 Mikrobiologische Diagnostik bei Infektionen durch *C. pneumoniae*

Infektionen mit *C. pneumoniae* können mittels serologischer Testverfahren, wie Mikroimmunfluoreszenztest (MIF) und Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) nachgewiesen werden. Daneben können auch molekularbiologische Testverfahren, wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt werden. Außerdem besteht die Möglichkeit des Zellkulturnachweises.

1.3.1 Serologische Erregernachweise

Der MIF wurde 1970 für die Diagnose einer Infektion mit *C. trachomatis* entwickelt (WANG 1970). Mit Hilfe des MIF ist es möglich IgG-, IgA- und IgM-Antikörper gegen *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. psitacii* nachzuweisen. Zur Diagnostik von *C. pneumoniae* wird als Antigen formalin-fixierte *C. pneumoniae*-Elementarkörperchen, verwendet (DOWELL 2001). Nach Entdeckung von *C. pneumoniae* war der MIF die erste etablierte Methode zum Nachweis von Antikörpern (Grayston 1986). Er gilt als Goldstandard und lässt Aussagen über Erstinfektion und Reinfektion zu (DOWELL 2001). Der MIF kann jedoch von zirkulie-

rendem Rheuma-Faktor (IgM) beeinflusst werden. Ohne vorherige Absorption des Rheumafaktors aus dem Serum können falsch positive IgM-Ergebnisse auftreten (VERKOOYEN 1992).

Der Test ist technisch anspruchsvoll und die Interpretation der Ergebnisse bedarf großer Erfahrung. Somit ist der Test schwierig zu objektivieren (KUO 1995, PEELING 2000). Zudem sind weder Reagenzien, noch diagnostische Kriterien standardisiert (DOWELL 2001). Der Antikörper-Nachweis mittels ELISA ist technisch wesentlich einfacher zu handhaben. Verschiedene ELISA-Kits sind kommerziell erhältlich (DOWELL 2001).

Auch wenn der MIF häufig als Goldstandard für die Evaluierung serologischer Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* herangezogen wird unterscheiden sich auch MIFs hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität.

Bennedsen et al. (BENNEDSEN 2002) fanden im Vergleich zwei kommerzielle MIF mit dem Standard eines Referenzlabors eine Übereinstimmung von 87–97% hinsichtlich IgA- und IgG-Antikörper-Titer. Messmer et al. (Messmer 2000) verglichen zwei kommerzielle MIF miteinander und fanden eine Übereinstimmungsrate von IgG-Titern von 98%. Peeling et al. (PEELING 2000) zeigten, dass die Übereinstimmung von serologischen Testergebnissen mittels MIF-Tests vor allem von der Höhe der Titer abhängig ist. 22 unterschiedliche Blutproben, die Antikörper gegen *C. pneumoniae* enthielten, wurden zu 14 verschiedenen Labors zur Bestimmung von IgG- und IgM-Antikörpern gesandt. Die Übereinstimmung mit dem Referenzstandard war im Durchschnitt 80%. Diskrepanzen ergaben sich vor allem bei niedrigen und negativen IgG- oder IgM-Titern. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte, dass der MIF in seiner Aussagekraft begrenzt ist. Er sei subjektiv, von Labor zu Labor unterschiedlich interpretierbar und bisher nicht standardisiert, aber bei korrekter Ausführung zur Serodiagnose von *C. pneumoniae* geeignet.

1.3.2 Molekularbiologischer Nachweis

Als relativ neues Testverfahren dient die PCR dem Nachweis von erregerspezifischer DNA (Desoxyribonukleinsäure) oder Ribonukleinsäure (RNS). Mit diesem Verfahren können nach vorheriger Extraktion der Gesamt-DNA kleinste Mengen von erregerspezifischer DNA/RNS amplifiziert und später in der Elektrophorese sichtbar gemacht werden. Ob eine frische oder bereits durchgemachte Infektion vorliegt, bzw. die DNA/RNS von lebenden oder abgestorbenen Erregern stammt, ist mittels PCR nicht zu beantworten. Bisher konnte *C. pneumoniae* mittels PCR in Nasopharyngealabstrichen (HAMMERSCHLAG 1992), Sputum (TONG 1993) (KUO 1995), bronchoalveolären Lavagen (GAYDOS 1994) (MAASS 1996), Mittelohrflüssigkeiten (BLOCK 1997), Synovialflüssigkeit (BRAUN 1997) und aus Artheromen (APFALTER 2001) (RASSU 2001) nachgewiesen werden. *C. pneumoniae* konnte ebenso aus PBMCs nachgewiesen werden, aber diese Art des Nachweises bedarf weiterer Evaluation (MAHONY 2000, APFALTER 2001, SMIEJA 2002). Obwohl verschiedene PCR-Verfahren bisher entwickelt und etabliert wurden ist diese Methode noch kein Routineverfahren in der Diagnostik von *C. pneumoniae* (DOWELL 2001). Für die vorliegende Arbeit wurde eine in anderen Untersuchungslaboren validierte Nested-PCR verwendet (CAMPBELL 1992, BRAUN 1997, BOMAN 1999, DOWELL 2001).

1.3.3 Kulturnachweis

C. pneumoniae kann in Zellkulturen angezüchtet werden (KUO 1990). Geeignete Zelllinien hierfür sind HEp-2 oder HL-Zellen (ROBLIN 1992) (DOWELL 2001). Der Zellkulturnachweis ist jedoch aufwendig und störanfällig. Die Bakterien wachsen schlecht und langsam, so dass ein Nachweis schwer zu führen ist. Er gilt deswegen als sehr spezifisch bei geringer Sensitivität, abhängig von der Routine des Untersuchungslabors (KUO 1995).

1.4. Beobachtung und Fragestellungen

Unter Berücksichtigung der Annahme, dass es sich bei *C. pneumoniae*-Infektionen um ambulant erworbene Infektionen handelt, fielen im Vorfeld dieser Arbeit bei mehreren hospitalisierten und beatmeten Patienten einer ITS hohe IgA- und IgG-Antikörpertiter gegenüber *C. pneumoniae* auf. Ein gleichzeitiger Anstieg von IgA und IgG gilt als Zeichen einer Reinfektion mit dem Erreger.

Hieraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Könnte es zu einer nosokomial erworbenen *C. pneumoniae*-Infektion gekommen sein? Eine solche Möglichkeit wurde von Rumbak 1993 beschrieben (RUMBAK 1993).
- Könnte es bei einer möglichen Persistenz des Erregers zu einer Reaktivierung von *C. pneumoniae* durch das Beatmungstrauma oder einer schweren Erkrankung gekommen sein?
- Entsprechen die nachgewiesenen Antikörper möglicherweise einer *C. pneumoniae*-spezifischen Titerpersistenz von IgA- und IgG-Antikörpern?
- Liegt den Antikörpernachweisen eine unspezifische falsch positive Reaktion der verwendeten ELISA-Tests zugrunde?
- Sind die erhöhten Antikörper im Rahmen der für *C. pneumoniae*-Infektionen typischerweise langen Inkubationszeit zu bewerten?

Hierzu wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Zunächst wurde eine retrospektive Analyse der Krankenakten der Fallgruppe (15 Patienten mit Antikörpern gegen *C. pneumoniae*), im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (12 seronegative Patienten) durchgeführt.
- Anschließend wurde in einer prospektiven Untersuchung Seroproben von 100 Patienten auf *C. pneumoniae*-Antikörper untersucht. Gleichzeitig wurden BAL-Proben asserviert und diese mittels PCR-Nachweis auf *C. pneumoniae* untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialverzeichnis

Technische Geräte

- Vortex, Janke und Kunkel, IKA-Werk, VF 2
(IKA, Staufen im Breisgau)
- Zentrifugen, 5415 C, 5412 (Eppendorf, Hamburg)
- Heizblock, Thermomixer 5436 (Eppendorf)
- Elektrophoresegerät, DNA-Sub Cell, (Biorad, München)
- DNA-Thermal-Cycler-Cetus für PCR
(Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA)

Kleingeräte und Materialien

- Pipetten, Eppendorf Reference klein (bis 10 l) (Eppendorf)
- Pipetten, Eppendorf Reference mittel (bis 100 l) (Eppendorf)
- Pipetten, Eppendorf Reference groß (bis 1000 l) (Eppendorf)
- Pipettenspitzen für PCR, 20E, 100E, 1000E pipet tips, ART,
Molecular Bio Products (San Diego, CA, USA)
- Filme, Polaroid 667, 2x10 Aufnahmen
(Polaroid, Enschede, Niederlande)
- Gelträger und Gelkämme (Biorad)
- PCR-Reaktionsgefäße, Safe-Lock Tubes, 0,5 ml (Eppendorf)
- PCR-Reaktionsgefäße, Safe-Lock Tubes, 2,0 ml (Eppendorf)
- Einmalhandschuhe 100%Nitril, Nitra Tex, mittel
(Ansell, München)
- Einmalhandschuhe Derma-Clean, Nitra Tex, mittel (Ansell)

Chemikalien

- Agarose-HGT, Kat.-Nr. 32805 / 500 g (Cleveland, Ohio, USA)
- Aqua tridestilata (im Hause hergestellt)
- Mineralöl, Flasche 500 ml, Lot.-Nr.: 44H012615,
(Sigma, St.Louis, Missouri, USA)

Material und Methoden

- Puffer (Tris/Borsäure/EDTA-Puffer) für Elektrophorese und Gel Biorad, Cat.-Nr.: 161-0733, Zusammensetzung: 108 g Trisbase, 55 g Borsäure, 40 ml (0,5 Mol, EDTA-Puffer, pH 8) (Biorad)
- PBS-Puffer, Biochrom AG, Cat.-Nr.:L/82-10 (Biochrom, Berlin)
- Ethanol absolut, (500 ml) 32205, Cat.-Nr.:20920 (Riedel-de Haen, Seelze)
- TBE 0,5-fach und Ethidiumbromid, Konzentration 0,5 g Ethidiumbromid/ml Puffer
- Herstellung: 500 ml TBE 0,5-fach 50 l Ethidiumbromid (Ethidiumbromide Solution 10 mg/ml, Sigma, St.Louis, Missouri, USA).
- Quiagen DNA-Mini-Kit (50), Cat.-Nr.: 51304, Quiagen-Kit beinhaltet ATL-, AW1-, AW2- und Lysepuffer (Quiagen, Münster)
- Quiagen DNA-Mini-Kit (250), Cat.-Nr.: 51306, Quiagen-Kit beinhaltet ATL-, AW1-, AW2- und Lysepuffer (Quiagen)
- DNA-Ladder, 100bp DNA-Ladder, 50g, Lot.-Nr.: 1143777 (Invitrogen, Merelbeke, Belgien).
- Externe Primer: Produktbeschreibungsnummer 319310, CHLneuEXTUP (Molbiol Syntheselabor, Berlin)
 - Produktbeschreibungsnummer 319311, CHLneuEXTLOW
- Interne Primer: Produktbeschreibungsnummer 319312 CHLneuINTUP
 - Produktbeschreibungsnummer 319313 CHLneuINTLOW
- dNTP-Set 1, ultrapure dNTP-Set. Cat.-Nr.K035-38.1 (Roth, Karlsruhe)
- Taq-Polymerase (DNA-Polymerase), 100 U Cat.-Nr.: 0032002.307 (Eppendorf)
- Taq-Polymerase (DNA-Polymerase), 500 U Cat.-Nr.: 0032003.419 (Eppendorf)
- MgCl₂, 50mM (Invitex, Berlin)
- NH₄-Puffer, 10x-konzentriert (Invitex)
- Ladefarbstoff: 30% Glycerin, 70% Farbe: Xylencyanol-Bromphenolblau 1:1
- Terasaki-Wells (Nunc, Roskilde, Dänemark)

- Medac ELISA-Kit, Katalog-Nr. 430 TMB, IgG-und IgA rELISA (ELISA 1) (Medac, Wedel)
- Medac ELISA-Kit Katalog-Nr. 490 TMB, IgG-und IgA sELISA (ELISA 2) (Medac)

2.2 Retrospektiver Untersuchungsteil

2.2.1 Patientenauswahl

15 beatmete Patienten der Intensivstation 006 (Allgemein Medizinische Intensivstation des Universitätsklinikums Benjamin Franklin), die im Laufe ihres Aufenthalts durch eine positive *C. pneumoniae*-Serologie (ELISA-Index >1,0; Fallgruppe) im Zeitraum zwischen Oktober 1999 bis Mai 2000 aufgefallen waren, wurden 12 seronegativen beatmeten Patienten derselben Station aus demselben Zeitraum gegenübergestellt (ELISA-Index <1,0; Kontrollgruppe). Die Antikörper waren mittels ELISA 1 nachgewiesen worden. Die Serotests wurden als positiv bewertet, sobald die Titer über denjenigen der niedrig positiven Kontrollseren lagen (entsprechend den Empfehlungen des Herstellers. In dieser Arbeit wurden zwei ELISA-Kits der Firma Medac® verwendet, da während der Untersuchungsphase der vorliegenden Arbeit das Testverfahren in der Routine umgestellt wurde. Die Antigene unterschieden sich wie folgt:

- ELISA1 verwendete als Antigen rekombinantes LPS-Antigen
- ELISA 2 verwendete als Antigen ein Protein der äußeren Bakterienmembran von *C. pneumoniae* (MOMP)

2.2.2 Untersuchungsdaten, die für den Vergleich der beiden Gruppen herangezogen wurden

Es wurden retrospektiv Daten aus den Krankenakten der stationären Aufenthalte der Fallgruppe und der Kontrollgruppe untersucht, um Hinweise auf eine *C. pneumoniae*-Infektion zu finden.

Material und Methoden

Tabelle 2: Klinische, mikrobiologische und laborchemische
Untersuchungsdaten

Grund der Aufnahme	Aufnahmediagnose, Grunderkrankungen und Nebendiagnosen
Vorerkrankungen	hämatologische Grunderkrankung, Neoplasien, Diabetes mellitus, HIV
Datum der Intubation	
Art der Beatmung	Intubation, Spontanatmung mit Tubus, eventuelles Datum der Extubation
Röntgen-Thorax (Befund)	interstitielles/lobäres Verschattungsmuster, pulmonale Stauung, Pleuraerguss
Dialyse-Therapie	Ja/nein
Blut, venös (waren mehrere Werte an einem Tag erhoben, so wurde der höchste/niedrigste Wert ausgewählt)	Natrium, Kalium, Leukozyten, Thrombozyten, Hämatokrit, Differential-Blutbild, Transaminasen, Bilirubin gesamt, Alkalische Phosphatase, Gerinnungsparameter (Quick/INR und partielle Thromboplastinzeit), D-Dimere, C-reaktives Protein, Gesamt-Protein, Albumin, Kreatinin, Harnstoff, Lactat
Blut, arteriell (Minimal- und Maximalwert/Tag)	pH, pO ₂ /FIO ₂ , pCO ₂ /FIO ₂ , Standardbicarbonat
Vitalparameter (Minimal- und Maximalwert/Tag)	Herzfrequenz, systolischer und diastolischer arterieller Blutdruck. Wurde der arteriellem Blutdruck nichtinvasiv gemessen, so wurden manuell gemessenen Blutdruckwerte ersatzweise herangezogen, Wedge-Druck (bei liegendem PAK), zentraler Venendruck (bei liegendem ZVK), Temperatur, Atemfrequenz
Erregernachweise	Infektionen/Besiedlung mit gramnegativen Bakterien
i.v.-Medikation (Art der Medikation)	Antibiotische/antimykotische und immunsuppressive Therapie, Katchecholamine (Arterenol, Dopamin)
Anzahl und Art verabreichter Blutprodukte	Erythrozytenkonzentrate (EK), Thrombozytenkonzentrate (TK), Fresh Frozen Plasma (FFP)
vorzeitige Verlegung	Datum, bei stationärer Verlegung: Erfassen der betreffenden Station
Entlassung	Datum, Entlassungsgrund

2.2.3 Auswahl der Daten

Aus diesem Pool von Daten wurden einige, für eine schwere Infektion sprechende Parameter, herausgesucht und statistisch analysiert:

- Antimykotika: Wurden die Patienten in der Fallgruppe signifikant häufiger mit Antimykotika therapiert? Dadurch wurde ein indirekter Hinweis auf die Schwere der Erkrankung untersucht, da auf der Station Antimykotika nur bei gesicherten Pilzinfektionen oder fortgeschrittenen therapieresistenten, septischen Erkrankungen eingesetzt werden.
- D-Dimere: Wurden in der Fallgruppe signifikant häufiger erhöhte D-Dimere nachgewiesen? Die Erhöhung von D-Dimeren kann für aktive fibrinolytische Prozesse sprechen, die bei schweren Erkrankungen oft aktiviert sind (z. B. bei disseminierter intravasaler Koagulopathie im Rahmen einer Sepsis).
- i.v.-Applikation von FFP: Wurden in der Fallgruppe signifikant häufiger FFP verabreicht? Hier sollte die Möglichkeit der Antikörperübertragung durch Fremdplasma untersucht werden.
- Hypoxämie: Hatten in der Fallgruppe Patienten signifikant häufiger eine Hypoxämie? Der Zusammenhang zwischen der Hypoxämie (Relation pO_2 und FiO_2) bedingten, traumatischen Schädigung des Lungenparenchyms und einer damit gleichzeitig einher gehenden *C. pneumoniae*-Pneumonie sollte erfasst werden. Die Relation von FiO_2 und arteriellem pO_2 ist ein Maß für die Schwere der funktionellen Lungenschädigung.
- Hinweise auf gleichzeitige Infektion mit gramnegativen Bakterien: Wurden bei den Patienten der Fallgruppe signifikant häufiger gramnegative Bakterien nachgewiesen? Durch dieses Untersuchungsmerkmal sollte die Möglichkeit einer Kreuzreaktion von Antikörpern gegen Fremd-LPS mit dem verwendeten Antigen im ELISA (rekombinantes LPS), d.h. falsch positive ELISA-Ergebnisse untersucht werden.

- Leukozytose: Wurde bei Patienten in der Fallgruppe signifikant häufiger eine Leukozytose nachgewiesen? Eine Leukozytose spricht für einen bakteriell bedingten, entzündlichen Prozess (Differentialblutbilder wurden ebenso für die Differenzierung zwischen viral und bakteriell bedingten Entzündungen herangezogen).
- Erhöhte Transaminasen: Wurden in der Fallgruppe bei Patienten signifikant häufiger erhöhte Transaminasen nachgewiesen? Transaminasen erfassen Schädigung von Zellen, die zu einer Freisetzung von intrazellulären Enzymen führt, hepatozytäre Schäden hätten somit erkannt werden können.
- i.v.-Applikation von intrazellulär wirksamen Antibiotika: Wurden in der Fallgruppe signifikant häufiger intrazellulär wirksamen Antibiotika verabreicht? Intrazellulär wirksame Antibiotika wurden erfasst, da *C. pneumoniae* ein obligat intrazelluläres Bakterium ist und eine Infektion dementsprechend mit intrazellulär wirksamen Antibiotika therapiert werden würde.
- Azidotische Stoffwechsellage: Wurde bei Patienten in der Fallgruppe signifikant häufiger in der arteriellen BGA ein pH unter 7,34 nachgewiesen? Das Vorliegen einer Azidose wurde untersucht, da diese ebenfalls auf eine schwere Erkrankung hinweisen kann.

Ein Parameter „interstitielle Pneumonie“ wurde aufgrund der fehlenden Definierbarkeit nicht untersucht.

2.3. Prospektiver Untersuchungsteil

2.3.1 Patientenauswahl

Alle von Oktober 2000 bis Juni 2003 auf der medizinischen Intensivstation aufgenommenen Patienten wurden in die Studie eingeschlossen, wenn sie die folgenden Kriterien erfüllten:

1. Beatmungspflichtigkeit (bei Ateminsuffizienz wurde die Indikation zur maschinellen Beatmung gestellt)
2. Stationäre Behandlung für mindestens 2 Wochen
3. BAL-Abnahme (im Rahmen der Routineuntersuchungen bei schweren Erkrankungen musste mindestens eine BAL zu diagnostischen Zwecken veranlasst worden sein)
4. Serumprobe zum Antikörpernachweis von *C. pneumoniae* (im Rahmen der vorliegenden Arbeit musste mindestens eine Serumprobe zum Nachweis von *C. pneumoniae* vorliegen)

2.3.2 Untersuchungsmaterial

BAL zum Direktnachweis von *C. pneumoniae* mittels PCR

Die BAL-Probe wurde im Verhältnis 1:1 mit DTT gemischt, zentrifugiert und das Sediment der Probe bei – 70°C eingefroren.

Serum zum Nachweis von *C. pneumoniae*-Antikörpern

Nach Intubation wurde nach einem definierten Abnahmeschema innerhalb der ersten drei Tage die 1. Serumprobe zum Nachweis von *C. pneumoniae*-Antikörpern gewonnen. Weitere Untersuchungen erfolgten am 7. und am 14. Tag.

Bei darüber hinaus bestehender Liegezeit erfolgten wöchentlich weitere Untersuchungen auf Antikörper gegen *C. pneumoniae*, um mögliche Titerveränderungen zu dokumentieren.

2.3.3 Untersuchungsmethoden

2.3.3.1 Kommerzieller ELISA-Testkit für den Nachweis von IgG – bzw. IgA-Antikörpern gegen *C. pneumoniae*

Definition

Mit Hilfe eines ELISA lassen sich Antikörper oder Antigene aus dem Serum von Patienten nachweisen. Die optische Dichte eines Farbumschlags im Nachweisverfahren wird mit dem von niedrig positiven Kontrollserum verglichen. Dieser Farbumschlag wird mit einem Titer gleichgesetzt. Anhand des Verlaufs der Antikörpertiter kann dann der Infektionsverlauf nachvollzogen werden.

Testprinzip

Mit den beiden hier verwendeten ELISA-Verfahren ließen sich IgA- und IgG-Antikörper gegen *C. pneumoniae* nachweisen (Abb. 3, folgende Seite).

Es wurden für ELISA 1 und ELISA 2 entsprechend Antigen-beschichtete Mikrotiterplatten verwendet, der Test lief in 2 Phasen ab:

- Reaktion 1: gegen das Antigen gerichtete Antikörper aus dem Patientenserum binden an das Antigen
- Reaktion 2: Peroxidase-gekoppelte Anti-Human-IgG oder -IgA binden an die entsprechenden Antikörper
- Mit Hilfe von TMB-Substrat wird ein Farbumschlag erreicht.

Sensitivität und Spezifität der Tests

In dieser Arbeit wurden zwei ELISA-Kits der Firma Medac® verwendet, da während der Untersuchungsphase der vorliegenden Arbeit das Testverfahren in der Routine umgestellt wurde. Die Antigene unterschieden sich wie folgt:

- ELISA1 verwendete als Antigen rekombinantes LPS-Antigen
- ELISA 2 verwendete als Antigen ein Protein der äußeren Bakterienmembran von *C. pneumoniae* (MOMP)

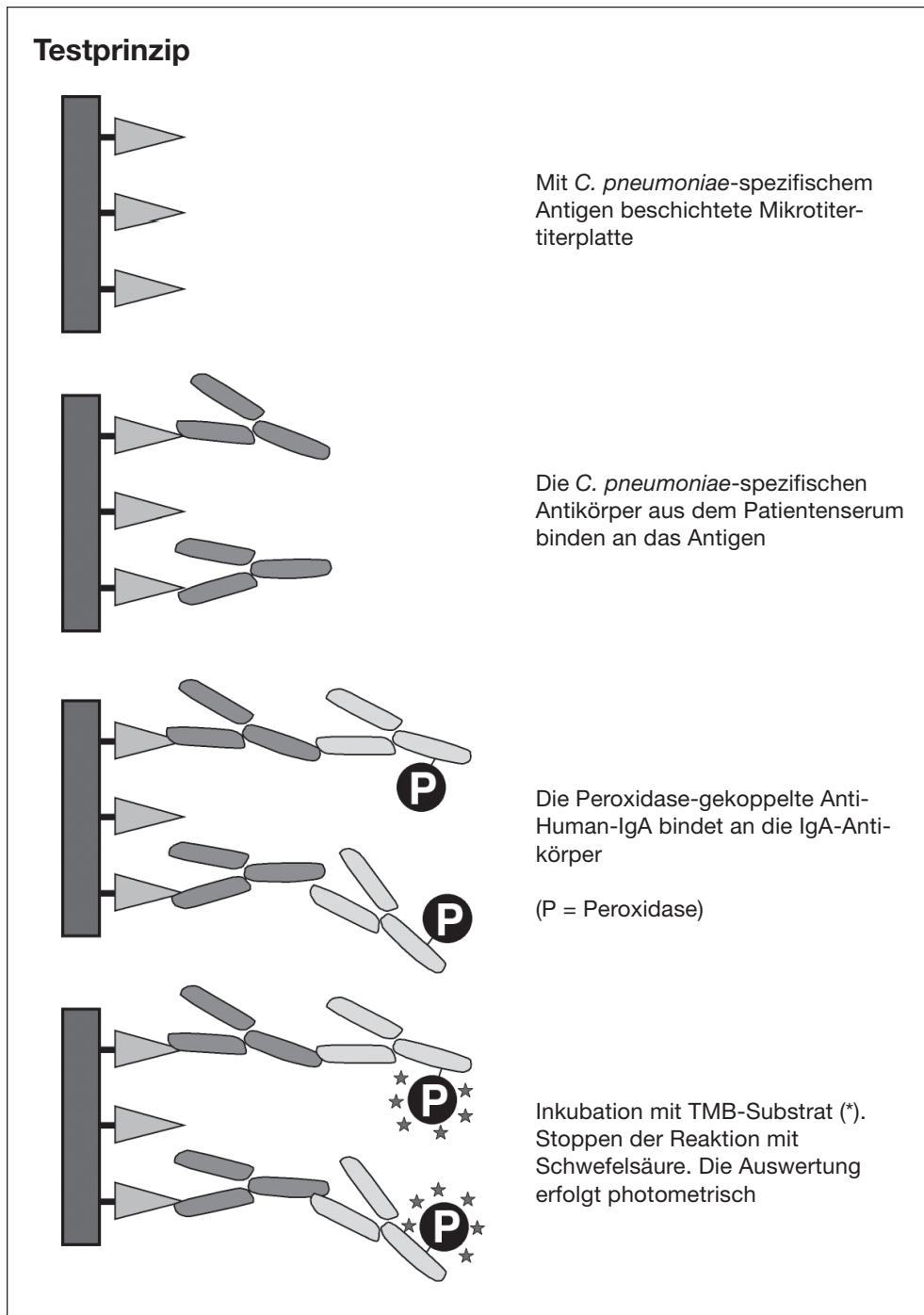


Abb. 3 Testprinzip zur Durchführung eines ELISA zum Nachweis von *C. pneumoniae*-spezifischen Antikörpern (nach Handbuch des Herstellers: Medac ELISA-Kits, Medac, Wedel)

ELISA1: Der Serotest wurde vom Hersteller als genusspezifisch eingestuft. Es wurden keine Sensitivitäts- und Spezifitätsangaben durch den Hersteller gemacht.

ELISA 2: Spezifität und Sensitivität des Serotests wurden laut Angaben des Herstellers, wie in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3:

	IgA	IgG
Sensitivität	95% (n=74)	99% (n=117)
Spezifität	93% (n= 86)	95% (n=42)

MEDAC 1998

Bestandteile des Testkits

- Mikrotiterplatte, beschichtet mit *C. pneumoniae*-spezifischem Antigen (rLPS/MOMP) und FKS
- Negativkontrolle: humanes Serum, blau gefärbt, enthält NCBS, Phenol, ProClin 300 und Gentamycinsulfat (0,75 ml)
- Positivkontrolle: humanes Serum, blau gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin 300 und Gentamycinsulfat (0,75 ml)
- Waschpuffer: PBS/TWEEN, pH 7,2–7,4, enthält ProClin 300 (0,1 l)
- Probenverdünnungspuffer: PBS/TWEEN/NCBS, pH 7,0–7,2, blau gefärbt, enthält ProClin 300 (110 ml)
- Konjugat: Ziege-Anti-Human-IgG/bzw IgA-Antikörper, HRP-konjugiert, enthält BSA, Phenol, ProClin 300 und Gentamycinsulfat (5 ml)
- TMB-Substrat (10 ml)
- Stopplösung: 0,5 M Schwefelsäure (H₂SO₄) (14 ml)

Testbeurteilung (Validität) des ELISA durch fotometrische Auswertung

- Die fotometrische Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620–650 nm).

- Die optische Dichte des Leerwertes (Vertiefung A1) wurde von allen OD-Werten subtrahiert, dabei musste der OD-Wert des Leerwertes $< 0,150$ betragen.
- Der OD-Wert der Negativkontrollen musste $< 0,100$ bei Negativkontrollen, bei Positivkontrollen $> 0,800$ betragen.
- Der Cut-Off-Mittelwert des niedrig positiven Wertes wurde vom Hersteller mit $+ 0,380$ angegeben, im Grenzbereich von $\pm 10\%$.

Auswertung der Ergebnisse

Tabelle 4: Quantitative Auswertung

OD der Probe Cut-Off (niedrig positiver Wert)	Bewertung
$< 0,9$	Negativ
$0,9-1,1$	Grenzwertig
$> 1,1$	Positiv

Werte im Grenzbereich wurden 14 Tage nach Entnahme im Vergleich mit der ersten Probe auf Indexbewegungen kontrolliert. Bei Negativergebnissen wurden vom Hersteller bei klinischem Verdacht erneute Testungen nach 10–14 Tagen empfohlen.

2.3.3.2 PCR für den Direktnachweis von *C. pneumoniae*

In dieser Arbeit wurde eine validierte Nested-PCR verwendet (CAMPBELL 1992, BRAUN 1997, DOWELL 2001) und in unserem Labor etabliert.

Definition

Die PCR ist eine diagnostische Labormethode, mit der kleinste Mengen DNA amplifiziert und anschließend detektiert werden können.

Testprinzip

Für die Amplifikation von DNA ist das Erkennen von Abschnitten eines Genoms des zu untersuchenden Genmaterials, z. B. von Bakterien, wichtig. Dies geschieht mit Hilfe von spezifischen Primern, die nur diesen Genabschnitt lesen. Voraussetzung für die Amplifikation von Genabschnitten ist ein für die Primer entsprechendes chemisches Milieu und das Vorhandensein von Nukleotiden, die sie mit Hilfe einer Polymerase zu eben diesem gelesenen Genabschnitt zusammensetzen. Die Reaktion besteht aus der vielfachen Wiederholung dieses Vorgangs, so dass die Ausgangsmenge an DNA exponentiell vermehrt wird. Die vervielfachte DNA kann als Zielabschnitt in einer elektrophoretischen Auftrennung als charakteristische Bande sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Schwierigkeiten bei der Durchführung der PCR bestehen vor allem in der Gefahr der Kontamination durch Fremd-DNA, die zu falsch positiven Ergebnissen führen kann.

Sensitivität:

Um die Sensitivität der in der vorliegenden Arbeit verwendeten PCR zu ermitteln, war es notwendig, eine Verdünnungsreihe einer Chlamydien-suspension herzustellen, die eine definierte Menge des Erregers enthielt. Hierzu wurde eine Suspension von *C. pneumoniae* (Stamm TW-183, Charge 01.02.2001, Titer 3×10^6 IFUs/ml) in PBS verwendet, die freundlicherweise von Professor Straube, Klinikum der Friedrich Schiller Universität Jena, Institut für medizinische Mikrobiologie, zur Verfügung gestellt wurde. 1 ml der Bakteriensuspension enthielten 3×10^6 IFU. Eine Verdünnungsreihe mit der *C. pneumoniae*-Bakteriensuspension wurde bis 10^{-7} geführt. Der Nachweis von *C. pneumoniae*-spezifischer DNA war bis 10^{-6} als Bande im Gel sichtbar, so dass von einer Sensitivität von ca. 1 Erreger auszugehen war.

Die Sensitivitätskontrollen wurden vor der Testung der Patientenproben 2 x wiederholt.

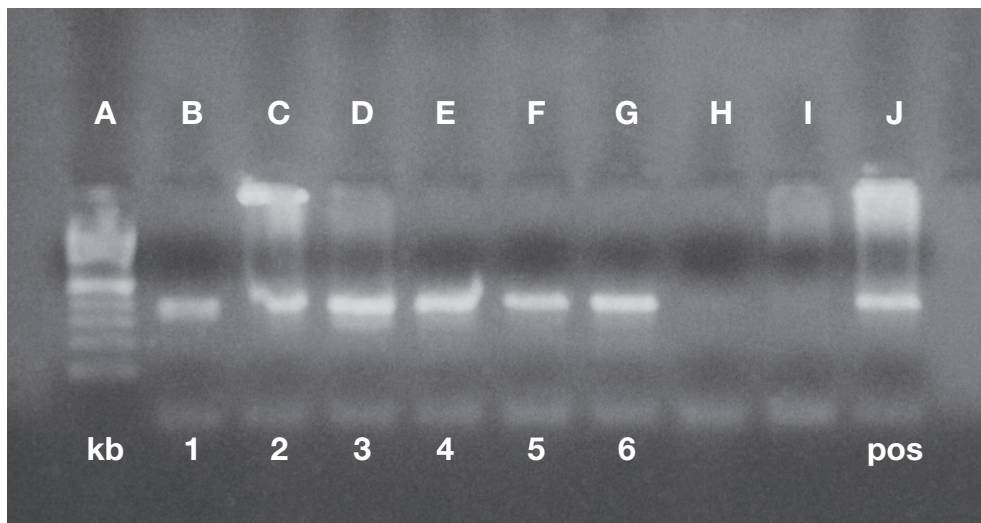


Abb. 4 PCR-Verdünnungsreihe des *C. pneumoniae*-Stammes

Banden A–J

- A:** Molekulargewichtsmarker
- B–G:** systematisch abnehmende Konzentration der DNA im PCR-Ansatz, d. h. die Verdünnungsstufen ($1:10^1$ – $1:10^6$) des DNA-Eluates des *C. pneumoniae*-Referenzstammes, jeweils Banden sichtbar
- H:** Verdünnung des DNA-Eluates des Referenzstammes von *C. pneumoniae* ($1:10^7$), keine Bande sichtbar,
- I:** Negativ-Kontrolle (Aqua ad injectabile),
- J:** interne Positivkontrolle, *C. pneumoniae*-DNA

Spezifität:

Eine Spezifitätskontrolle ist in der PCR die gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA, in der der spezifisch amplifizierte Genabschnitt bis zur Bande wandert, die seiner Größe entspricht. Im Fall von *C. pneumoniae*-spezifischer DNA entspricht dies einem Nachweis von 399 Basenpaaren. Eine Kontrolle der Spezifität mittels Restriktionsenzymen wurde zuvor von Braun et al. durchgeführt (BRAUN 1997).

Die Nested-PCR schließt zudem eine Kontrolle der Spezifität ein.

Amplifizieren die externen Primer ein Falschprodukt durch zufällige Anlagerung an eine falsche, dem Genstück jedoch ähnliche Matrize, so können sich die im Nested-PCR-Schritt verwendeten internen Primer an dieses Falschprodukt nicht anlagern.

DNA-Extraktion:

Zur Aufbereitung der Chlamydiensuspension und der Patientenproben wurde ein kommerzielles Kit der Firma Quiagen (DNA-Mini-Kit) verwendet und der Arbeitsanleitung des Herstellers gefolgt.

Vorbehandlung der Chlamydiensuspension (Positivkontrolle) und von Patientenmaterialien (BAL)

- 20 µl der Positivkontrolle wurden 1:10 mit Aqua tridest verdünnt (Gesamtvolumen 200 µl).
- Patientenmaterialien und Positivkontrollen wurden zunächst bei 9000 U/min (5G) 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet für die Extraktion verwendet.
- Im Anschluss wurde das Pellet mit 50 µl ATL-Puffer resuspendiert. 20 µl wurden hiervon verwendet, für mindestens 15 Sekunden gevortext und in die DNA-Extraktion eingesetzt. Der Rest wurde bei – 70°C eingefroren.
- Zu den 20 µl wurden 175 µl ATL-Puffer und 5 µl DNA-Puffer hinzugefügt. Der DNA-Puffer verhinderte eine Anheftung der extrahierten DNA an die Wände der Eppendorf-Hütchen und damit einen Verlust der DNA.

Ablauf der Extraktion mittels Quiagen-Mini-Kit

1. Zum Verdau der Zellen und Freilegung von DNA durch Proteinase K wurden die Proben mit 20 µl Proteinase K versehen und im Anschluss für eine Stunde bei 56°C inkubiert (MAASS 1994).
2. Dann erfolgte eine Trennung von DNA und Zelltrümmern über einen DNA-Filter durch Waschgänge mit Ethanol und Puffer (AW1 und AW2), bei denen die DNA im Filter aufgefangen wurde.

3. Die gewonnene DNA wurde mittels eines Lysepuffers eluiert. Um die Konzentration an DNA im Endvolumen zu maximieren, wurde der Elutionsschritt nach Empfehlung des Herstellers doppelt ausgeführt. Die so gewonnene DNA wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei 4°C im Kühlschrank bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt.

Die Primer

Die Primer wurden von TIB MOLBIOL, Syntheselabor Berlin, synthetisiert. Die möglichst günstigste Primersequenzen wurden der Literatur entnommen (CAMPBELL 1992, BRAUN 1997). Zielsequenz für die Primerpaare war das PST 1 Fragment chromosomaler DNA von *C. pneumoniae*. Das Amplicon war 399 Basenpaare groß.

Externe Primer:

5'-Primer: gTTgTTCATgAAggCCTACT, 20' mer
(molare Konzentration: 12,2 µM).

5'-Primer: gCATAACCTACggTgTgTT, 19' mer
(molare Konzentration: 12,2 µM).

Interne Primer:

5'-Primer: CTTTgATCAAgAgACAATAgAACggATA, 28' mer
(molare Konzentration: 12,4 µM).

5'-Primer: TTCTAATACCTgTCCAAGgTTCATCCTTg, 29' mer
(molare Konzentration: 13,0 µM).

Primer-Stammlösung

Sämtliche Primer wurden durch Zugabe der erforderlichen Menge Aqua tridestilata auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt. Die Stammlösungen wurden bei -70°C in einem gesonderten Raum aufbewahrt.

Gebrauchslösung (1,0 μ M)

Vor Gebrauch wurden die Primerstammlösungen mit der erforderlichen Menge Aqua tridest. versehen, so dass eine Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 1,0 μ M vorlag. Die Konzentration im Endvolumen des PCR-Mixes betrug 0,2 μ M. In einem 25- μ l-Ansatz der PCR betrug die eingesetzte Primermenge dementsprechend 5 μ l.

Die Gebrauchslösungen wurden in Aliquots von 50 μ l aufgeteilt und in einem gesonderten Raum bei -20°C aufbewahrt.

Die Positivkontrolle

Als Positivkontrolle wurden die Verdünnungsreihen des *C. pneumoniae*-Stammes verwandt. Während der Versuche wurde bei jeder DNA-Extraktion eine Positivkontrolle mitgeführt, die vor den PCR-Durchläufen in einer Verdünnungsreihe angelegt wurde. Die Verdünnungen von 1 bis 10^{-1} Erreger wurden in jedem PCR-Durchlauf als Positivkontrolle verwendet.

Nukleotide

Verwendet wurde ein kommerzielles Nukleotidkit. Es enthielt dATP, dCTP, dGTP, dTTP, jeweils in Konzentrationen von 0,1 μ M. Jeweils 100 μ l der Nukleotide wurden zusammengegeben und mit 600 μ l Aqua tridest aufgefüllt. Nach intensivem Schütteln wurden der Ansatz (1.000 μ l) in Eppendorfgefäße je 50 (μ l) aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Taq-DNA-Polymerase

Die verwendete Taq-DNA-Polymerase war ein Isolat von *Escherichia coli* DH1, welches ausgesprochen hitzestabil ist. Diese Polymerase synthetisiert DNA aus Einzelstrangvorlagen im Beisein eines Primers und in entsprechendem chemischem Milieu (siehe PCR-Mix) auch bei hohen Temperaturen. Bestandteile der Gebrauchspackung waren: Taq-DNA-Polymerase, 10xNH₄-Puffer und 50 mM Magnesiumchlorid. Alle Bestandteile wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

PCR-Mix

Tabelle 5: PCR-Mix

2,5 µl	10-fach konzentrierter PCR-Puffer
+ 1,0 µl	MgCl ₂ (2 mM im Endvolumen)
+ 0,5 µl	dNTP (0,2 mM im Endvolumen)
+ 0,2 µl	Taq-Polymerase
+ 5,0 µl	Primer (1,0 µM im Endvolumen)
+11,0 µl	Aqua tridest.
+ 5,0 µl	DNA (Template)
25,2 µl	Endvolumen

Ablauf der Nested-PCR

In der ersten Amplifikation wurden die externen Primer, in der zweiten Amplifikation wurden die internen Primer verwendet. Die geschlossenen PCR-Reaktionsgefäße wurden für mindestens 5 Sekunden gevortext und anschließend zentrifugiert. Jeder Ansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Im Thermocycler erfolgte die erste PCR in 35 Zyklen.

Tabelle 6: Erster PCR-Durchlauf

Denaturierungsvorlauf	4 min, 94°C (einmalig zu Programmbeginn)
Denaturierung (d. h., Dissoziation der Doppelstrang-DNA-in Einzelstrang-DNA)	1 min, 94°C
Annealing (d. h., Anlagerung der Primer an ihre DNA-Matrize)	1 min, 50°C
Elongation	2 min, 70°C

Nach Ablauf dieses Programms wurden die Proben automatisch auf 4°C abgekühlt; sie konnten nun entweder kurzzeitig gekühlt gelagert

werden oder direkt für den Nested-PCR-Schritt weiter verwendet werden. Für den Nested-PCR-Ablauf wurden eigens für diesen Schritt vorbehaltene Pipetten und gestopfte Pipettenspitzen verwendet, um Kontaminationen der Gebrauchs- und Stammlösungen bzw. anderer Proben durch DNA-Aerosole zu vermeiden.

Nested-PCR

Mit der Nested-PCR wird das PCR-Produkt der ersten Amplifikation wiederum einer PCR unterzogen und somit nochmals die Produktmenge exponentiell vergrößert. 5 µl des Amplifikats wurden in die 2. Amplifikation als Ausgangsprodukt (Template) eingesetzt. Das Template und der PCR-Mix wurden gevortext und zentrifugiert. Mineralöl wurde darüber geschichtet. Der Ansatz durchlief das interne Programm ebenfalls mit 35 Zyklen.

Tabelle 7: Zweiter PCR-Durchlauf

Denaturierungsvorlauf	4 min, 94°C (einmalig zu Programmbeginn)
Denaturierung	1 min, 94 °C
Annealing	1 min, 60 °C
Elongation	2 min, 70 °C

Negativkontrollen

DNA-Amplifikate können in sehr hohen Konzentrationen vorliegen, so dass beim Öffnen der Reaktionsgefäße benachbarte Reaktionsansätze kontaminiert werden können. Dies ist insbesondere beim Pipettieren der Nested-PCR zu befürchten, da es hier notwendig ist, die Reaktionsgefäße zu öffnen und zu schließen. Solche kontaminierten Proben erscheinen nach dem Nested-PCR-Schritt in der Gelelektrophorese als falsch positiv. Um mögliche Kontaminationen zu erkennen, wurden bei jeder PCR Negativkontrollen mit angesetzt. Hierbei wurden anstelle von Proben oder Positivkontrollen Aqua tridest. als Template

eingesetzt (Volumen 5 μ l). Diese Proben durchliefen mit den anderen Ansätzen den gesamten PCR-Ablauf. Wäre es beim Pipettieren der Nested-PCR zu Kontaminationen gekommen, so hätten die DNA-negativen Proben positive Ergebnisse in der Elektrophorese ergeben.

Gelelektrophorese

Die Stammlösung des zehnfach konzentrierten Puffers (TBE) wurde durch Zugabe von Aqua tridest. in der erforderlichen Konzentration auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml eingestellt. Die Lösung wurde unter dem Abzug in einem getrennten Arbeitsraum angesetzt.

Zwei Gramm Agarose wurden zu 50 ml TBE-Gebrauchslösung in einen Erlenmeyerkolben gegeben; der Erlenmeyerkolben war mit einem Magnetrührer beschickt. Auf einer Heizplatte wurde die Lösung zum Kochen und Aufschäumen gebracht, zwei Minuten weitergekocht und schließlich zum Abkühlen für fünf Minuten von der Heizplatte genommen. Dem leicht abgekühlten Gel wurden 50 ml TBE-Gebrauchslösung Ethidiumbromid hinzugefügt und die Lösungen erneut gemischt. Nach Abkühlen des Gels auf ca. 50–60°C wurde es in die Gelträger gegossen. Sofort im Anschluss wurden die Kämmen eingehängt, wodurch Geltaschen geschaffen wurden, in die später die Amplifikate pipettiert wurden. Die Gele waren nach etwa 15–20 Minuten fest, und die Kämmen konnten entfernt werden. Die Gele wurden samt Gelträger in die Elektrophoresekammer eingehängt, die mit TBE-Gebrauchslösung gefüllt waren.

Der Ladefarbstoff wurde durch Mischen von 30% Glycerin und 70% Farbe (Xylencyanol-Bromphenolblau 1:1) hergestellt. In die Vertiefungen von Terasaki-Wells wurden je 2 μ l Ladefarbstoff vorgelegt. Zum Ladefarbstoff wurden je 20 μ l PCR-Produkt pipettiert mit dem PCR-Produkt gemischt und die Mischung in eine Geltasche pipettiert.

Das PCR-Amplifikat wandert im Gel bei der Elektrophorese entsprechend seines Gewichtes, also entsprechend der Länge der DNA-Stränge. Nach Abschluss der Elektrophorese sind, im UV-Licht betrachtet, Banden unterschiedlicher Höhe, je nach Wanderstrecke

des Amplifikats, zu sehen. Die Länge des Amplifikats, der zweiten PCR betrug 399 Basenpaare (bp). Eine Bande bei 399 bp zeigte das Vorhandensein von Chlamydien-DNA an. Um die Bande im Gel entsprechender Länge des Amplifikats zuordnen zu können, wurde ein DNA-Marker verwendet, welcher alle 100 Basenpaare eine Bande zeigt. Dieser Molekulargewichtsmarker wurde mit Farbstoff und TBE im Verhältnis 1:5:4 gemischt und 20 µl in das erste Loch der Stanzlochreihe des Gels pipettiert

Nach dem Beschicken der Geltaschen wurde die Elektrophoresekammer geschlossen, und das Gerät lief bei 100 mV, bis eine Auftrennung des Molekulargewichtsmarkers und der Amplifikate stattgefunden hatte.

Unter UV-Licht wurden die Gele dann bei Blende 5,6 und einer Belichtungszeit von $\frac{1}{2}$ Sekunde fotografiert.

2.3.3.3 Etablierung von PCR und Nested-PCR

Vergleich von einfachem und doppeltem PCR-Durchlauf (Nested-PCR)

Abb. 6 zeigt in der oberen Reihe das PCR-Ergebnis nach erstem PCR-Durchlauf, in der unteren Reihe das Ergebnis nach zweitem PCR-Durchlauf.

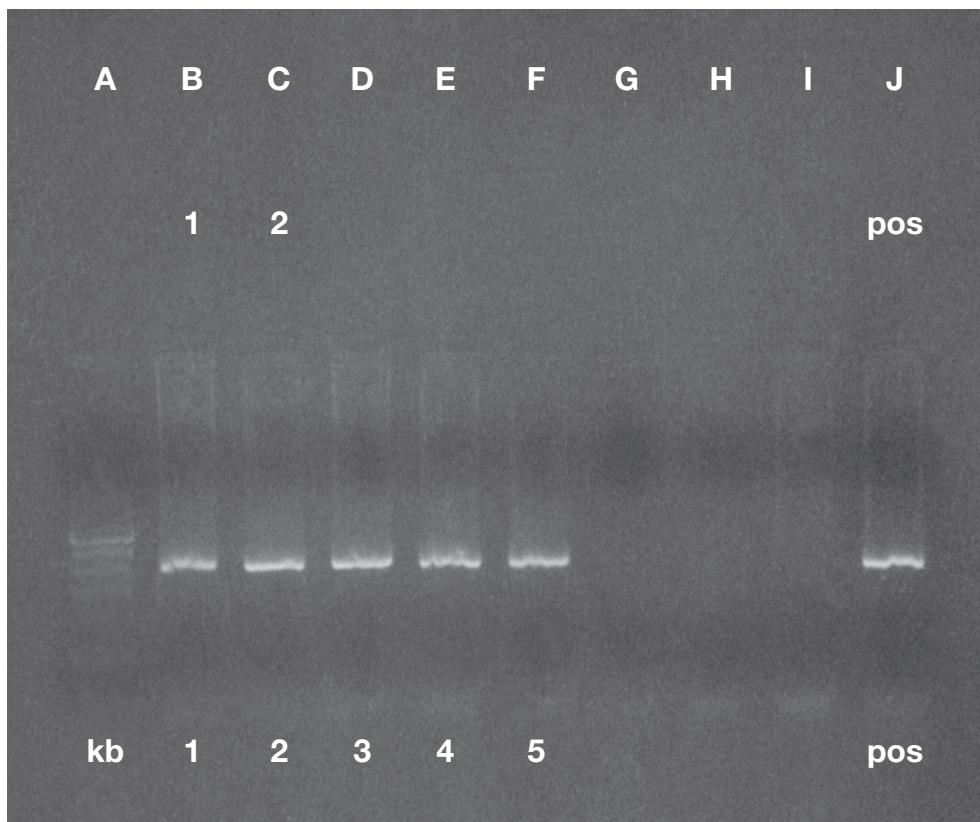


Abb. 6: Vergleich von einfachem (oben) und doppeltem (unten) PCR-Durchlauf (Nested-PCR) am Beispiel des *C. pneumoniae*-Referenzstammes.

A: Molekular-gewichtsmarker,

B-H: abnehmende Konzentration der DNA im PCR-Ansatz (1:10¹–1:10⁷),

I: Negativ-Kontrolle (Aqua tridest.),

J: interne Positivkontrolle, *C. pneumoniae*-DNA

Der Vergleich der Ergebnisse des einfachen und des Ablaufes der Nested-PCR zeigt eine deutliche Zunahme der Nachweisgrenze durch die Nested-PCR um drei Dezimalstellen.

2.3.4 Analyse des Aktenmaterials der Patienten mit positiven Seroantikörpern und positivem Direktnachweis

Um klinische Einflussfaktoren zu finden, wurden die Krankenakten der sieben Patienten deren Sero- und BAL-Proben positiv waren hinsichtlich der Parameter, die zuvor auch retrospektiv untersucht worden waren, analysiert und die Ergebnisse für jeden Patientenfall beschrieben (Tabelle 21, siehe Anhang).

2.4 Statistik

Für die statistische Auswertung des retrospektiven Teils der vorliegenden Arbeit wurden standardisierte Kreuz-Tabellen erstellt und diese mittels des χ^2 -Tests ausgewertet. Dabei gilt ein p-Wert von $\geq 0,05$ als statistisch nicht signifikant, ein Wert von $< 0,05$ ist statistisch signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

Dieses Statistikverfahren wurde für die folgenden Untersuchungsmerkmale in Bezug auf die Fall- und Kontrollgruppe im untersuchten Zeitraum angewandt. Es sollte geklärt werden, ob es unter der Berücksichtigung der Untersuchungsmerkmale zu signifikant unterschiedlichen Verteilungen der Patientenfälle zwischen Fall -und Kontrollgruppe kommen würde.

Für den prospektiven Teil wurde der standard error of proportion errechnet ($\sqrt{\frac{p \times (1-p)}{N}}$). Mit Hilfe des standard errors wurden 95%-Konfidenzintervalle errechnet (GIESECKE 1994).

3 Ergebnisse

3.1 Retrospektiver Untersuchungsteil

Um zu prüfen, ob es zu einer *C. pneumoniae*-assoziierten Infektion bei intubierten Patienten mit positiven serologischen Antikörpernachweisen gegen *C. pneumoniae* gekommen ist oder der Positivnachweis einer Titerpersistenz oder einer unspezifischen Reaktion entsprach, wurden retrospektiv Daten aus den Krankenakten der stationären Aufenthalte von 27 beatmeten Patienten analysiert. Aus dieser Datenmenge wurden zunächst die unter 2.2.3. aufgelisteten Untersuchungsmerkmale unter klinischen Aspekten ausgewählt. Diese erschienen für eine *C. pneumoniae*-Infektion Hinweis gebend. Es wurden zwei Patientengruppen gebildet, eine Fallgruppe mit Patienten mit serologischem Nachweis von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* und eine Kontrollgruppe mit seronegativen Patienten. Die beiden Patientengruppen wurden hinsichtlich der Untersuchungsmerkmale miteinander statistisch verglichen.

3.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse des retrospektiven Teils

Es wurden standardisierte Kreuz-Tabellen erstellt und mittels des χ^2 -Tests auf statistische Signifikanz überprüft (s. Anhang).

Es konnte eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Patienten nur in Bezug auf das Untersuchungsmerkmal „intrazellulär wirksame Antibiotika“ zwischen Fall- und Kontrollgruppe gefunden werden. Einer von 15 Patienten innerhalb der Positivgruppe wurde tatsächlich wegen einer vermuteten *C. pneumoniae*-Infektion mit Doxycyclin behandelt. In den anderen Fällen wurde ein intrazellulär wirksames Antibiotikum kalkuliert vor Kenntnis der positiven Serologie verabreicht. Alle anderen Untersuchungsmerkmale zeigten keine signifikant unterschiedliche Verteilung im Vergleich der beiden Gruppen (Tabellen 8–16, s. Anhang). Die Analyse ergab somit keinen Anhalt dafür, warum sich die beiden Gruppen hinsichtlich der Serologie unterschieden.

3.2 Prospektiver Untersuchungsteil

Um die Ursachen der erhöhten serologischen Antikörpernachweise gegen *C. pneumoniae* eher erfassen zu können, wurde im zweiten Teil der Arbeit eine Patientengruppe mit 92 Patienten prospektiv untersucht. Von Oktober 2000 bis Juli 2003 wurden alle auf der medizinischen Intensivstation aufgenommenen Patienten erfasst, die beatmungspflichtig waren, mindestens zwei Wochen stationär behandelt wurden, bei denen mindestens eine BAL vorgenommen wurde und von denen mindestens ein Serum zum Antikörpernachweis von *C. pneumoniae* eingesandt worden war. Die Seroproben der Patienten wurden mittels ELISA untersucht. Die BAL-Proben wurden mittels der in unserem Labor etablierten und validierten PCR untersucht. Außerdem wurde eine Auswertung des Aktenmaterials der Patienten, deren PCR in der BAL positiv war, vorgenommen. Hierzu wurden die Untersuchungsmerkmale, welche im retrospektiven Untersuchungsteil dieser Arbeit beschrieben wurden, analysiert und die Ergebnisse beschrieben.

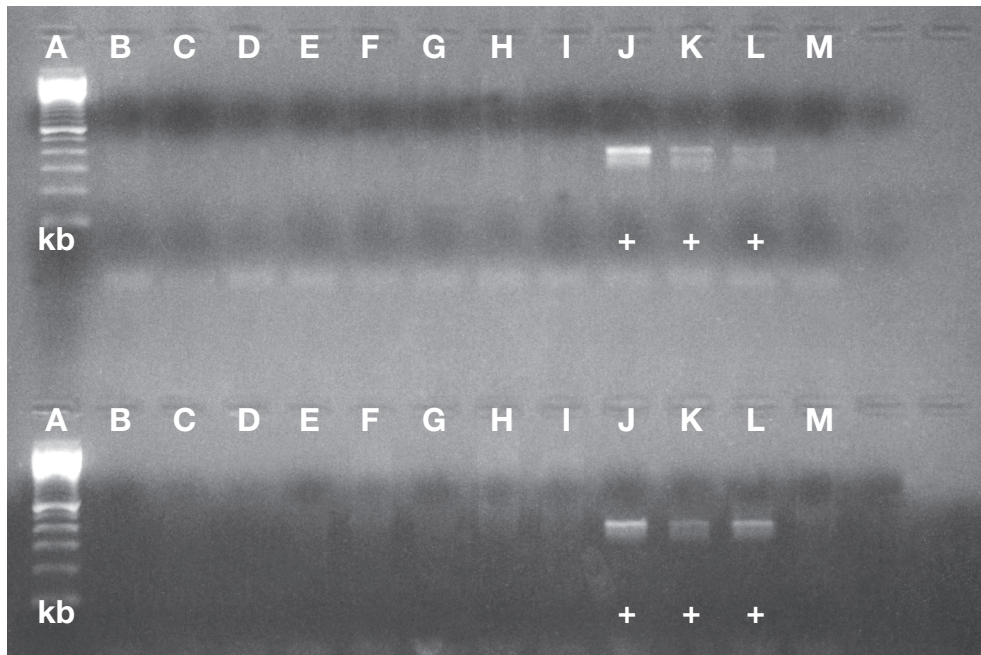


Abb. 7: Nested-PCR mit negativem Untersuchungsergebnis am Beispiel von Patientenproben.

Banden A–L

(in oberer und unterer Reihe 2. Amplifikationsdurchgang)

A: Molekulargewichtsmarker,

B–I: Patientenproben, jeweils keine Banden sichtbar

J–L: Positivproben Verdünnung $1:10^4$ – $1:10^7$ von *C. pneumoniae*-Stamm*), jeweils Banden sichtbar

*) *C. pneumoniae* (Stamm TW-183, Charge 01.02.2001, Titer 3×10^6 IFUs/ml) in Suspension von PBS, Professor Straube, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für medizinische Mikrobiologie, zur Verfügung gestellt. 1ml Bakteriensuspension enthielt 3×10^6 IFU (Inclusion forming units, Einschlußkörper bildende Einheiten). Die Verdünnungsreihe mit der *C. pneumoniae*-Bakteriensuspension wurde bis 10^{-7} geführt. Ein Nachweis von *C. pneumoniae*-spezifischer DNA war bis 10^{-6} als Bande im Gel sichtbar, so dass von einer Sensitivität von ca. 1 Erreger/ml auszugehen ist.

M: Negativ-Kontrolle Aqua tridest.

Die in diesem Versuchsansatz getesteten Patientenproben ergaben negative Ergebnisse.

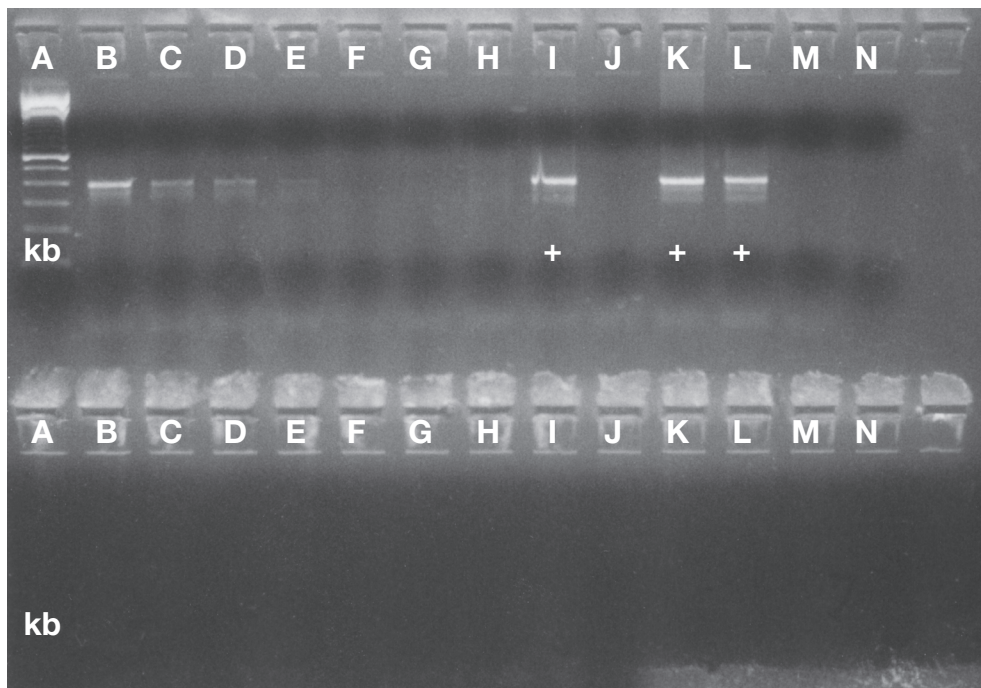


Abb. 8: Nested-PCR mit positiven Patientenproben

Banden A–N

- A:** Molekulargewichtsmarker
- B–F:** Patientenproben: die Ziffern 1–5 markieren die Ergebnisse der BAL-Analyse einer Patientin
- G–I:** weitere Patientenproben anderer Patienten, von denen eine in Position I ein positives Ergebnis aufweist
- J–M:** Bande: Positivproben (Ziffern 4–7), Verdünnung von *C. pneumoniae*-Stamm mit einem Erregernachweis von ca. einem Erreger *C. pneumoniae* (Stamm TW-183, Charge 01.02.2001, Titer 3×10^6 IFUs/ml), vgl. Abb. 3
- N:** Bande: Negativ-Kontrolle Aqua tridest.

3.2.1 Ergebnisse der Untersuchung von BAL-Proben

Bei der Untersuchung von 100 BAL-Proben von 92 Patienten konnte *C. pneumoniae*-spezifische DNA in 12 Proben von 11 Patienten mittels Nested-PCR nachgewiesen werden. Um die Richtigkeit des Ergebnisses zu überprüfen, wurden die in der ersten PCR-Untersuchung positiv getesteten BAL-Proben erneut getestet. Ließen sich die posi-

Ergebnisse

tiven Ergebnisse nicht bestätigen, so wurden sie ein weiteres Mal getestet. Die BAL-Proben, deren Ergebnis auf diese Art und Weise einmal bestätigt wurden, wurden positiv gewertet. Dadurch wurden acht Proben von sieben Patienten positiv gewertet (Tabelle 8). Bei drei Patientenproben konnte das Ergebnis der ersten Analyse nicht bestätigt werden. Ein Patient wies zwei positive Proben auf.

Tabelle 8: Ergebnisse der BAL-Analyse der Positivpatienten

Patienten	Alter	Geschlecht	1. Resultat	2. Resultat	3. Resultat
Patient 1	42	Weiblich	pos	pos	n.d.
Patient 2	83	Weiblich	pos	pos	n.d.
Patient 3	29	Weiblich	pos	pos	n.d.
Patient 4	60	Männlich	pos	pos	n.d.
Patient 5	72	Männlich	pos	neg	pos
Patient 6	58	Männlich	pos	pos	n.d.
Patient 7	79	Weiblich	pos	pos	n.d.

pos = positives Ergebnis der PCR,
neg = negatives Ergebnis der PCR,
n.d. = nicht durchgeführt

Waren weitere BAL-Proben bei einem Patienten mit positivem PCR-Nachweis vorhanden, so wurden diese zur Verlaufskontrolle untersucht. Bei Patient 3 waren noch sieben weitere BAL-Proben vorhanden, davon waren die Proben 1–4 positiv, Probe 5 negativ, Probe 6 positiv und Probe 7 erneut negativ. Bei Patient 5 ergab eine weitere spätere BAL-Probe ein negatives Testergebnis. Die spätere Probe des Patienten 6 war ebenfalls positiv.

3.2.2 Korrelation von PCR- zu ELISA –Ergebnissen

Die Tabelle 9 stellt zusammenfassend die PCR-Ergebnisse den Antikörpernachweisen, ermittelt durch ELISA 1 und ELISA 2, gegenüber.

Tabelle 9: Serologie gesamt/PCR

	PCR Positiv	PCR Negativ	Serologie-Gesamt
Serologie gesamt positiv (ELISA 1 und 2)	7	55	62
Serologie gesamt negativ (ELISA 1 und 2)	0	30	30
PCR-Gesamt	7	85	92

Es zeigte sich eine hohe Zahl an *C. pneumoniae* positiven Antikörpernachweisen (67,3%, 95%-iges Konfidenzintervall 66 bis 68%) und ein nur geringer Anteil von PCR-positiven BAL-Proben (7,6%, 95%-iges Konfidenzintervall 2,1 bis 13,1%). Bei keinem Patienten ohne Antikörpernachweis ergab die PCR aus der BAL-Probe ein positives Ergebnis.

Die Tabelle 10 stellt die PCR-Ergebnisse den Antikörpernachweisen, ermittelt durch ELISA 1 gegenüber.

Tabelle 10: ELISA 1/PCR

	PCR Positiv	PCR Negativ	Serologie-Gesamt
ELISA 1 Positiv	2	30	32
ELISA 1 Negativ	0	23	23
PCR-Gesamt	2	53	55

Ergebnisse

32 von 55 Patienten wiesen somit positive Seroergebnisse auf (58%, 95%-iges Konfidenzintervall 44,9 bis 71,5%). Demgegenüber ist der Anteil positiver PCR-Ergebnisse (3,6%, 95%-iges Konfidenzintervall von null bis 8,6%) äußerst gering. Zu keinem der Patienten ohne Antikörpernachweis lagen positive BAL-Proben vor.

Die Tabelle 11 stellt die PCR-Ergebnisse den Antikörpernachweisen, ermittelt durch ELISA 2 gegenüber

Tabelle 11: ELISA 2/PCR

	PCR Positiv	PCR Negativ	Serologie-Gesamt
ELISA 2 Positiv	5	25	30
ELISA 2 negativ	0	7	7
PCR-Gesamt	5	32	37

Es zeigt sich erneut ein hoher Anteil Seropositiver (81%, 95%-iges Konfidenzintervall 68 bis 94%) und ein geringer Anteil PCR-positiver BAL-Proben (3,5%, 95%-ige Konfidenzintervall 2,5 bis 24%). Auch in dieser Patientengruppe war bei keinem Patienten mit negativem ELISA die PCR aus BAL-Material positiv.

Es konnte somit gezeigt werden, dass sich ELISA 1 und 2 hinsichtlich des Anteils seropositiver, PCR negativer Patienten, nicht unterscheiden.

3.2.3 Analyse der Krankenakten der Patienten mit Antikörpernachweis gegenüber *Chlamydia pneumoniae*-spezifischem Antigen und positiver PCR in der BAL-Flüssigkeit

Sieben Patienten hatten Antikörper gegen *C. pneumoniae* und die PCR der BAL-Proben ergaben ein positives Ergebnis. Alle sieben Patienten wiesen im Untersuchungszeitraum eine Azidose und erhöhte Transaminasen auf und wurden mit intrazellulär wirksamen Antibiotika therapiert. Bis auf Patient 1 wiesen alle Patienten eine Leukozytose auf (siehe Tabelle 21).

Patient 1

Bei der 42-jährigen Patientin wurde im Jahr 2000 eine aplastische Anämie erstmals diagnostiziert. Sieben Monate später wurde die Diagnose einer akut myeloischen Leukämie gestellt. 30 Monate später wurde die Patientin stationär auf eine periphere Normalstation zur Durchführung einer Stammzelltransplantation aufgenommen. In der Folge erlitt die Patientin eine substitutionspflichtige Trizytopenie mit neutropenischem Fieber. In Blutkulturen und Urinkult wurde *Candida tropicalis* nachgewiesen. Es wurde eine antimykotische Therapie mit Fluconazol durchgeführt. Die Übernahme auf die Intensivstation erfolgte 2 Wochen nach Aufnahme auf die Normalstation wegen respiratorischer Insuffizienz bei septischem Zustand der Patientin unter antimykotischer Therapie. Bei zunehmender respiratorischer Insuffizienz musste die Patientin am Folgetag intubiert und beatmet werden. Nach vier weiteren Tagen zeigte eine Röntgenaufnahme der Thoraxorgane eine interstitielle Zeichnungsvermehrung beidseits. Während des Beobachtungszeitraums kam es zu einer CMV-Reaktivierung. Die Chlamydien-Serologie ergab bei der Patientin nach Verlegung auf die Intensivstation einen hoch positiven IgA- und positiven IgG-Index. Sowohl IgA- als auch IgG-Index fielen im Zeitraum von 2 Wochen leicht ab. Der Chlamydien-DNA-Nachweis erfolgte am Tag der Intubation, einen Tag nach Übernahme von der Normalstation. 3 Tage nach Ver-

Ergebnisse

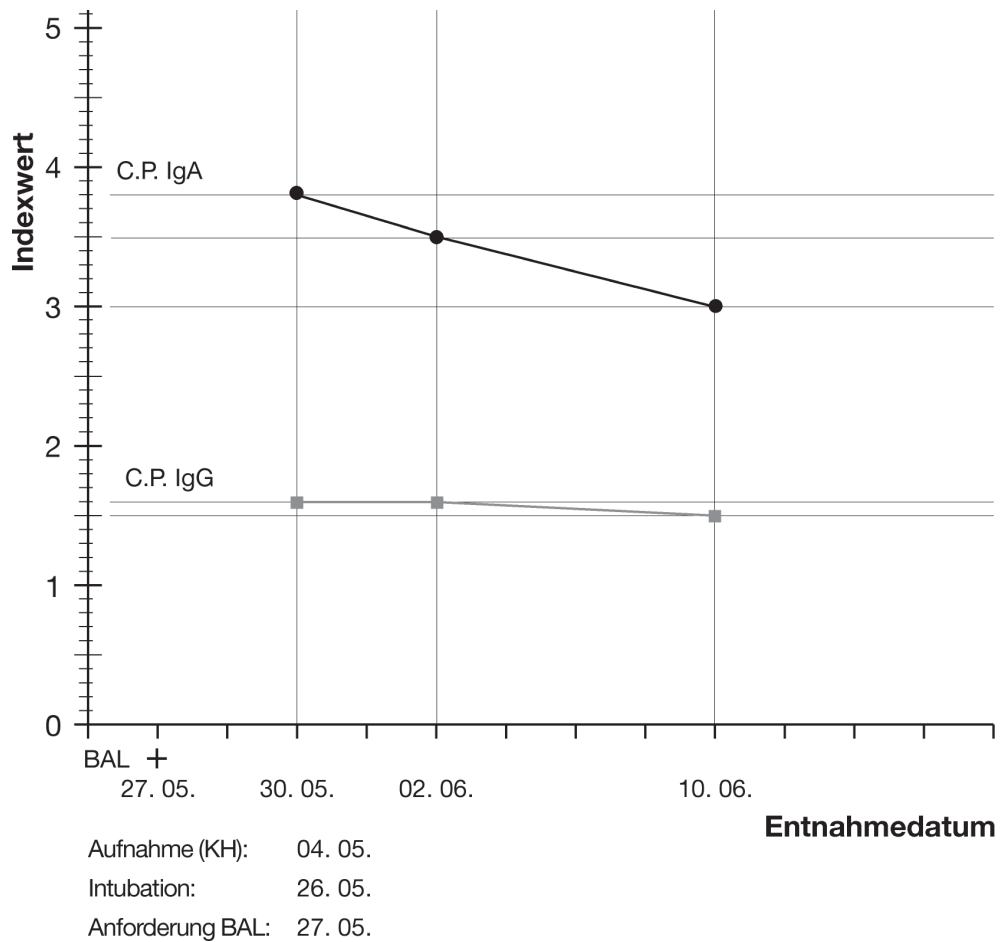


Abb. 9 (Patient 1)

legung auf die Intensivstation erhielt die Patientin Ciprofloxacin. Der Verlauf der Antikörper und die positive PCR bei Verlegung auf die ITS sprechen für eine ambulant erworbene Pneumonie durch *C. pneumoniae*.

Patient 2

Die 83-jährige Patientin wurde zunächst auf der interdisziplinären Intensivstation (IOP) im CBF behandelt. Der Grund der Aufnahme auf die IOP war die Notwendigkeit der postoperativen Versorgung bei Zustand nach Hartmann-Operation und Transversostomaanlage im Rahmen einer Kolonperforation. Die Patientin entwickelte im Laufe der Langzeit-

Ergebnisse

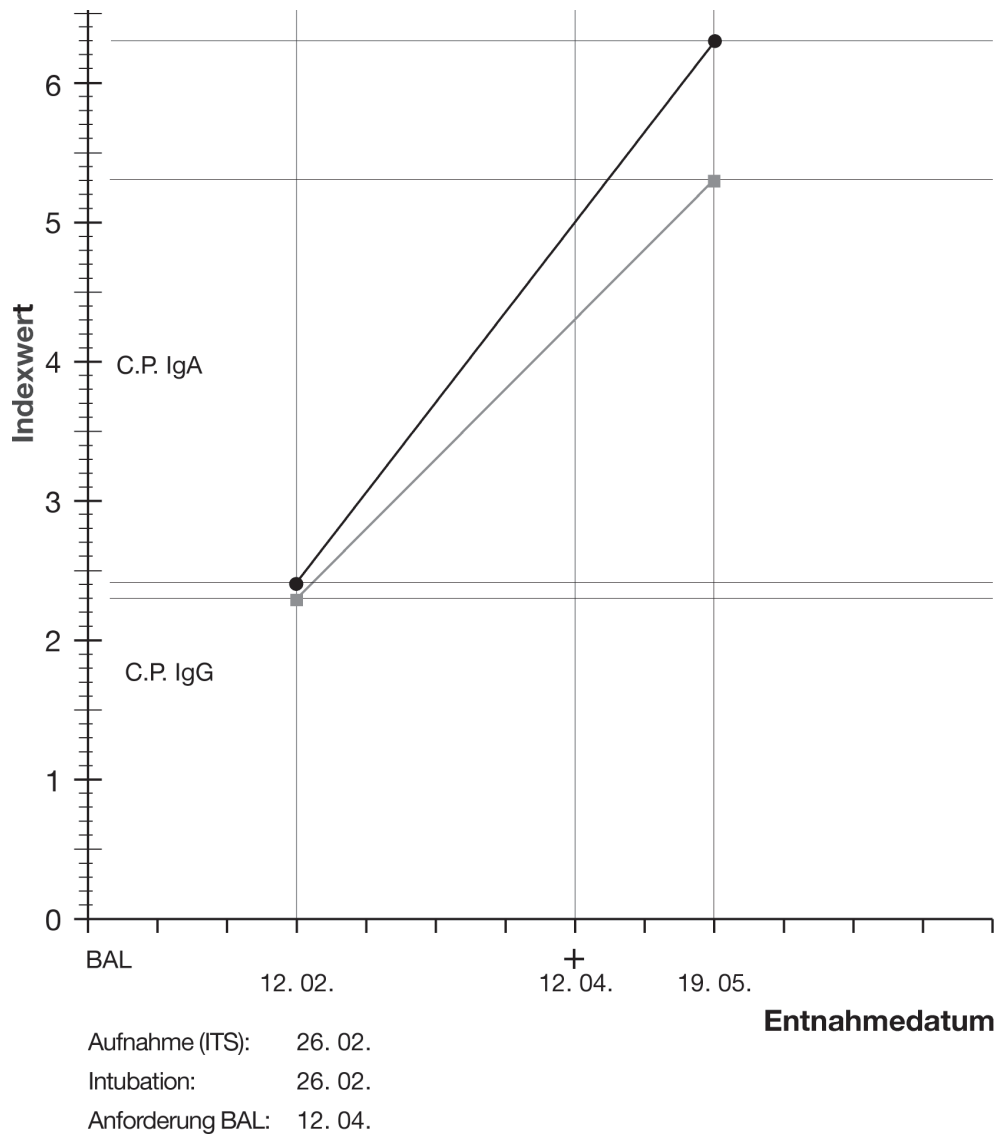


Abb. 10 (Patient 2)

beatmung eine Pneumonie mit multiresistenten Bakterien (MRSA, Pseudomonas aeruginosa) und Sprosspilzen. Ein 3 Wochen nach Aufnahme auf die IOP erfolgtes Röntgenbild der Thoraxorgane stellt beidseits Pleuraergüsse dar. Bei radiologisch scharfer Abgrenzung bestand rechtsseitig der Verdacht auf einen abgekapselten Prozess.

2 Wochen später wird die Patientin auf die innere Intensivstation (ITS) verlegt. Die Chlamydien-Serologie ergab bei der Patientin bei Verle-

gung auf die ITS einen positiven IgA- und IgG-Index. Im Verlauf von 2 Monaten stieg der IgA-Index deutlich an, der IgG-Index stieg ebenfalls an, aber im Vergleich zum IgA-Index weniger. Der einzige erfolgte Nachweis von DNA aus der BAL war drei Wochen nach Übernahme auf die ITS positiv.

Die Patientin erhielt initial bei Übernahme Ciprofloxacin und eine Woche später Erythromycin nach Kenntnis der positiven Chlamydien-Serologie und des radiologischen Verdachts auf eine interstitielle Pneumonie. Des Weiteren erhielt sie einen Tag später 2 FFP. Zusätzlich erhielt sie im Verlauf ihres Aufenthaltes Tazobactam/Ceftazidim und Fluconazol. Der Verlauf der Antikörper und die spät positive PCR sprechen in diesem Fall nicht eindeutig für eine ambulant erworbene Pneumonie. IgA-Anstieg und gleichzeitiger IgG-Anstieg und das positive PCR-Ergebnis 3 Wochen nach Aufnahme auf die ITS wären auch mit einer nosokomial erworbenen Pneumonie zu vereinbaren. Eine weitere mögliche Erklärung für den Anstieg der Seroantikörper wäre der gleichzeitige Nachweis eines gramnegativen Stäbchens als Infektionserreger im Bronchialmaterial (*P. aeruginosa*) und der damit möglicherweise einhergehenden Kreuzreaktion des ELISA mit dem LPS der Zellwand des gramnegativen Bakteriums.

Patient 3

Die 29-jährige Patientin wurde zur Disoprivan/Thiopental-Narkose auf die Intensivstation von der Neurologie/CBF übernommen. 2 Wochen zuvor befand sie sich für 5 Tage in stationärer Behandlung in der Psychiatrie/Eschenallee wegen psychischer Störungen mit ausgeprägtem Wahn von wo sie im Verlauf wegen des Verdachts auf eine Virusenzephalitis auf die Neurologie/CBF verlegt wurde. Eine am Aufnahmetag (ITS) durchgeführte Bronchoskopie zeigte das Bild einer ausgeprägten Tracheobronchitis, links betont. Es lag eine weißlich zähe Hypersekretion vor, die mit einer Aspirationspneumonie vereinbar war. Später ließ sich kein Sekretverhalt mehr nachweisen. Eine 3 Tage nach Aufnahme auf die ITS erfolgte Röntgenaufnahme der Thoraxorgane

Ergebnisse

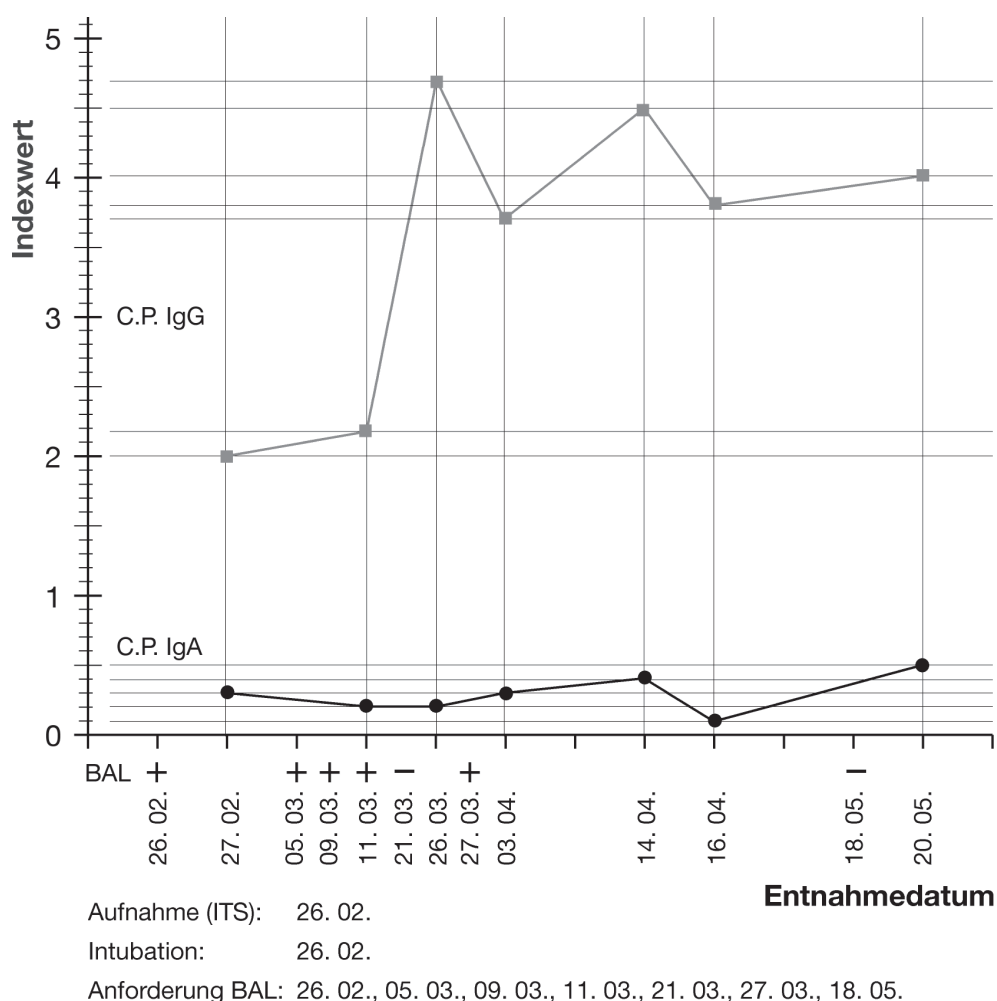


Abb. 11 (Patient 3)

zeigte keine Infiltrate oder Zeichnungsvermehrungen im Sinne einer Pneumonie. In der mikrobiologischen Untersuchung der bronchoalveolären Lavage auf Erreger und Resistenz zeigte sich kein Nachweis eines Erregers mit signifikanter Keimzahl.

Die Chlamydien-Serologie der Patientin ergab bei Aufnahme auf die ITS einen positiven IgG-Index bei negativem IgA-Index. Die PCR war nach Aufnahme auf die ITS positiv und nach 2 Wochen wiederholt positiv (Proben 2–6).

Die DNA-Nachweise 5 und 7 waren negativ. Die Patientin erhielt 11 Tage nach Aufnahme auf die ITS Ciprofloxacin zeitlich vor Anstieg der

Ergebnisse

Antikörper im ELISA und nach positivem DNA-Nachweis. Der Verlauf der Antikörper und der positive DNA-Nachweis bei Übernahme auf die ITS sprechen für eine ambulant erworbene Pneumonie.

Patient 4

Der 61-jährige Patient wurde zunächst wegen eines Erysipels am linken Unterschenkel und eines Harnwegsinfektes auf einer peripheren Station behandelt. Nach 2 Wochen wurde der Patient wegen Verschlechterung des Allgemeinzustands bei dekompensierter Nieren und Herzinsuffizienz zunächst auf die interdisziplinäre operative In-

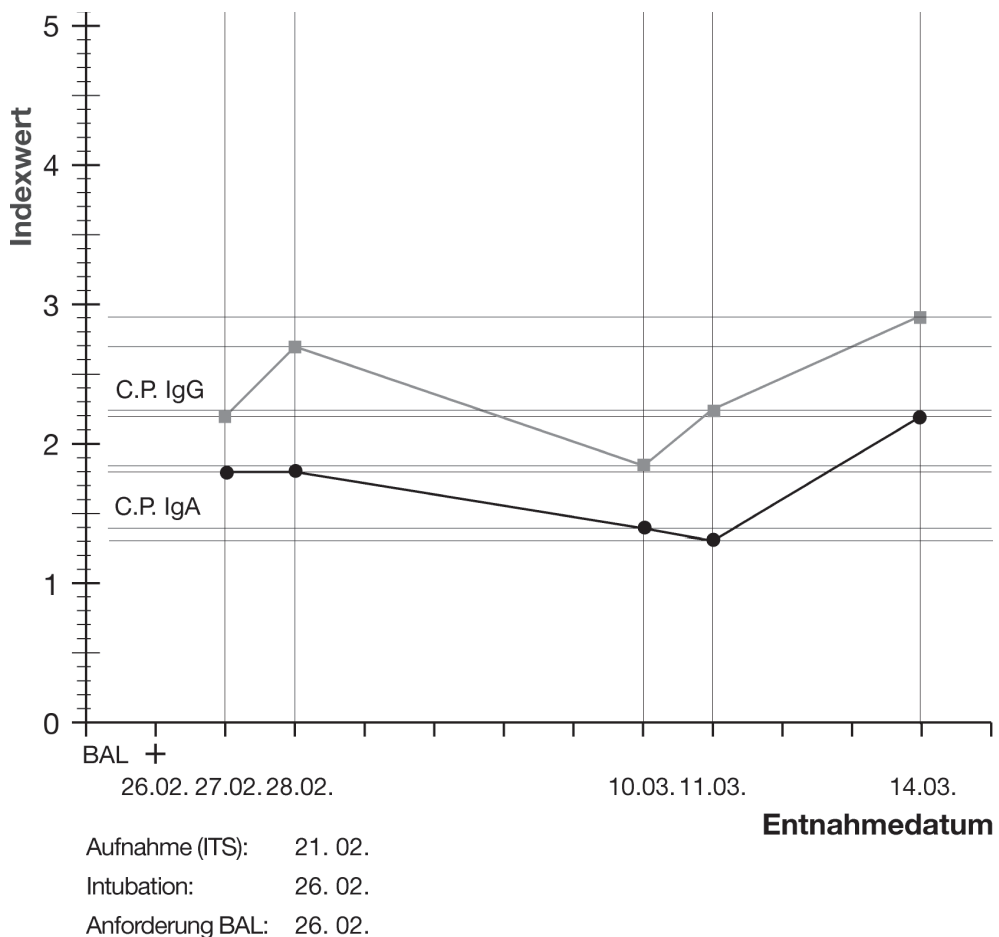


Abb. 12 (Patient 4)

tensivstation (IOP) des CBF übernommen und am selben Tag wegen zunehmender respiratorischer Insuffizienz intubiert. In den Röntgenbildern der Thoraxorgane nach Aufnahme ließ sich kein Anhalt für eine entzündliche Veränderung der Lungen finden.

Die Chlamydien-Serologie ergab bei dem Patienten bei Aufnahme auf die IOP einen positiven IgA- und IgG-Index, beide Indices blieben innerhalb von 6 Wochen konstant. Fünf Tage nach Aufnahme auf die IOP wird der Patient auf die allgemeinmedizinische Intensivstation (ITS) verlegt. Der DNA-Nachweis ist fünf Tage nach Aufnahme bei Übernahme auf die ITS positiv.

Der Patient erhielt initial bei Aufnahme auf die IOP Ciprofloxacin vor Kenntnis der positiven Chlamydien-Serologie. Der Verlauf der Antikörper und der positive Direktnachweis bei Aufnahme auf die ITS sprechen für eine ambulant erworbene Pneumonie.

Patient 5

Der 72-jährige Patient wurde wegen hochfieberhafter eitriger Bronchopneumonie von einer peripheren Station übernommen, wo er seit einer Woche behandelt worden war und wegen zunehmender respiratorischer Insuffizienz am Tag der Verlegung intubiert. Eine am selben Tag erfolgte Bronchoskopie wies eitriges Sekret nach. Die mikrobiologische Aufarbeitung der BAL zeigte polymorphkernige Leukozyten; es wurde Wachstum von *Candida krusei*, *Candida tropicalis* und *Enterococcus faecium* mit relevanter Keimzahl nachgewiesen. Ein Röntgenbild der Thoraxorgane 3 Tage nach Aufnahme zeigte eine streifige Zeichnungsvermehrung im linken Unterfeld.

Bei Aufnahme wurden Antikörper gegen *C. pneumoniae* nachgewiesen, sowohl der IgA-, als auch der IgG-Index waren bei Aufnahme positiv. Der erste DNA-Nachweis war bei Aufnahme positiv, der zweite nach 18 Tagen erneut positiv, der dritte einen Monat nach Aufnahme des Patienten negativ.

3 Tage nach Aufnahme auf die ITS erhielt der Patient zusätzlich Erythromycin nach Kenntnis der positiven Chlamydien-Serologie. Der

Ergebnisse

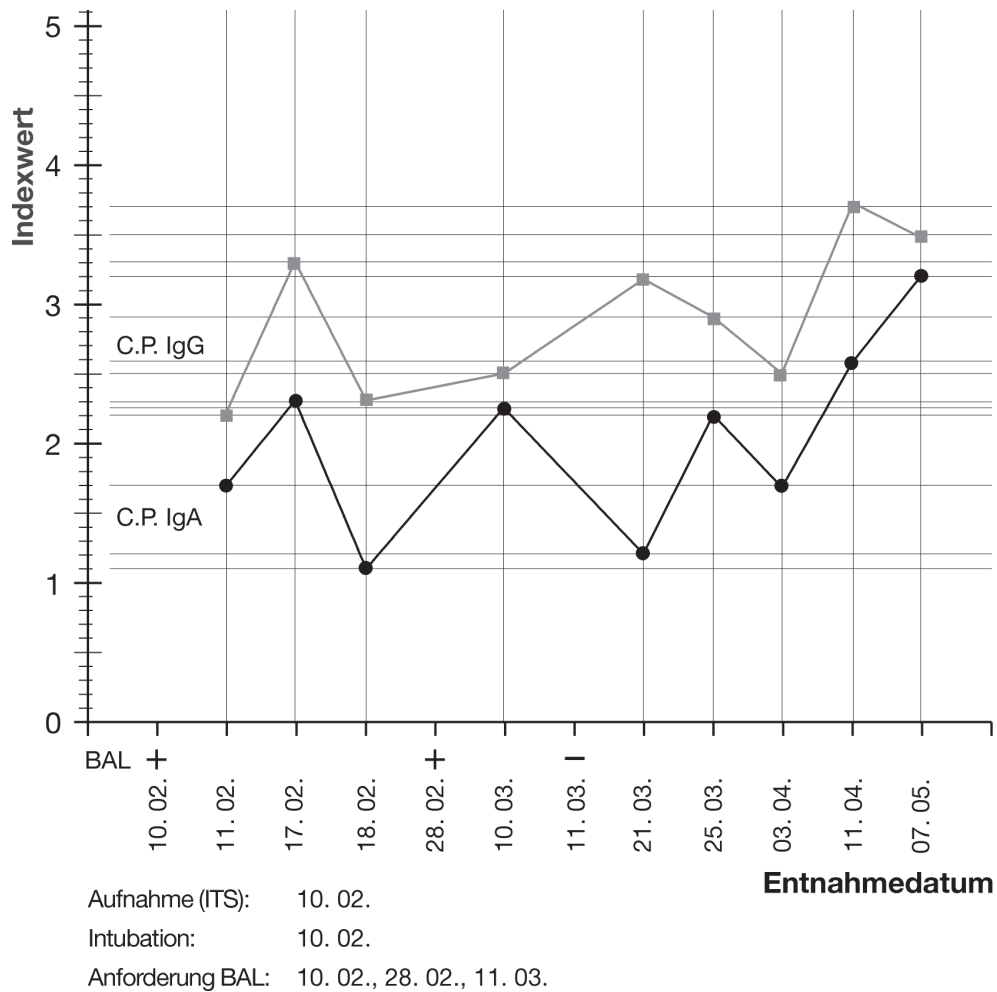


Abb. 13 (Patient 5)

Verlauf der Antikörper und die positiven PCR-Befunde bei Aufnahme sprechen für eine ambulant erworbene Pneumonie mit *C. pneumoniae*.

Patient 6

Der 58-jährige Patient wurde bei bekannter chronisch obstruktiver Lungenerkrankung aufgrund einer Infektexazerbation (Temperaturanstieg auf 39,4°C rektal und laborchemisch nachgewiesene erhöhte Infektparameter) auf die ITS aufgenommen und am selben Tag aufgrund zunehmender respiratorischer Insuffizienz bei Sekretverhalt intubiert. Ein Röntgenbild der Thoraxorgane vom selben Tag zeigte ein

Ergebnisse

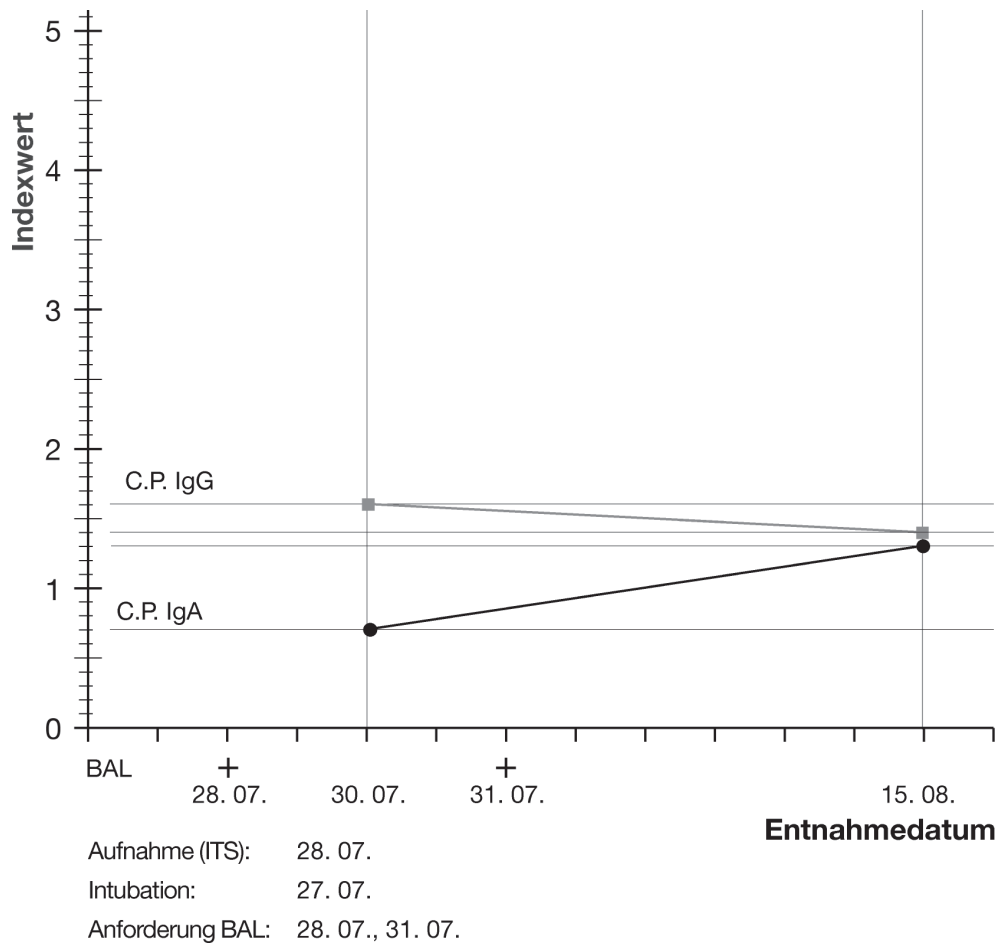


Abb. 14 (Patient 6)

basales Infiltrat rechts sowie einen Emphysemaspekt. In einer Bronchoskopie vom ersten Tag nach Aufnahme zeigte sich das Bild einer erheblich geschwollenen Schleimhaut und ubiquitär reichlich zähes putrides Sekret. Die mikrobiologische Aufarbeitung der BAL-Probe ergab geringes Wachstum von *Candida albicans*, sowie Wachstum von Enterokokken und *Stenotrophomonas maltophilia* mit relevanter Keimzahl.

Eine Woche nach Aufnahme auf die ITS erhielt der Patient 2 FFP. Die Chlamydien-Serologie ergab bei dem Patienten bei Aufnahme einen positiven IgA- und IgG-Index. Ein DNA-Nachweis am Tag der Intubation war positiv, ein weiterer drei Tage nach Intubation. Der

Patient erhielt initial Erythromycin vor Kenntnis der positiven Serologie. Der Verlauf der Antikörper und der positive Direktnachweis bei Aufnahme sprechen für eine ambulant erworbene Pneumonie

Patient 7

Die 79-jährige Patientin wurde wegen eines pulmonalen Inhalationstraumas durch Rauchgas mit Kohlenmonoxydintoxikation aufgenommen und war am vor Aufnahme auf die ITS wegen respiratorischer Insuffizienz bereits vom Notarzt intubiert worden. In der Vorgeschichte war eine chronisch obstruktive Bronchitis bekannt. In einer nach Aufnahme erfolgten Bronchoskopie zeigte sich keine Sekretver-

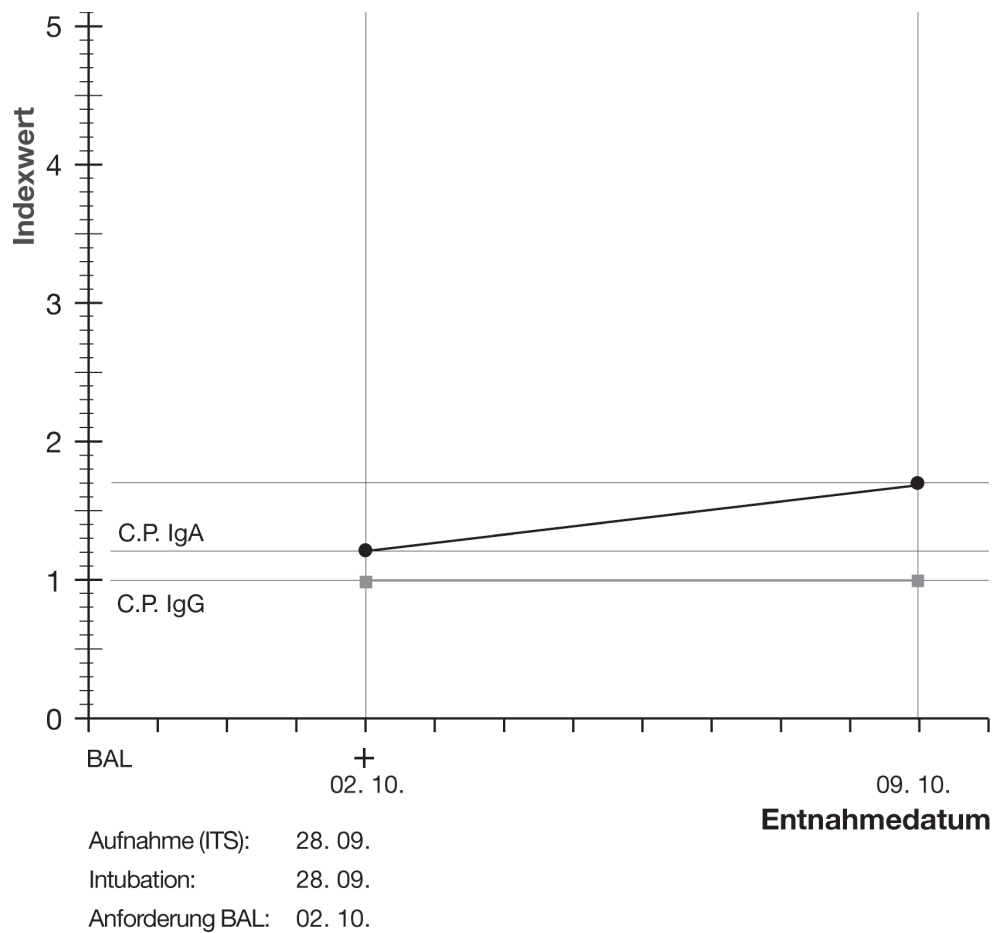


Abb. 15 (Patient 7)

Ergebnisse

mehrung, aber beidseits zähes glasiges Sekret und reichlich Ruß in den Oberlappen. Röntgenbilder der Thoraxorgane zeigten während des stationären Aufenthalts kein Infiltrat.

Die Chlamydien-Serologie der Patientin ergab kurz nach Aufnahme einen positiven IgA-Index bei grenzwertig positivem IgG-Index. Die PCR war in einer BAL-Probe vier Tage nach Aufnahme positiv. Am 08.10. 2001 erhielt die Patientin Ciprofloxacin nach Kenntnis der positiven Chlamydien-Serologie.

Der Verlauf der Antikörper und der positive Direktnachweis bei Aufnahme sprechen für eine ambulant erworbene Pneumonie.

4 Diskussion

Da Pneumonien eine hohe Inzidenz und Letalität besitzen, besteht der Wunsch nach einer schnellen Diagnostik, um rasch und gezielt therapieren zu können. Dies ist auch hinsichtlich des finanziellen Aspekts nach der Einführung von Diagnose Related Groups (DRG) und dem Wunsch nach kürzeren Liegezeiten während stationärer Aufenthalte erwünscht. Seit der Erstbeschreibung im Jahre 1986 (GRAYSTON 1986) wird *C. pneumoniae* als wichtiger Erreger von ambulant erworbenen Pneumonien wahrgenommen. Ob *C. pneumoniae*-assoziierte Pneumonien auch nosokomial erworben wurden, ist unklar.

Der vorliegenden Arbeit liegt folgende Beobachtung zugrunde. Bei der Suche nach einem Infektfokus waren bei Patienten der Intensivstation der Charité, Standort Benjamin Franklin auch Antikörpernachweise gegen *C. pneumoniae* bei beatmeten Patienten erhoben worden, und dabei waren bei mehreren Patienten hohe IgA- und IgG-Antikörpertiter gegen *C. pneumoniae* nachgewiesen worden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun zu untersuchen, ob die erhöhten Antikörpernachweise Ausdruck einer Reaktivierung einer latenten Infektion mit *C. pneumoniae* durch das Beatmungstrauma sein könnten oder ob es zu einer nosokomial erworbenen *C. pneumoniae*-Infektion gekommen war oder ob andere Gründe, z. B. eine zu geringe Spezifität der serologischen Testverfahren zu den positiven Antikörpernachweisen geführt haben.

Dazu wurden eine retrospektive und anschließend eine prospektive Untersuchung durchgeführt.

Im **retrospektiven** Untersuchungsteil wurden Daten aus den Krankenakten von zwei Patientengruppen (Fallgruppe: „Patienten mit Antikörpern gegen *C. pneumoniae*“ und Kontrollgruppe: „seronegative Patienten“) gesammelt. Es wurden unterschiedliche für eine *C. pneumoniae*-assoziierte Infektion sprechende Parameter ermittelt und diese statistisch miteinander verglichen. Das Ergebnis der Analyse zeigte keinen signifikanten Unterschied für 9 von 10 Parametern. Ein signifi-

kanter Unterschied bestand nur hinsichtlich des Parameters „Therapie mit intrazellulär wirksamen Antibiotika“. Dabei zeigte sich, dass bei der Mehrzahl der Patienten diese Therapie kalkuliert vor Kenntnis der positiven *C. pneumoniae*-Serologie begonnen wurde. Nur einer von 15 Patienten innerhalb der Positivgruppe wurde tatsächlich wegen des Nachweises von Antikörpern gegenüber *C. pneumoniae* mit Doxycyclin behandelt. Alle anderen Patienten wurden kalkuliert breit antibiotisch aufgrund einer schweren Erkrankung behandelt. In diesen Fällen deckte das Spektrum der antibiotischen Therapie eine mögliche gleichzeitig bestehende *C. pneumoniae*-Infektion mit ab. Dieses Ergebnis lässt folgende Interpretationen zu:

1. Die gewählten Parameter waren für eine Analyse zur Unterscheidung zwischen Fall- und Kontrollgruppe nicht geeignet. Somit wäre eine Aussage, ob eine schwere Erkrankung eine Reaktivierung einer *C. pneumoniae*-Infektion bedingen könnte, nicht zu treffen oder
2. das serologische Testverfahren hat eine unzureichende Spezifität, oder
3. die erhöhten Antikörper waren Folge einer ambulant erworbenen *C. pneumoniae*-Infektion mit sich spät entwickelnden Antikörpern oder einer Titerpersistenz der *C. pneumoniae*-spezifischen Antikörper, oder
4. die erhöhten Antikörpernachweise waren Ausdruck einer Reaktivierung der *C. pneumoniae*-spezifischen Antikörperreaktion, aber ohne Einfluss auf die ausgewählten Parameter.

Um dies zu prüfen, wurde im zweiten Teil der Arbeit eine Patientengruppe mit 92 Patienten **prospektiv** untersucht. Es wurde hierzu eine validierte PCR (CAMPBELL 1992) etabliert. Positive Patientenproben wurden durch erneute Testung bestätigt; im negativen Fall wurde die Probe ein weiteres Mal untersucht. Die Proben, deren positives Ergebnis durch diese Vorgehensweise mindestens einmal bestätigt werden konnten, wurden positiv gewertet. Es wurde von den in die

Studie eingeschlossenen Patienten mindestens eine BAL-Probe, sowie zwei Serumproben auf *C. pneumoniae*-spezifische Antikörper untersucht.

Bei 62 von 92 Patienten konnte positive Antikörper nachgewiesen werden. Nur bei sieben der 62 antikörperpositiven Patienten war die PCR positiv. Dies entspricht einem Anteil von 11,3%. Keine BAL-Probe von seronegativen Patienten war in der PCR positiv. DTT, eine Substanz, die in der Aufbereitung der BAL-Proben verwendet wurde, kann zur Inhibition im Amplifikationsprozess der PCR führen (MAASS 1994). Dies wurde vor Analyse der Patientenproben zur Erklärung der vielen negativen PCR-Ergebnisse ausgeschlossen.

Für die 7 Patienten mit positivem PCR-Ergebnis wurden klinische Patientendaten (Röntgen-Thorax-Befunde während des stationären Aufenthalts, Aufnahmegrund, Anamnese, vorherige stationäre Aufenthalte, gleichzeitige/der stationären Aufnahme vorausgehende Infektionen) zur Beurteilung der Verläufe herangezogen, die bereits im retrospektiven Untersuchungsteil der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Aufgrund des Verlaufs der Antikörper (konstant positiver IgA- und IgG-Antikörpernachweis bei fehlendem IgA-Anstieg) und aufgrund eines bei Aufnahme auf die Intensivstation positiven Direktnachweises (PCR) kann bei Patient 1 am ehesten eine vor dem stationären Aufenthalt abgelaufene Infektion mit *C. pneumoniae* mit trägem Titerverlauf vermutet werden.

Der Verlauf der Antikörper und die 3 Wochen nach stationärer Aufnahme positive PCR sprechen bei Patient 2 nicht eindeutig für die Diagnose einer ambulant erworbenen Pneumonie. Es konnte ein IgA-Anstieg und ein gleichzeitig trägerer IgG-Anstieg nachgewiesen werden. Leider wurde keine weitere BAL-Probe, v.a. unmittelbar nach Aufnahme auf die Intensiveinheit genommen. Ursprünglich aufgenommen wegen einer Kolonperforation, entwickelte die Patientin während des stationären Aufenthaltes eine interstitielle Pneumonie.

Dies wäre ebenso mit einer nosokomialen *C. pneumoniae*-assoziierten Infektion zu verbinden.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die erhöhten Antikörper wäre der gleichzeitige Nachweis eines gramnegativen Stäbchens als Infektionserreger im Bronchialmaterial (*P. aeruginosa*) und der damit möglicherweise einhergehenden Kreuzreaktion des ELISA mit dem LPS der Zellwand des gramnegativen Bakteriums.

Da der verwendete ELISA das MOMP-Antigen erkennt, ist eine Kreuzreaktion aufgrund einer gleichzeitig stattfindenden Infektion mit einem gramnegativen Erreger als Erklärung für den Anstieg der Antikörper eher unwahrscheinlich.

Die Möglichkeit einer nosokomialen Infektion oder einer Reaktivierung lässt sich somit nicht ausschließen.

Die Ergebnisse für Patient 3 sprechen für eine ambulant erworbene Infektion mit *C. pneumoniae*, da eine frisch erworbene Infektion ohne positiven IgA-Nachweis wenig wahrscheinlich ist. Der initial am Tag der Aufnahme erfolgte Direktnachweis ist positiv. Weitere Direktnachweise sind nach zwei Wochen wiederholt positiv, ein Monat nach erster Untersuchung aber negativ. Eine mögliche Erklärung für diesen Verlauf ist, dass die Proben 1–4 zunächst positiv waren, das Verfahren dann an die Nachweisgrenze stieß (1 Erreger/ml) und im Folgenden schwach positiv und dann negativ war.

Bei Aufnahme von Patient 4 bestand ein bereits positiver IgA-Antikörpernachweis und schwach positiver IgG-Antikörpernachweis gegen *C. pneumoniae*, was dafür spricht, dass der Patient wahrscheinlich eine ambulant erworbene Infektion mit *C. pneumoniae* durchgemacht hat. Diese Annahme wird durch den positiven Direktnachweis fünf Tage nach Aufnahme bestärkt.

Patient 5 wurde wegen einer hochfieberhaften eitrigen Bronchopneumonie eine Woche nach Aufnahme auf eine periphere Station auf die Intensivstation bei respiratorischer Insuffizienz übernommen. Es konnte *S. pneumoniae* im Trachealsekret nachgewiesen werden, der Röntgen-Thorax zeigte das Bild einer lobär betonten Pneumonie.

IgA-Antikörper gegen *C. pneumoniae* waren nach Aufnahme auf die Intensivstation bereits hoch positiv, IgG-Antikörper waren niedrig positiv. Der Direktnachweis von *C. pneumoniae* war bei Aufnahme auf die Intensivstation und nach 2 Wochen positiv, ein weiterer Direktnachweis war nach 3 Wochen unter Therapie mit Erythromycin negativ. Der Verlauf spricht für eine ambulant erworbene Mischinfektion mit *C. pneumoniae* und *S. pneumoniae*. Die Arbeit von Kaupinnen (KAUPPINEN 1995) zeigt, dass solche Mischinfektionen nicht unwahrscheinlich sind. In dieser finnischen Arbeit wurde bei 125 hospitalisierten Patienten mittels mikrobieller Nachweise (Blutkulturen, Sputumkultur oder Serumproben) bei 88% ein Erreger nachgewiesen. Bei 21% der Fälle wurde *S. pneumoniae* und bei 19% *C. pneumoniae* nachgewiesen. Infektionen mit beiden Erregern waren bei 16% der Patienten nachweisbar.

Die diagnostischen Parameter legen für Patient 6 am ehesten eine ambulant erworbene Infektion mit *C. pneumoniae* nahe. IgA-Antikörper gegen *C. pneumoniae* waren bereits bei Aufnahme auf die ITS nachweisbar, IgG-Antikörper waren ebenfalls niedrig positiv und ein am Tag nach Aufnahme erfolgte Direktnachweis war positiv, der durch einen weiteren Direktnachweis drei Tage später bestätigt wurde. Die Infektion könnte in Zusammenhang mit der COPD des Patienten stehen, ein solcher Zusammenhang wird von mehreren Autoren beschrieben (HAHN 1991, BEATY 1991, EMRE 1995, HAHN 2000).

Der bereits bei Aufnahme positive IgA-Index bei grenzwertig positivem IgG-Index, sowie der DNA-Nachweis 4 Tage nach Aufnahme weist bei Patient 7 auf eine ambulant erworbene Infektion mit *C. pneumoniae* hin, da für diese Entwicklung der IgA-Antikörper der stationäre Aufenthalt zu kurz (< 2 Wochen) war.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei den prospektiv erfassten Patienten bis auf bei Patient 2 die klinischen Verläufe und die beurteilten Parameter nicht für eine durch *C. pneumoniae* verursachte nosokomiale Pneumonie sprachen.

Die Antikörpernachweise (positive Antikörpertiter bereits bei Aufnahme, Titerverlauf während des Krankenhausaufenthaltes) und der Zeitpunkt der Direktnachweise (positiver Direktnachweis am Tag oder wenige Tage nach Aufnahme in das Krankenhaus) sprechen gegen nosokomiale *C. pneumoniae*-Infektion, sondern eher für ambulant erworbene Infektionen mit dem Erreger. Bei Patient 2 ließ sich eine nosokomiale Pneumonie nicht ausschließen.

Anders als bei *S. pneumoniae*, *H. influenzae* oder *M. pneumoniae* hat die Infektion mit *C. pneumoniae* eine lange Inkubationszeit und persistiert im Körper, bevor die Infektion symptomatisch wird (MORDHORST 1994, KISHIMOTO 1994). Eine bereits ambulant erworbene Pneumonie mit *C. pneumoniae* könnte somit im Krankenhaus zum Ausbruch gekommen sein; auch bei Patienten deren Aufnahmegrund keine Pneumonie war.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein deutlicher Unterschied im Vergleich Seropositiver (n=62) und BAL-Proben mit positivem Antigennachweis (n=7) gezeigt.

Die Antikörperkinetik bei dieser Erkrankung scheint mit einer langen Persistenz der Antikörper sehr träge zu sein. Patnode et al. (PATNODE 1990) wiesen IgG-Antikörper noch 3 Jahre nach durchgemachter *C. pneumoniae*-Infektion nach. Die Halbwertszeit von IgG beträgt Wochen bis Monate. Dem gegenüber ist die Halbwertszeit von IgA mit 5–7 Tagen deutlich kürzer. Aus diesem Grund wurde in der Vergangenheit der Nachweis von hohen IgA-Titern als ein besseres Nachweisverfahren zur Diagnostik von chronisch *C. pneumoniae*-assoziierte Infektionen diskutiert. Bisher existiert aber kein validiertes serologisches Verfahren zum Nachweis persistierender oder chronischer *C. pneumoniae*-assoziiierter Infektionen (DOWELL 2001).

Der deutlich höhere Anteil „Seropositiver“ im Vergleich zu der niedrigen Anzahl von Patienten mit positivem BAL-Befund spricht für eine unzureichende Spezifität der in dieser Arbeit verwendeten ELISA. Im Falle des rELISA gibt es verschiedene Studien, die die Sensitivität und Spezifität des Tests unterschiedlich bewerten.

Von einer Arbeitsgruppe wurde der in der vorliegenden Arbeit verwendete rELISA als die sensitivste Methode zum Antikörpernachweis gegen *C. pneumoniae* im Vergleich mit einem MIF, der als Goldstandard in der *C. pneumoniae*-Diagnostik gilt, beschrieben (VERKOOYEN 1997, VERKOOYEN 1998). Verkooyen et al. (1997) zeigten anhand von 271 Serum-Patientenproben bei Patienten mit COPD sieben positive MIF-Befunde. Fünf dieser MIF-Befunde konnten durch den rELISA bestätigt werden, 11 weitere waren allein rELISA positiv und konnten mittels MIF nicht bestätigt werden. Persson et al. (PERSSON 2000) verglichen den rELISA mit einem MIF und erhielten vergleichbare Sensitivitäts und Spezifität (261 Serumproben, rELISA gegenüber MIF Sensitivität: 89%, Spezifität: 95%).

Im Gegensatz hierzu zeigten andere Autoren diskrepante Daten bezüglich der Sensitivität und Spezifität von ELISA-Verfahren zum Nachweis einer Infektion durch *C. pneumoniae* (GAYDOS 1994, KUTLIN 1997, SCHUMACHER 2001, HERMANN 2002).

Eine Hauptursache für die unterschiedliche Datenlage bezüglich der Spezifität des in dieser Arbeit verwendeten rELISA ist die Verwendung von rekombinantem LPS, da LPS ebenso bei anderen gramnegativen Bakterien nachweislich ist und somit zu Kreuzreaktionen führen kann. Ossewarde et al. (OSSEWARDE 2000) zeigten, dass zwei verschiedene ELISA (nach Entfernung des LPS vom chlamydialen Antigen des Serotests) im Vergleich mit einem MIF gut korrelierten. ELISA-Ergebnisse konnten von MIF in 11 von 12 Fällen bestätigt werden. Insgesamt wurden 14 gepaarte Serumproben getestet. Die Autoren bewerteten den von ihnen entwickelten ELISA als sensitive und spezifische Methode zum Nachweis von *C. pneumoniae* im Vergleich zum MIF. Eine Evaluation des Medac IgA- und IgG-rELISA wurde von Kutlin et al. (KUTLIN 1997) durchgeführt. Dabei wurden serologische (ELISA)-Ergebnisse von Probanden (95 Kinder und 62 Erwachsene) mit Zellkulturnachweisen von *C. pneumoniae* derselben Probanden verglichen. Die Sensitivität des IgA-ELISA gegenüber dem *C. pneumoniae* hochspezifischen Kulturnachweis bei den Kindern betrug 18,4%, die

Spezifität 91,2%, im IgG-Antikörpernachweis respektive 31,6% und 68,4%. Bei Erwachsenen betrug die Sensitivität von IgA-Antikörpernachweis im Vergleich mit dem Zellkulturnachweis 33,3%, von IgG 66,7%, die Spezifität von IgA-Antikörpernachweis 49,1%, von IgG-Antikörpernachweis 43,1%. Ausschlaggebend für die geringe Spezifität des Serotests gegenüber dem Zellkulturnachweis ist nach Meinung der Autoren die mangelnde Differenzierungsmöglichkeit des Serotests gegenüber anderen Chlamydienspezies, wie z. B. *C. trachomatis* und *C. psittaci*, der Serotest wurde folglich als genus- und nicht spezies-spezifisch eingestuft. Dies ist nach Meinung der Autoren vor allem durch die Kreuzreaktivität von LPS im ELISA-Verfahren bedingt. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten nur sieben von 62 Patienten mit positivem Antikörpernachweis durch den PCR-Direktnachweis bestätigt werden.

Dies könnte Ausdruck einer trägen Antikörperkinetik von *C. pneumoniae*-spezifischen IgA- und IgG-Antikörpern sein. Möglicherweise ist die hohe Anzahl an Seropositiven aber auch durch mangelnde Spezifität des Serotests bedingt.

Anknüpfend an diese kontroverse Beurteilung der Sensitivität und Spezifität des rELISA wurden zehn für *C. pneumoniae* spezies-spezifische Tests und der genus-spezifische rELISA (ELISA 1) miteinander verglichen (HERMAN 2002). Von den zehn spezies-spezifischen waren sieben unterschiedliche, kommerziell zu erwerbende Serologie-Testkits für den Nachweis von *C. pneumoniae*. Diese Kits unterschieden sich voneinander durch die Verwendung verschiedener Antigene. Untersucht wurden Serumproben 80 gesunder Freiwilliger mit einem Durchschnittsalter von 30 Jahren. Die ELISA wurden mit vier verschiedenen MIF verglichen, die untereinander ebenfalls verglichen wurden. Wegen der diskrepanten Ergebnisse im Vergleich der vier MIF wurde als interner Standard zur Bestätigung der ELISA eine Übereinstimmung von mindestens drei der verwendeten vier MIF gewertet. Die Übereinstimmung der ELISA mit dem internen Standard reichte von

78–99%, die Übereinstimmung der MIF untereinander reichte von 83–99%. Die Studie zeigte, dass nicht alle ELISA niedrige IgG-Titer erfassten und nicht spezifisch und sensitiv genug waren, um für die Diagnose einer Infektion mit *C. pneumoniae* herangezogen zu werden. Die Spezifität des rELISA gegenüber dem internen Standard lag nur bei 88%, die Sensitivität bei 42% (HERMAN 2002). Dagegen wiesen andere ELISA höhere Sensitivität und Spezifität als der rELISA auf. Die Autoren diskutieren die Möglichkeit, dass der rELISA falsch positiv aufgrund von Kreuzreaktivität von LPS mit anderen Chlamydien-Spezies oder durch Infektionen mit anderen gramnegativen Bakterien ausfallen könnte. Dies lässt sich in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht ausschließen, aber Hinweise dafür ließen sich nicht finden. Ebenso wird die Möglichkeit des falsch-positiven Ergebnisses, bedingt durch die Kreuzreaktivität mit Antikörpern gegen Parvovirus B19 oder *Mycoplasma pneumoniae*, diskutiert (HERMAN 2002). Die Kreuzreaktivität in der Diagnostik von Parvovirus und *M. pneumoniae* mit *C. pneumoniae* wurde zuvor von Persson gezeigt (PERSSON 2000). Die Kreuzreaktivität mit Parvovirus B19 konnte bei fehlendem Antikörpernachweis in der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Die Prävalenz spezifischer IgG- und IgM- Antikörper gegen B19 nimmt ähnlich wie bei *C. pneumoniae* ab dem Kindesalter deutlich zu, so dass es wahrscheinlich ist, dass die Patienten zu großen Teilen Antikörper gegen Parvovirus B19 nach durchgemachter Infektion aufwiesen. Die Patienten wiesen im untersuchten Zeitraum keine klinischen Zeichen einer akuten B19-Infektion auf. Laborchemisch serologische Hinweise (Antikörpernachweis) für eine gleichzeitige Infektion mit *M. pneumoniae* fanden sich nicht.

Der in dieser Arbeit verwendete ELISA 2 verwendet als Antigen MOMP. Es gibt Studien, die darauf hindeuten, dass ELISA-Verfahren, die MOMP nutzen, spezifischer in der Detektion einer *C. pneumoniae*-Infektion sind als ELISA-Verfahren, in denen LPS verwendet wird. Numazaki et al. (NUMAZAKI 1996) fanden eine bessere Korrelation im Vergleich zu den vorherigen Autoren von MOMP-ELISA mit MIF bei der

Untersuchung von 342 Serumproben von Kindern aus Japan. So wiesen 39,5% der Kinder einen positiven IgG-Antikörpernachweis im ELISA und 36,5% einen positiven MIF-Nachweis auf. IgA-Antikörpernachweis waren im ELISA bei 37,7% positiv und im MIF-Test bei 34,2% Kindern positiv.

Somit könnte in der Zukunft mittels molekularbiologischer Methoden, wie der PCR, ein schnellerer, sensitiverer und spezifischerer Nachweis von *C. pneumoniae* als mit den Methoden ELISA, MIF oder Kultur erfolgen. Noch unterscheiden sich verschiedene in-house-Verfahren aber hinsichtlich Sensitivität und Spezifität voneinander, so dass keine ausreichende Standardisierung für ein Verfahren vorhanden ist (DOWELL 2001).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu beantworten, ob die erhöhten Antikörpernachweise bei intubierten Patienten Ausdruck einer Reaktivierung von *C. pneumoniae* durch ein schweres Trauma waren oder ob es zu einer nosokomial erworbenen *C. pneumoniae*-Infektion gekommen war. Mit Ausnahme von Patient 2, bei dem eine nosokomiale Pneumonie nicht auszuschließen war, ließen sich keine Hinweise dafür finden, so dass die untersuchten Patienten mit positivem Antikörper- und positivem Direktnachweis wahrscheinlich eine ambulant erworbene *C. pneumoniae*-Infektion mit tragem Titerverlauf durchgemacht haben.

5 Anhang

Patienten aus dem retrospektiven Teil der vorliegenden Arbeit

Tabelle 12: Untersuchungsmerkmal: Azidose

	Azidose ja	Azidose nein	Gesamt
Positiver ELISA	6	9	15
negativer ELISA	8	4	12
Gesamt	14	13	27

p-Wert: 0,161

Tabelle 13: Untersuchungsmerkmal i.v.-Applikation von Antimykotika

	Antimykotika ja	Antimykotika nein	Gesamt
Positiver ELISA	7	8	15
negativer ELISA	7	5	12
Gesamt	14	13	27

p-Wert. 0,415

Tabelle 14: Untersuchungsmerkmal: erhöhte D-Dimere

Hier lagen nur von 22 Patienten Daten vor, bei fünf Patienten fand im Beobachtungszeitraum keine Bestimmung der D-Dimere statt.

	D-Dimere erhöht	D-Dimere erniedrigt	Gesamt
positiver ELISA	3	10	13
negativer ELISA	2	7	9
Gesamt	5	17	22

p-Wert: 0,684

Anhang

Tabelle 15: Untersuchungsmerkmal: i.v.-Applikation von FFP

	FFP ja	FFP nein	Gesamt
positiver ELISA	10	5	15
negativer ELISA	6	6	12
Gesamt	16	11	27

p-Wert: 0,315

Tabelle 16: Untersuchungsmerkmal: Hinweise auf gleichzeitige Infektion mit gramnegativen Bakterien

	Infektion gram-negativer Erreger ja	Infektion gram-negativer Erreger nein	Gesamt
positiver ELISA	10	5	15
negativer ELISA	6	6	12
Gesamt	16	11	27

p-Wert: 0,315

Tabelle 17: Untersuchungsmerkmal: Vorhandensein einer Hypoxie

	Hypoxie ja	Hypoxie nein	Gesamt
positiver ELISA	2	13	15
negativer ELISA	0	12	12
Gesamt	2	25	27

p-Wert: 0,299

Anhang

Tabelle 18: Untersuchungsmerkmal: i.v.-Applikation von intrazellulär wirksamen Antibiotika

	Intrazellulär wirksame Antibiotikatherapie ja	Intrazellulär wirksame Antibiotikatherapie nein	Gesamt
positiver ELISA	13	2	15
negativer ELISA	6	6	12
Gesamt	19	8	27

p-Wert: 0,049

Die beiden Patientengruppen unterscheiden sich signifikant hinsichtlich des Merkmals „intrazellulär wirksame Antibiotikatherapie“. Die antibiotische Therapie erfolgte jedoch in allen Fällen, bis auf eine Ausnahme blind, ohne vorherige Kenntnis der positiven Chlamydien-Serologie.

Tabelle 19: Untersuchungsmerkmal: Vorhandensein einer Leukozytose

	Leukozytose ja	Leukozytose nein	Gesamt
positiver ELISA	11	4	15
negativer ELISA	9	3	12
Gesamt	20	7	27

p-Wert: 0,636

Anhang

Tabelle 20: Untersuchungsmerkmal: erhöhte Transaminasen

	GOT/GPT ja	GOT/GPT nein	Gesamt
positiver ELISA	4	11	15
negativer ELISA	3	9	12
Gesamt	7	20	27

p-Wert: 0,636

Patienten mit positiver Chlamydienserologie aus dem prospektiven Teil der vorliegenden Arbeit

Tabelle 21: Zusammenfassung von Untersuchungsmerkmalen

Patient	Azidose	Anti-mykotika	D-Dimere	FFP	Gram	Hypoxämie negative	Antibiotika intrazellulär	Leukozytose	Trans-aminasen
1	+	+	n.d.	-	-	+	+	-	+
2	+	+	n.d.	+	+	+	+	+	+
3	+	-	+	-	-	+	+	+	+
4	+	-	n.d.	-	-	+	+	+	+
5	+	+	n.d.	-	-	+	+	+	+
6	+	-	n.d.	+	+	+	+	+	+
7	+	-	n.d.	-	-	+	+	+	+

+ = positiv, - = negativ, n.d.= nicht durchgeführt

6 Zusammenfassung

Ambulante und nosokomiale Pneumonien weisen eine hohe Inzidenz und Letalität auf. Klinisch unterscheidet man interstitielle und Lobärpneumonien. Ein wichtiger Erreger interstitieller Pneumonien ist *Chlamydophila pneumoniae*. Etwa 10% aller ambulant erworbenen Pneumonien werden durch ihn verursacht; er ist jedoch kein typischer Erreger nosokomialer Pneumonien. Daher waren hochpositive IgA- und IgG-Antikörpernachweise im ELISA gegenüber *C. pneumoniae* bei beatmeten Patienten einer Intensivstation auffällig. Diese Antikörperkonstellation könnte für eine Reinfektion oder auch ein erneutes Auftreten einer subklinischen, latenten Infektion mit diesem Erreger sprechen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob erhöhte Antikörpernachweise gegen *C. pneumoniae* bei hospitalisierten Patienten I) Ausdruck einer nosokomialen Infektion sind, ob sie II) einer Reaktivierung einer latenten Infektion durch das Beatmungstrauma und/oder einer schweren Grunderkrankung oder III) einer Titerpersistenz nach durchgemachter Erkrankung entsprechen, oder ob IV) unspezifische, falsch positive Antikörpernachweise zugrunde liegen.

Zunächst wurden in einer retrospektiven Fall-Kontrollstudie klinische Daten und ausgewählte Laborparameter einer Patientengruppe mit Antikörpernachweis (n = 15) einer Kontrollgruppe von Intensivpatienten ohne serologische Auffälligkeiten (n = 12) gegenübergestellt. Beide Patientengruppen unterschieden sich jedoch nicht hinsichtlich der gewählten Parameter.

Anschließend wurden prospektiv 92 Patienten auf Antikörper gegen *C. pneumoniae* sowie hinsichtlich eines Direktnachweises *C. pneumoniae*-spezifischer DNA mittels Nested PCR in durch bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Proben untersucht. Insgesamt waren die Proben von 30 Patienten (32,6%) sowohl hinsichtlich eines Antikörpernachweises als auch in der PCR negativ. 62 Patienten (67,4%) wiesen Antikörper gegen *C. pneumoniae* im ELISA auf, jedoch für nur sieben

dieser 62 Patienten (11,3%) ergab auch der Direktnachweis ein positives Ergebnis. Für diese sieben Patienten wurden daraufhin klinische, mikrobiologische und klinisch-chemische Laborparameter ausgewertet. Diese sprachen bei sechs Patienten gegen eine nosokomiale *C. pneumoniae*-Infektionen sondern für ambulant erworbene Infektionen mit Titerpersistenz. Auffällig war, dass in einem Fall eine nosokomiale Pneumonie nicht ausgeschlossen werden konnte. Hinweise für eine Reaktivierung des Erregers durch das Intubationstrauma oder eine schwere Erkrankung ließen sich nicht finden. Die Diskrepanz zwischen der relativ hohen Anzahl positiver Antikörpernachweise und einer deutlich niedrigeren Anzahl positiver Direktnachweise deutet auf eine unzureichende Spezifität des verwendeten ELISAs als serologischem Untersuchungsverfahren hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mikrobiologische Diagnostik von *C. pneumoniae* durch Antikörpernachweise mittels ELISA bei Patienten mit nosokomialer Pneumonie nur bedingt aussagekräftig ist. Der Einsatz molekularbiologischer Verfahren wie der in der vorliegenden Arbeit verwendeten PCR könnte hier deutliche Vorteile hinsichtlich der Spezifität und damit des positiven prädiktiven Wertes erbringen. Mittels dieser Verfahren wäre es auch möglich, an einem größeren Patientenkollektiv zu untersuchen, inwieweit nosokomiale *C. pneumoniae*-Infektionen vorkommen.

7 Literatur

ALDOUS M.B., WANG S.-P., FOY H.M.: Seroepidemiology of *C. pneumoniae* TWAR infection in Seattle families 1966-1979. *Journal of Infectious Diseases*, 166, 646-649 (1992)

AMERICAN THORACIC SOCIETY: Guidelines for the Management of Adults with Community-acquired Pneumonia. *American Journal of Critical Care Medicine*. 163: 1730-1754 (2001)

APFALTER P., BLASI F., BOMANN J., GAYDOS C., KUNDI M, MAASS M., MAKRISTHATHIHS A., MEIJER A., NADRCHAL R., PERSSON K., ROTTER M., TONG C.Y.W., STANEK G., HIRSCHL A.: Multicenter comparison trial of DNA extraction methods and PCR assays for detection of *C. pneumoniae* in endarterectomy specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 519-524 (2001)

AUGENBRAUN M., ROBLIN P., MANDEL L., HAMMERSCHLAG M.R., SCHACHTER J.: *C. pneumoniae* with pleural effusion, diagnosis by culture. *American Journal of Medicine*. 91: 437-438 (1991)

BARTLETT J.G., MUNDY L.M.: Community acquired pneumonia. *New England Journal of Medicine*. 333: 1618-1624 (1995)

BATES JH, CAMPBELL D, BARRON AL, McCRACKEN GA, MORGAN PN, MOSES EB, DAVIS CM: Microbial etiology of acute pneumonia in hospitalized patients. *Chest*. 101: 1005-1012 (1992),

BEATY C.D., GRAYSTON J.T., WANG S.P., KUO C.C., RETO C.S., MARTIN T.R.: *C. pneumoniae*, strain TWAR, infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Review of Respiratory Disease*. 144: 1408-1410 (1991)

Literaturverzeichnis

- BEN-YAAKOV M, ESHEL G, ZAKSONSKI L, LAZAROVICH Z, BOLDUR I: Prevalence of antibodies to *C. pneumoniae* in an Israeli population without evidence of respiratory infection. *Journal of Clinical Pathology*. 55: 355-358 (2002)
- BERDAL B.P., SCHEEL O., OGAARD A.R., HOEL T., GUTTEBERG T.J., ANESTAD G.: Spread of subclinical *C. pneumoniae* infection in a closed community. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 24: 431-436 (1992)
- BLASI F, BOSCHINI A, COSENTINI R, LEGNANI D, SMACCHIA D, GHIRA C, ALLEGA L: Outbreak of *C. pneumoniae* infection in former injection-drug-users. *Chest*. 105: 812-815 (1994)
- BLOCK S, HEDRICK J, HAMMERSCHLAG MR, CASSELL GH, CRAFT JC: *Mycoplasma pneumoniae* and *C. pneumoniae* in pediatric community-acquired pneumonia: comparative efficacy and safety of Clarithromycin vs. Erythromycin ethylsuccinate. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*. 14: 471-477 (1995)
- BLOCK S.L., HAMMERSCHLAG M.R., HEDRICK J., TYLER R., SMITH A., ROBLIN P.: *C. pneumoniae* in acute otitis media. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 16: 858-862 (1997)
- BRAUN J., TUSZEWSKI M., EGGENS U., MERTZ A., SCHAUER-PETROWSKAJA C., DÖRING E., LAITKO S., DISTLER A., SIEPER J., EHLERS S.: Nested polymerase chain strategy simultaneously targeting DNA sequences of multiple bacterial species in inflammatory joint diseases. *The Journal of Rheumatology*. 24: 1092-1100 (1997)
- CAMPBELL L.A., PEREZ M., HAMILTON D.J., KUO C.C., GRAYSTON J.T.: Detection of *C. pneumoniae* by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 434-439 (1992)

- CDC, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY. Pneumonia and influenza death rates- United States, 1979-1994. *Morbid. Mortal Weekly Rep.* 44: 535-537 (1995)
- COOK PJ, DAVIES P, TUNNICLIFFE W, AYRES JG, HONEYBOURNE D, WISE R: *C. pneumoniae* and asthma. *Thorax.* 53: 254-259 (1998)
- DALHOFF K, MAASS M: Clinical Characteristics and diagnostic value of polymerase chain reaction detection in BAL. *Chest.* 110: 351-356 (1996)
- DOWELL S.F., PEELING R.W., BOMAN J., CARLONE M., FIELDS B., GUARNER J., HAMMERSCHLAG M., JACKSON L., KUO C.-C., MAASS M., MESSMER T., TALKINGTON D., TONDELLA M., ZAKI S.: Standardizing *C. pneumoniae* assays: Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clinical Infectious Diseases.* 33: 492-503 (2001)
- EMRE U, SOKOLOVSKAYA N, ROBLIN PM, SCHACHTER J, HAMMERSCHLAG MR: Detection of anti *C. pneumoniae* IgE in children with reactive airway disease. *Journal of Infectious Diseases.* 172: 256-257 (1995)
- EKMAN M.R., GRAYSTON J.T., VISAKORPI R. KLEEMOLA M., KUO C.C. SAIKKU P.: An epidemic of infections due to *C. pneumoniae* in military conscripts. *Clinical Infectious Diseases.* 17: 420-425 (1993)
- EVERETT KDE, BUSCH RM, ANDERSEN AA.: Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. Nov. and Simkaniaceae fam. Nov., each containing one monotypic genus , revised taxonomy of the family Chlamyidiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the indentifications of organisms. *Int. Journal of Syst. Bacteriology.* 49: 415-440 (1999)

Literaturverzeichnis

- FILE T.M., PLOUFFE JR. J.F., BREIMAN R.F., SKELTON S.K.: Clinical characteristics of *C. pneumoniae* infection as the sole cause of community acquired pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*. 29: 426-428 (1999)
- FORSEY T., DAROUGAR S., TREHARNE J.D. : Prevalence in human beings of antibodies to *C. IOL-207*, an atypical strain of *Chlamydiaceae*. *Journal of Infection*. 12: 145-152 (1986)
- FREIDANK H., LOSCH P., VÖGELE H., WIEDMANN-AL-AHMAD M.: In vitro susceptibilities of *C. pneumoniae* isolates from German patients and synergistic activity of antibiotic combinations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 43: 1808-1810 (1999)
- GAYDOS C.A., FOWLER C.L., GILL V.J., EIDEN J.J., QUINN T.C.: Detection of *C. pneumoniae* by Polymerase Chain Reaction-Enzyme Immunoassay in an immunocompromised Population. *Clinical Infectious Diseases*. 17: 718-723 (1993)
- GAYDOS C.A., EIDEN J.J., OLDACH D., MUNDY L.M. AUWAERTER P., WARNER M.L. VANCE E., BURTON A.A., QUINN T.C.: Diagnosis of *C. pneumoniae* in patients with community-acquired pneumonia by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay. *Clinical Infectious diseases*. 19: 157-160 (1994)
- GAYDOS C.A., ROBLIN P.M., HAMMERSCHLAG M.R., HYMANN C.L., EIDEN J.L., SCHACHTER J., QUINN T.: Diagnostic Utility of pcr-enzyme immunoassay, culture, and serology for detection of *C. pneumoniae* in symptomatic and asymptomatic patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 32: 903-905 (1994)
- GIESECKE, J.: *Modern infectious Disease Epidemiology*. Edward Arnold, Hodder Headline Group, London, Boston, Melbourne, Auckland. 54-55. (1994)

Literaturverzeichnis

- GRAYSTON J.T., KUO CHOU-CHOU , WANG SAN-PING, ALTMANN JEFF: A new *C. psittaci* Strain, TWAR, Isolated in acute respiratory tract infections. *New England Journal of Medicine*. 315: 161-168 (1986)
- GRAYSTON J.T., WANG S.P., KUO C.C., CAMPBELL L.A.: *C. pneumoniae* sp nov for *C. strain TWAR*. *Int Journal of Bacteriology*. 39: 88-90 (1989)
- GRAYSTON J.T., DIWAN V.K., COONEY M., WANG S.P.: Community-and hospital aquired pneumonia associated with *C. TWAR* infection demonstrated serologically. *Archives of Internal Medicine*. 149: 169-173 (1989)
- GRAYSTON J.T, CAMPBELL L.A., KUO C.C.: A new respiratory tract pathogen: *C. pneumoniae* strain TWAR. *Journal of Infectious Diseases*. 161: 618-625 (1990)
- GRAYSTON J.T.: Infections caused by *C. pneumoniae* strain TWAR. *Journal of Clinical Infectious Diseases*. 15: 757-763 (1992)
- GRAYSTON J.T, ALDOUS M.B., EASTON A., WANG S.P., KUO C.C., CAMPBELL L.A., ALTMANN J.: Evidence that *C. pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. *Journal of Infectious Diseases*. 168: 1231-1235 (1993)
- HAHN D.L., PEELING R.W., DILLON E., McDONAL R., SAIKKU P.: Serologic markers for *C. pneumoniae* with asthma. *Annual Allergy Asthma and Immunology*. 84(2): 227-233 (2000)
- HAMMERSCHLAG M.R., CHIRGWIN K., ROBLIN P., GELLING M. DUMORNAY W., MANDEL L. SMITH P.: Persistent infection with *C. pneumoniae* following acute respiratory illness. *Clinical Infectious Diseases*. 14: 178-182 (1992)

- HAMMERSCHLAG M.R.: Activity of Gemifloxacin and other new quinolones against *C. pneumoniae*: a review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 45: 35-39 (2000)
- HERMANN C., GRAF K., GROH A., STRAUBE E., HARTUNG T.: Comparison of Eleven commercial tests for *C. pneumoniae*-specific immunoglobulin G in asymptomatic healthy individuals. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 1603-1609 (2002)
- HYMAN C.L., ROBLIN P.M., GAYDOS C.A., QUINN T.C., SCHACHTER J., HAMMERSCHLAG M.R.: prevalence of asymptomatic nasopharyngeal carriage of *C. pneumoniae* in subjectively healthy adults: assesment by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay and culture. *Clinical Infectious Diseases*. 20:1174-1178 (1995)
- ISHIDA T., HASHIMOTO T., ARITA M., ITO I., OSAWA M.: Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients. *Chest*. 114: 1588-1593 (1998)
- KAUPPINEN M., KUJALA P., LEINONEN M., SAIKKU P., HERVA E., SYRJÄLÄ H.: Clinical features of community-acquired *C. pneumoniae* pneumonia, 457-460 (1994)
- ORJILA G., BYRNE I., CHERNESKEY M.A. GRAYSTON J.T., JONES R.P. REDGWAY G.L., SAIKKU P., SCHACHTER J., STAMM W.E., STEPHENS R.S. (ED.): *C.I infections* -. Societa Editrice Esculapio, Bologna, Italy. (1994)
- KAUPPINEN M.T., SAIKKU P.: Pneumonia due to *C. pneumoniae*: prevalence, clinical features, diagnosis, and treatment. *Clinical Infectious Disease*. 21(3): 244-252 (1995)
- KAUPPINEN M.T., ELJA H., KUJALA P., LEINONEN M., SAIKKU P., SYRJÄLÄ H.: The etiology of community-acquired pneumonia among hospitalized patients during a *C. pneumoniae* epidemic in Finland. *Journal of Infectious Diseases*: 172: 1330-1335 (1995)

- KAUPPINEN M.T., SAIKKU P., KUJALA P., HERVA E., SYRJÄLÄ H.: Clinical picture of community-acquired *C. pneumoniae* requiring hospital treatment: a comparison between Chlamydia and pneumococcal pneumonia. *Thorax*. 51: 185-189 (1996)
- KAUPPINEN M.T., LÄHDE S., SYRJÄLÄ H.: Roentgenographic findings of pneumonia caused by *C. pneumoniae*. *Archives of Internal Medicine*. 156: 1851-1856 (1996)
- KISHIMOTO T. KIMURA M., KUBOTA Y., MIYASHITA N., NIKI Y., SOEJIMA R.: An outbreak of *C. pneumoniae* infection in households and schools, 465-468 (1994). Orjila G., Byrne I., Cherneskey M.A. Grayston J.T., Jones R.P. Redgway G.L., Saikku P., Schachter J., Stamm W.E., Stephens R.S. (ed.), *C.I infections*. Societa Editrice Esculapio, Bologna, Italy. (1994)
- KLEEMOLA M., SAIKKU P., VISAKORPI R., WANG S.-P., GRAYSTON J.T.: Epidemics of pneumonia caused by TWAR a new *C.* organism, in military trainees in Finland. *Journal of Infectious Diseases*. 157, 230-236 (1988)
- KUO C.C., GRAYSTON J.T.: In Vitro susceptibility of *C. sp.* Strain TWAR. *Antimicrobiologic Agents and Chemotherapy*. 32: 257-258 (1988)
- KUO C.C., GRAYSTON J.T.: A sensitive cell line, HL cells, for isolation and propagation of *C. pneumoniae* strain TWAR. *Journal of Infectious Diseases*. 162: 755-758 (1990)
- KUO C.C., JACKSON L., CAMPBELL L.A., GRAYSTON J. T.: *C. pneumoniae* (TWAR), *Clinical Microbiological Reviews*. 8(4): 451-461 (1995)
- KUO C.-C., JACKSON L., L: A., GRAYSTON J.T.: In vitro activities of azithromycin, clarithromycin, and other antibiotics against *C. pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40: 2669-2670 (1996)

- KUTLIN A., TSUMURA N., EMRE U., ROBLIN P.M., HAMMERSCHLAG M.: Evaluation of *C. pneumoniae* immunoglobulin M (IgM), IgG and IgA ELISAs Medac for diagnosis of *C. pneumoniae* infection. *Clinical Diagnosis Laboratory and Immunology*. 4: 3-6 (1997)
- LOPEZ A.D., MURRAY C.C.: The global burden of disease. *Nature Medicine*. 4: 1241-1243 (1998)
- MAASS M., DALHOFF K.: Comparison of sample preparation methods for detection of *C. pneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluid by pcr. *Journal of Clinical Microbiology*. 32: 2616-2619 (1994)
- MAASS M., DALHOFF K.: Isolierung von *C. pneumoniae* bei atypischer Pneumonie. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 119: 1462-1466 (1994)
- MAASS M., DALHOFF K.: Clinical characteristics and diagnostic value of polymerase chain reaction detection in BAL. *Chest*. 110: 351-356 (1996)
- MAHONY J.B., CHONG S., COOMBES B.K., SMIEJA M., PETRICH A.: Analytical Sensitivity, Reproducibility of Results, and Clinical Performance of five pcr assays for detecting *C. pneumoniae* DNA in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 2622-2627 (2000)
- MARRIE T.J., PEELING R.W., FINE M.J., SINGE D.E., COLEY C.M., KAPOOR W.N.: Ambulatory patients with community acquired pneumonia: the frequency of atypical agents and clinical course. *American Journal of Medicine*. 101: 508-515 (1996)
- MARRIE T.J., PEELING R.W., REID T., DE CAROLIS E.; Canadian community-acquired pneumonia investigators: *C. pneumoniae* species as a cause of community-acquired pneumonia in Canada. *European Respiratory Journal*. 21(5): 779-784 (2003)

- MARSTON B.J., PLOUFFE J.F., FILE T.M. JR.: Incidence of community acquired pneumonia requiring hospitalization: results of a population-based active surveillance study in Ohio. Community-based pneumonia incidence study group. Archives of Internal Medicine. 157: 1709-1718 (1997)
- MARTON A., KÁROLY A., SZALKA A.: Prevalence of *C. pneumoniae* antibodies in Hungary. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 11: 139-142 (1992)
- MAUCH H., WAGNER J., MARKLEIN G., KÜHNEN E., ALBERT S., SCHUSTER L., FREIDANK H., MOLITOR E., MÜLLER K.-D., KÄSTLI K., STETZELBERG H., HAMPL W., RATH P.-M., REINERT R.-R.: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch infektiologischen Diagnostik (MIQ). Urban und Fischer, 7: 21 (1999)
- MCCONNELL C.T., PLOUFFE J.F., FILE T., MUELLER C.F., WONG K.H., SKELTON S.K., MARSTON B.J., BREIMANN R.F.: Radiographic appearance of *C. pneumoniae* (TWAR-strain) respiratory infections. Radiology. 192: 819-824 (1994)
- MEDAC: Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Hamburg. Diagnostische Evaluation von *Chlamydia pneumoniae* – IgG und IgA – sELISA medac. 1998
- MIYASHITA N., YOSHIHITO N., NAKAJIMA M., FUKANO H., MATSUSHIMA T.: Prevalence of asymptomatic infection with *C. pneumoniae* in subjectively healthy adults. Chest. 119: 1416-1419 (2001)
- MIYASHITA N., FUKANO H., YOSHIDA K., YOSHIHITO N., MATSUSHIMA T.: *C. pneumoniae* infection in adult patients with persistent cough. Journal of Medical Microbiology. 52, 265-269 (2003)

- MONTES M., CILLA G.: High prevalence of *C. pneumoniae* infection in children and young adults in Spain. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*. 11: 972-973 (1992)
- MORDHORST C.H. ,WANG S.P., GRAYSTON J.T.: Transmission of *C. pneumoniae* (TWAR), 488-491 (1994). Orjila G., Byrne I., Cherneskey M.A. Grayston J.T., Jones R.P. Redgway G.L., Saikku P., Schachter J., Stamm W.E., Stephens R.S. (ed.), *C.I infections*. Societa Editrice Esculapio, Bologna, Italy. (1994)
- NUMAZAKI K., IKEBE T., CHIBA S.: Detection of serum antibodies of *C. pneumoniae* by ELISA. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 14: 179-183 (1996)
- OSSEWARDE J.M., TUUMINEN T., BOERSMA W.G., SANDSTRÖM M., PALOMÄKI P., BOMAN J.: A preliminary evaluation of a new enzyme immunoassay to detect *C. pneumoniae*-specific antibodies. *Journal of Microbiological Methods*. 43: 117-125 (2000)
- PATNODE D., WANG S.-P., GRAYSTON J.T.: Persistence of *C. pneumoniae*, strain TWAR micro-immunofluorescence antibody. 406-409 (1990).
- BOWIE W.R. CALDWELL H.D., JONES R.P. MARDH P.-A. RIDGWAY G.L. SCHACHTER J. STAMM W.E. MARD M.E. (ED.): *C.I infections*- Cambridge University Press. (1990)
- PEELING R.W., WANG S.P., GRAYSTON J.T., BLASI F., BOMAN J., CLAD A., FREIDANK H., GAYDOS C.A., GNARPE J., HAGIWARA T., JONES R.B., ORFILA J., PERSSON K., PUOLAKKAINEN M., SAIKKU P., SCHACHTER J.: Interlaboratory variation in immunofluorescence assay results. *Journal of Infectious Diseases*. 181(S): 426-429 (2000)

- PERSSON K. HAIDL S.: Evaluation of a commercial test for antibodies to the C.I lippolysaccharide (Medac) for serordiagnosis of actue infections by *C. pneumoniae* (TWAR) and *C. psitaci*. *APMIS*. 108: 131-138 (2000)
- PLOUFFE J.F., HERBERT M.T., FILE T.M., BAIRD I., PARSONS J.N., KAHN J.B., RIELLY-GAUVIN KT AND THE PNEUNOMIA STUDY GROUP: Ofloxacin versus standard therapy in treatment of community aquired pneumonia requiring hospitalization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40: 1175-1179 (1996)
- PLOUFFE J.F.: Importance of atypical pathogens of community-aquired pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*. 31(2): 35-39 (2000)
- PORATH A., SCHLAEFFER F., LIEBERMANN D.: The epiemiology of community aquired pneumonia among hospitalized adults. *Journal of Infectious Diseases*. 34: 41-48 (1997)
- RASSU M., CAZZAVILLAN S., SCAGNELLI M., PERON A., BEVILAQUA P.A., FACCO M., BERTOLONI G., LAURO F.M., ZAMBELLO R., BONOLDI E.: Demonstration of *C. pneumoniae* in artherosclerotic arteries from various vascular regions. *Artherosclerosis*. 158: 73-79 (2001)
- ROBLIN P.M., DUMORNAY W., HAMMERSCHLAG M.R.: Use of HEp-2 Cells for improved isolaton and passage of *C. pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 1968-1971 (1992)
- ROBLIN P.M., HAMMERSCHLAG M.: Microbiologic Efficacy of Azithromycin and Susceptibilities to Aztithromycin of Isolates of *C. pneumoniae* from Adults and children with community-aquired pneumonia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42: 194-196 (1998)
- ROBLIN P.M., REZNIK T., HAMMERSCHLAG M.R.: In vitro activity of Garenoxacin against recent clinical isolates of *C. pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 21, 578-580 (2003)

Literaturverzeichnis

- RUIZ-GONZALEZ A., FALGUERA M., NOGUES A., RUBIO-CABALLERO M: Is *Streptococcus pneumoniae* the leading cause of pneumonia of unknown etiology? A microbiologic study of lung aspirates in consecutive patients with community acquired pneumonia among hospitalized adults. *American Journal of Medicine*. 106:385-390 (1999)
- RUMBAK M.J., BASELSKI V., BELENCHIA J.M., GRIFFIN J.P.: Case Report: acute postoperative respiratory failure caused by *C. pneumoniae* and diagnosed by bronchoalveolar lavage. *American journal of science*. 305: 390-393 (1993)
- RUPP J. , SOLBACH , MAASS M.: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität zu Lübeck. *Der Mikrobiologe*. Review. (2003)
- SCHUMACHER A., LERKEROD A.B., SELFJEFLØT I., SOMMERVOLL L., HOLME I., OTTERSTAD J.E., ARNESEN H.: *C. pneumoniae* serology: importance of methodology in patients with coronary heart disease and healthy individuals. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 1859-1864 (2001)
- SMIEJA M., LEIGHT R., PETRICH A., CHONG S., KAMADA D., HARGREAVE F.E., GOLDSMITH C.H., CHERNESKY M., MAHONY J.B.: Smoking, season and detections of *C. pneumoniae* DNA in clinically stable COPD patients. *British Medical Journal of Infectious Diseases*. 2:12-19 (2002)
- STATISTISCHES BUNDESAMT: 10 häufigste Todesursachen insgesamt, 2001
Statistisches Bundesamt Deutschland (2003)
- STEINHOFF D., LODE H., RUCKDESCHEL G., HEIDRICH B., ROLFS A., FEHRENBACH F.J., MAUCH H., HOFFKEN G., WAGNER J.: *C. pneumoniae* as a cause of community acquired pneumonia in hospitalized patients in Berlin. *Clinical Infectious Diseases*. 22, 958-964 (1996)

Literaturverzeichnis

- STORGAARD M., OSTERGAARD L., JENSEN J.S., FARHOLT S., LARSEN K., OVESEN T., NODGAARD H., ANDERSEN P.L.: *C. pneumoniae* in children with otitis media. *Clinical Infectious Diseases*. 25:1090-1093 (1997)
- THOM D.H., WANG S.P., GRAYSTON J.T., KOU C.C., ALTMAN J.: *C. pneumoniae* stain TWAR, *Mycoplasma pneumoniae* and viral infections in acute respiratory disease in a university student health clinic population. *American Journal of Epidemiology*. 132: 248-256 (1990)
- THOM D.H., GRAYSTON J.T., CAMPBELL L.A., KUO C.C., DIWAN V.K., WANG S.P.: Respiratory infection with *C. pneumoniae* in middle-aged and older adult outpatients. *European Journal of Microbiology and Infectious Diseases*. 13:785-792 (1994)
- TONG C.Y., SILLIS M.: Detection of *C. pneumoniae* and *C. psittaci* in sputum samples by PCR. *Journal of Clinical Pathology*. 46: 313-317 (1993)
- VERKOOYEN R.P., HAZENBERG M.A., HAAREN G.H., VAN DEN BOSCH J.M., SNIJDER R.J., VAN HELDEN H.P., VERBRUGH H.A.: Age-Related interference with *C. pneumoniae* microimmunofluorescence serology due to circulating rheumatoid factor. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 1287-1290 (1992)
- VERKOOYEN R.P., VAN LENT N.A., MOUSAVI S.A., JOULANDEN R.J., SNIJDER J.M., VAN DEN BOSCH J.M., VAN HELDEN M.F., TEETERS M.F., VERBRUGH H.A.: Diagnosis of *C. pneumoniae* infection in patients with chronic obstructive pulmonary diseases by micro-immunofluorescence and ELISA. *Journal of Medical Microbiology*. 46: 959-964 (1997)
- VERKOOYEN R.P., WIEMSE D., HIEP-VAN CASTEREN S.C., JOULANDE S.A., SNIJDER R.J., VAN DEN BOSCH J.M., VAN HELDEN G.P., PEETERS M.F.,

VERBRUGH H.A.: Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of *C. pneumoniae* respiratory infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 2301-2307 (1998)

WANG S.P., GRAYSTON J.T.: Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. *American Journal of Ophthalmology*. 70: 367-374 (1970)

WANG S.-P., GRAYSTON J.T.: Microimmunofluorescence serological studies with the TWAR organism. 329-332 (1986). In Oriel D., Ridgway, Schachter J, Taylor-robinson D. Ward M., *C.I Infections Cambridge University Press, Cambridge*. (1986)

WANG S.-P., GRAYSTON J.T.: Population prevalence antibody to *C. pneumoniae*, strain TWAR, 402-405 (1990). In Bowie W.R. Caldwell H.D., Jones R.P. Mardh P.-A. Ridgway G.L. Schachter J. Stamm W.E. Mard M.E. (ed.) *C.I infections- Cambridge University Press*. (1990)

WELTE T., MARRE R., SUTTORP N.: CAPNETZ- Kompetenzwerk ambulant erworbene Pneumonie. *Struktur und Ziele. Pneumologie* 57; 34-41 (2003),

WELTE T., MARRE R., SUTTORP N.: Das Kompetenznetzwerk „Ambulant erworbene Pneumonie“ CAPNETZ, Ein erster Zwischenbericht. *Internist* 45: 393-401 (2004)

8 Lebenslauf

Der Lebenslauf kann aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht werden.

Danksagungen

Per aspera ad astra.

Jetzt, da sich dieser Lebensabschnitt „Dissertation“ seinem Höhepunkt zuwendet, möchte ich den vielen Unterstützern, Freunden und Mentoren danken, die dieses Werk möglich gemacht haben. Ich bin erstaunt und auch beglückt, dass es so viele waren.

Zunächst gilt mein Dank vor allem meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Ralf Ignatius, dessen starke Persönlichkeit maßgeblich dazu beitrug, die vorliegende Arbeit durchzuführen und dessen Menschlichkeit mich in den letzten Jahren stark geprägt hat.

In diesem Zusammenhang danke ich ebenfalls Frau Dr. Jutta Wagner, deren geistreiche Betreuung die vorliegende Arbeit sehr beeinflusst hat. Außerdem möchte ich Herrn PD Dr. Jan-Heiner Schäfer danken, der mich in kluger Art und Weise sowohl für die Innere Medizin als auch für die Innere Intensivmedizin begeisterte.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Straube für das Überlassen des *Chlamydophila pneumoniae*-Stammes.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Hahn, dass ich die Doktorarbeit an dem von ihm geführten Institut für Mikrobiologie und Hygiene durchführen durfte und Herrn Prof. Dr. Dr. U. B. Göbel für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Institut zu Ende führen zu können.

Ich danke auch Herrn Dr. Klaus Miksits für die Hilfestellung in der Zusammenstellung und Analyse der serologischen Daten.

Ich möchte mich bei dem gesamten Laborteam des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene (vor allem Pablo und Edith) für die freundschaftliche Zusammenarbeit und insbesondere bei Uschi Rüschenhof

bedanken, deren freundliches Wesen mir sehr geholfen hat, die PCR zu etablieren.

Danken möchte ich auch meiner Freundin Sissel Hartlieb für das fachkundige Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit und für die vielen „Teachings“, die ich mit ihr erleben durfte.

Ebenfalls danke ich Herrn Gerhard Dörries, der mit seiner unverwechselbaren Art humorvoll die formale Gestaltung dieser Arbeit unterstützt hat.

Vielen Dank auch an meine Schwiegereltern Sibylle und Günter Weidmann für die Liebe und Unterstützung, die sie uns in den letzten Jahren gaben.

Ich möchte mich sehr bei meinen Eltern Sonja und Hans-Jürgen Guggemos bedanken, ohne deren Liebe und Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht hätte angefangen und beendet werden können.

Mein großer Dank gilt meiner Familie, meinen wundervollen Kindern Luca und Finn, die in der arbeitsintensiven Zeit der letzten Jahre manches Mal auf ihren Vater verzichten mussten, aber vor allem meiner lieben Frau Katja, ohne deren kraftvolle Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können.