

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv (Ein- und Ausschlußkriterien)

Von allen Patienten, die vom 01. Dezember 1997 bis 30. November 1998 in das städtische Krankenhaus Reinickendorf, örtlicher Bereich Humboldt-Krankenhaus (seit dem 01.01.2002 Vivantes Humboldt-Krankenhaus), unter dem Verdacht einer instabilen Angina pectoris oder eines akuten Myokardinfarktes stationär aufgenommen wurden, wurden diejenigen in die prospektive Kohortenstudie eingeschlossen, die die nachfolgenden festgelegten Studienkriterien erfüllten.

Die instabile Angina pectoris wurde wie folgt definiert:

1. jede Erstangina oder
2. bekannte Angina pectoris mit zunehmenden Schmerzen und der Notwendigkeit der intravenösen Gabe von Nitroglycerin sowie Heparin.

Die Definition eines akuten Myokardinfarktes wurde durch das gleichzeitige Vorliegen von mindestens zwei der folgenden drei Kriterien festgelegt:

1. typische und neu aufgetretene pektanginöse Beschwerden von mindestens 30 Minuten Dauer oder
2. Erhöhung der Creatininphosphokinase (CK) auf mindestens den zweifachen Wert der oberen Normgrenze mit gleichzeitiger Erhöhung der CK-MB-Fraktion auf mindestens 7 % der Gesamt-CK oder
3. im Ruhe-EKG Veränderungen in Form von erstmalig aufgetretenen Schenkelblockbildern, Herzrhythmusstörungen, ST-Streckenhebungen oder Q-Zacken.

Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten mit:

1. einer Makrolid-Therapie oder
2. einer akuten Bronchitis/Pneumonie

innerhalb der letzten 6 Monate sowie

3. Patienten mit einem terminalen Tumorleiden.
-

2.2 StudENUMfang

Primär wurden 344 Patienten in die Studie aufgenommen. Bei vier Patienten, die unter Reanimationsbedingungen eingeschlossen wurden, lag keine Basislaboruntersuchung vor. Von zehn konnte keine serologische Untersuchung durchgeführt werden. Sechs wurden aufgrund der Nichtbeachtung der festgelegten Ausschlußkriterien nicht erfaßt. In die endgültige Auswertung flossen die Daten von 324 Patienten ein.

2.3 Bei Aufnahme und im Verlauf erfaßte Daten

Die Patienten wurden schriftlich und mündlich über die Studie aufgeklärt und nach Einwilligung in sie aufgenommen (Einverständniserklärung in Anhang B.1 auf Seite 77). Von jedem Patienten wurden Daten sowohl aus den alten Akten als auch die neuesten Ergebnisse aus dem aktuellen Krankenaufenthaltes dokumentiert. Im einzelnen:

1. Alter
2. Geschlecht
3. Risikofaktoren (arterieller Hypertonus, aktueller bzw. früherer Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie)
4. kardiovaskuläre Altanamnese (PTCA/Stent, CABG, Vorderwandinfarkt)
5. Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) mittels Echokardiografie oder Ventrikulografie
6. Labor (CRP, Fibrinogen, Gesamtcholesterin).

Über einen Zeitraum von einem Jahr wurde mittels Telefoninterviews mit allen 324 Studienpatienten in Abständen von jeweils einem, drei, sechs und zwölf Monaten Kontakt gehalten. Falls der Patient selbst nicht erreicht wurde, wurden die Daten durch Befragung der Angehörigen oder des Hausarztes erhoben. Patienten, von denen oder über die auf diese Weise keine Auskünfte zu erhalten waren, wurden angeschrieben und gegebenenfalls Auskünfte aus dem Melderegister geholt (Patientenbogen in Anhang B.2 auf Seite 78). Im Mittelpunkt standen Fragen nach:

1. einem stationären Krankenhausaufenthalt aufgrund einer instabilen Angina pectoris
-

2. einem akuten Myokardinfarkt
3. einer koronaren Revaskulationsmaßnahme (PTCA/Stent oder CABG)
4. der laufenden Medikation (kardiovaskuläre Medikamente: ACE-Hemmer, Aspirin, Marcumar, Betablocker oder Cholesterinsenker)
5. dem Raucherstatus
6. einem Tod infolge einer koronaren oder anderen Genese.

2.4 Studienendpunkte

Als primärer Endpunkt wurde in der Studie der Tod jeder Genese oder kardialer Ursache sowie der akute Myokardinfarkt definiert. Wurde mehr als ein primärer Endpunkt erreicht, so wurde der gravierendere in die weitere statistische Aufbereitung übernommen. Als kombinierter Endpunkt wurde der kardiale Tod und der akute Myokardinfarkt definiert.

2.5 Serologische Methoden

2.5.1 Serumgewinnung und Serumlagerung

Die Blutproben für die serologische Untersuchung wurden dem Patienten entweder bereits im Rettungswagen oder unmittelbar nach dem Eintreffen im städtischen Krankenhaus Reinickendorf, örtlicher Bereich Humboldt-Krankenhaus, in der Notfallversorgung bzw. auf der Station mit einer separaten Serummonovette (Kanülen, Monovetten der Firma Sarstedt) abgenommen. Die Proben wurden direkt in das Zentrallabor des Krankenhauses gegeben, wo die Bestimmung der einzelnen Parameter von medizinisch technischen Assistenten/Innen durchgeführt wurde. Ein Teil des dabei gewonnenen Serum wurde bis zur Untersuchung und für die anschließende Asservierung bei -20°C im Institut für Infektionsmedizin Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie der Freien Universität Berlin (Leiter: Prof. Dr. med. H. Hahn) gelagert.

2.5.2 Antikörpernachweisverfahren

2.5.2.1 Nachweis Chlamydien-spezifischer Antikörper; IgA-/IgG-rELISA

Chlamydien-spezifische IgA- und IgG-Antikörper wurden mittels rELISA (rekombinantem ELISA) quantifiziert. Bei dem Test der Firma Medac Labor, Hamburg, Deutschland handelte es sich um einen ELISA auf der Basis eines Chlamydien-spezifischen, rekombinanten LPS-Fragmentes.

Durchführung des rELISA

Zunächst wurde ein Teil Waschpuffer mit neun Teilen Aqua ad iniectabilia angesetzt und die Patientenseren mit dem Probenverdünnungspuffer (IgA 1 : 100, IgG 1 : 50) verdünnt. Zur Ermittlung des Leerwertes diente 50 µl Probenverdünnungspuffer in der Vertiefung A 1. Die Negativkontrolle erfolgte in Doppelbestimmung mit jeweils 50 µl der mitgelieferten Negativkontrolle. Die Positivkontrolle erfolgte wie die Patientenproben in Einfachbestimmung (50 µl). Die Mikrotitervertiefungen wurden 60 Minuten (± 2 Minuten) bei 37° C ($\pm 1^\circ$ C) inkubiert und anschließend insgesamt dreimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer gewaschen. Nach Beendigung der Waschvorgänge wurden die Mikrotitervertiefungen auf Filterpapier ausgeklopft. 50 µl Konjugat wurde in alle Vertiefungen pipettiert und im Anschluß 60 Minuten (± 2 Minuten) bei 37° C ($\pm 1^\circ$ C) erneut inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Mikrotitervertiefungen gewaschen (200 µl Waschpuffer). Die im Serum vorhandenen Chlamydien-spezifischen Antikörper wurden durch Hinzugabe von Peroxidase-gekoppeltem Anti-Human-IgA/IgG-Antikörper und anschließender Zugabe von 50 µl TMB-Substrat nachgewiesen. Nach 30-minütiger (± 2 Minuten bei 37° C [$\pm 1^\circ$ C]) Inkubation bildete sich ein wasserlöslicher Farbkomplex, dessen Absorption nach Abstoppen der Reaktion mit 100 µl Stopplösung photometrisch bei 450 nm bestimmt wurde (Referenzfilter 620 - 630 nm).

Der Test war auswertbar, wenn der Mittelwert der Negativkontrolle kleiner als die optische Dichte (OD) 0,200 und der der Positivkontrolle größer als OD 0,800 war. Der Cut-off-Wert

berechnete sich aus den Mittelwerten der beiden Negativkontrollen + 0,320 (s. Angaben des Herstellers auf der Basis statistischer Auswertungen). Als Grenzbereich galt der Cut-off-Wert $\pm 10\%$. Die Ergebnisse wurden als Index ($\text{Meßwert}_{\text{Patient}} : \text{Cut-off-Wert}$) angegeben.

Da es sich bei der Verwendung von Chlamydien-LPS um eine gattungsspezifische Reaktion handelt, erlaubt das Testergebnis keine Aussage darüber, welche Chlamydienart (*C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. trachomatis*) Ursache der Antikörperbildung war.

2.5.2.2 Nachweis Chlamydia trachomatis-spezifischer Antikörper; IgA-ELISA

Chlamydien besitzen immundominante gattungsspezifische Antigenstrukturen. Die immundominanten, artspezifischen Epitope für *Chlamydia trachomatis* liegen auf den variablen Domänen des Hauptmembranproteins (MOMP).

Der *Chlamydia trachomatis*-pELISA medac-Test, Hamburg, Deutschland, verwendet ein synthetisches Peptid-Antigen aus der immundominanten Region des MOMP. Mit diesem hochspezifischen Antigen ist eine Abgrenzung von Antikörpern gegen *Chlamydia trachomatis* aus dem Gesamtpool antichlamydialer Antikörper mit hoher Spezifität gegeben.

Durchführung des C. trachomatis-pELISA

Die Seren wurden 1 : 50 verdünnt angesetzt. Zur Ermittlung des Leerwertes diente 50 μl Probenverdünnungspuffer in der Vertiefung A 1. Die Negativkontrolle erfolgte in Doppelbestimmung mit jeweils 50 μl der mitgelieferten Negativkontrolle. Die Positivkontrolle erfolgte wie die Patientenproben in Einfachbestimmung (50 μl). Die Mikrotitervertiefungen wurden 60 Minuten (± 2 Minuten) bei 37° C ($\pm 1^\circ$ C) inkubiert und anschließend insgesamt dreimal mit jeweils 200 μl Waschpuffer gewaschen und auf Filterpapier ausgeklopft. Durch Hinzugabe von 50 μl anti-IgA-Konjugat (1 : 300) in alle Vertiefungen und anschließender 60-minütiger (± 2 Minuten bei 37° C [$\pm 1^\circ$ C]) Inkubation wurden die gebundenen *C. trachomatis*-spezifischen IgA-Antikörper nachgewiesen. Die enzymatische Reaktion führte nach Zugabe von

50 µl Substrat (30 Minuten (\pm 2 Minuten) bei 37° C [\pm 1° C]) und 100 µl Stopplösung zu einem farbigen Endprodukt.

Die Farbintensität war direkt proportional zu der Konzentration von Chlamydia trachomatis-spezifischen IgA Antikörpern im Serum und wurde mit einem Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 620 - 650 nm und Reffilter 620 nm) gemessen. Bei einem Reagenzien-leerwert $< 0,100$; einer Negativkontrolle $< 0,100$ und einer Positivkontrolle von $> 0,800$ war der Test auswertbar. Ein positiver IgA-Befund war bei > 2 und ein negativer Befund bei ≤ 2 gegeben.

2.5.2.3 Nachweis Chlamydia pneumoniae-spezifischer Antikörper; Westernblot

Als unabhängiges Testverfahren zum Nachweis C. pneumoniae-spezifischer Antikörper wurde das Immunblotting (Western Blot) gewählt.

Zur Anwendung kam der Test der Firma AID System, Straßberg, Deutschland (Antigenextrakte von Chlamydia pneumoniae wurden elektrophoretisch in der SDS-PAGE entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und mittels Elektrophorese auf Nitrocellulose-Membranen transferiert.).

Durchführung des Westernblots

Zu Beginn des serologischen Nachweisverfahren erfolgte die Rekonstitution des Serumverdünnungs-/Waschpuffers (SVW-Puffer) durch Hinzugabe von 20 ml Konzentrat zu 180 ml destilliertem Wasser. Pro Streifen wurde 10 µl Konjugat (IgA oder IgG) mit 1 ml SVW-Puffer verdünnt.

Anschließend wurde die passende Anzahl von Teststreifen in die Kavitäten der Inkubationswanne gelegt, mit 2 ml Blocking-Puffer rehydriert, 15 Minuten inkubiert und nach dem Abgießen des Blockingpuffers mit 1 ml vorverdünnten Patientenproben (1 : 51 mit SVW-

Puffer) überschichtet. Die Inkubationsdauer betrug 40 Minuten. Nach Ende der Inkubation wurden die Streifen dreimal 3 Minuten gewaschen (jeweils 1 ml SVW-Puffer). Anschließend wurde 1 ml vorbereitetes Konjugat (je nach Bedarf IgA oder IgG) in jede Kavität pipettiert, 30 Minuten unter Schütteln inkubiert und abgegossen. Nach viermaligen Waschen (jeweils 2 ml SVW-Puffer für je 2 bis 3 Minuten) wurden die Streifen nochmals mit 2 ml destilliertem Wasser gewaschen. Im Anschluß daran wurde 1 ml Enzymsubstrat (BCIP) in die Kavitäten pipettiert und 10 - 15 Minuten unter Schütteln inkubiert. Das im „Sandwich“-Komplex gebundene Enzym hydrolysierte das Substrat zum blauen Endprodukt bis zur Zugabe von 1 ml Stopplösung in jede Kavität. Jetzt erschienen die Proteinbanden als blaugefärbte Linien. Nach 2-stündigem Trocknen erfolgte die densitometrische Analyse des Bandenmusters mit dem AID-SCAN-System (Abbildung 1).

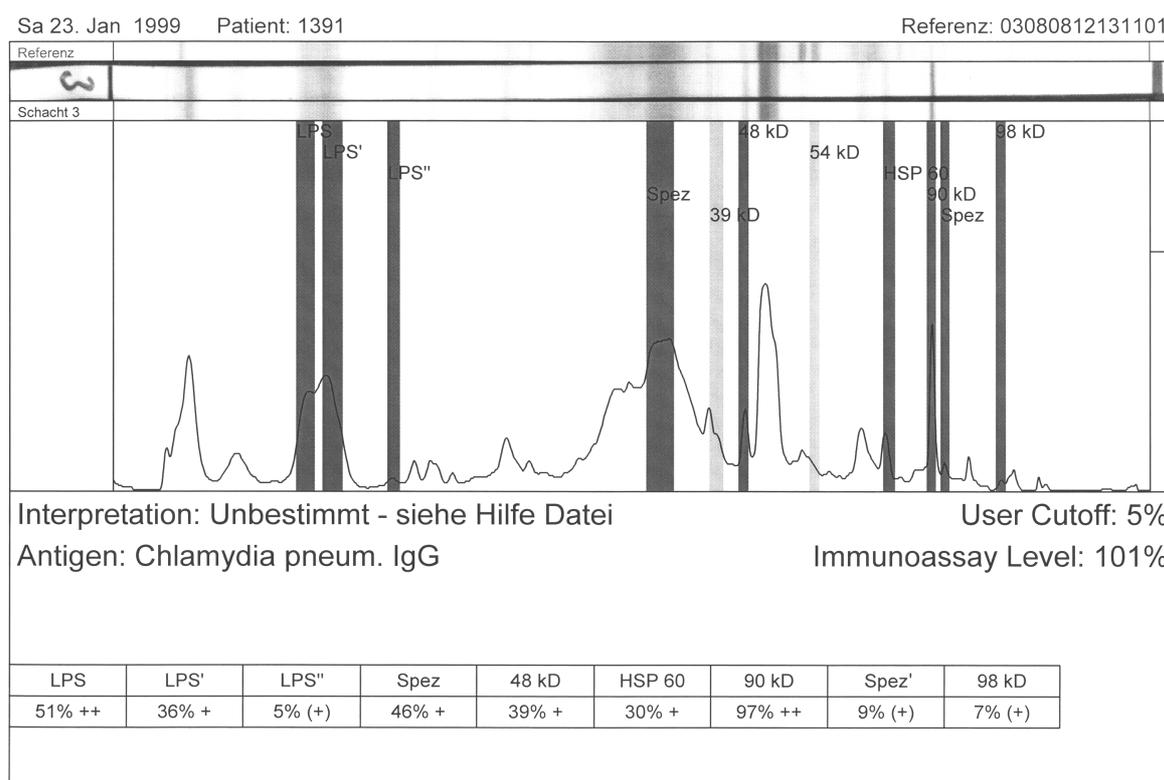


Abb. 1: Beispiel einer densitometrischen Auswertung des Westernblots unter Bezug auf einen Referenzstreifen

Das SCAN-System orientierte sich an einem chargenspezifischen Referenz-Streifen, der elektronisch gespeichert wurde. Nach dem Scannen der Patientenstreifen verglich das Programm das Bandenmuster mit dem des Referenzstreifens. Bei Übereinstimmung wurden die positive Banden als solche identifiziert.

2.6 Statistik

Die erhobenen Daten wurden in einer Excel-Tabelle (Microsoft Version 7.0) gesammelt. Die anschließende statistische Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit der Wegscheider Biometrie und Statistik GmbH.

Die Auswertung erfolgte mittels Häufigkeitsverteilungen, Überlebenskurve (Kaplan-Meier-Methode; kumulatives Überleben unter Berücksichtigung von Zensierungen, die als unabhängig vom Zielergebnis unterstellt werden) und mit Hilfe von Gleitenden Mittelwerten (Moving-average-Analyse, als Glättungsmethode zur Cutoff-Bestimmung eingesetzt). Konfirmatorisch wurden Cox-Regressionsmodelle (Cox proportional hazard models uni- bzw. multivariat) verwendet. Die berichteten Relativen Risiken sind Schätzungen aus dem Cox-Modell ("Hazard Ratios"). P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant bezeichnet.
