

„Prävalenz von IgG-Antikörpern gegen Simkania negevensis
bei Personen mit
ambulant erworbener Pneumonie und atypischer Pneumonie“

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

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

von Dirk Schilder

geboren am 15.05.1984 in Greiz

November 2010

Gutachter:

- 1.** Prof. Dr. med. Eberhard Straube, Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie FSU Jena
- 2.** Prof. Dr. med. James Friderich Beck, Direktor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin FSU Jena
- 3.** Prof. Dr. med. Enno Jacobs, Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene TU Dresden

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.07.2011

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AECOPD	Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease
AG	Antigen
ATP	Adenosintriphosphat
A. polyphaga	Acanthamoeba polyphaga
Aqua dest	Aqua destillata
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BGM	Buffalo-Green-Monkey
bzw	beziehungsweise
CAP	Community Aquired Pneumonia
CAPNETZ	Kompetenznetz für CAP in Deutschland
cm	Zentimeter
CMV	Cyto-Megaly-Virus
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
C. pneumoniae	Chlamydophila pneumoniae
C. psittaci	Chlamydophila psittaci
CRP	C-reaktives Protein
C. trachomatis	Chlamydia trachomatis
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic-Acid
DSV	Dottersackverdünnung
EB	Elementary-Body
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
Fa	Firma
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HctA	Histon-Cluster-Type-A
HctB	Histon-Cluster-Type-B
HeLa	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms nach dem Pseudonym HelenLane
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HL	Hodgkin Lymphom
HNO	Hals-Nasen-Ohren
Hsp	Heat-Shock-Protein
IFA	Immunofluorescence-Assay
IFT	indirekter Fluoreszenz Test
IFU	Inclusion-Forming-Units – beschreibt die Anzahl von Einschlüsse bildenden Einheiten
IgA	Immunglobulin der Klasse A
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm

l	Liter
Mbp	Megabasenpaar
MEP	Non-Mevalonate-Pathway
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MIF	Microimmunofluorescence-Test
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MOMP	Major-Outer-Membrane-Protein
mRNA	messenger Ribonucleic-Acid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
Omc	Outer-Membran-Complex
OmcA	Outer-Membran-Complex-Type-A
OmcB	Outer-Membran-Complex-Type-B
OmpA	Outer-Membran-Protein-A
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
ph	Potentia hydrogenium
PI	Post infectionem
Pmp	Polymorphic-Membrane-Protein
py	Pack-Year
RB	Reticulate-Body
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RPMI	am Roswell Park Memorial Institute entwickeltes Laborkulturmedium
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RSV	Respiratory-Syncytial-Virus
s	Sekunde
S	Svedberg, Einheitenzeichen des Sedimentationskoeffizient
<i>S. negevensis</i>	<i>Simkania negevensis</i>
spp	Mehrzahl von Species
Tarp	Translocated-Actin-Recuiting-Phosphoprotein
TTSS	Type-III-Secretion-System
U	Umdrehungen
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	v
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Vorwort.....	3
1.2 Zielstellung.....	4
2 Grundlagen.....	5
2.1 Chlamydien.....	5
2.1.1 Einführung.....	5
2.1.2 Taxonomie.....	5
2.1.3 Lebenszyklus.....	7
2.1.4 serologische Nachweismethoden.....	10
2.1.4.1 Complement Fixations Test.....	10
2.1.4.2 MIF (MicroImmunoFluorescence test).....	11
2.1.4.3 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	12
2.2 Simkania negevensis.....	14
2.2.1 Taxonomie.....	14
2.2.2 Entdeckung.....	14
2.2.3 Genom.....	14
2.2.4 Morphologie und Wachstumscharakteristika.....	15
2.2.5 Membranstruktur und Antigene.....	16
2.2.6 Infektionsmodelle.....	16
2.2.7 Behandlungsmöglichkeiten.....	17
2.2.8 Nachweise	18
2.2.8.1 Nachweise in Asien	18
2.2.8.2 Nachweise in Nordamerika.....	20
2.2.8.3 Nachweise in Südamerika.....	21
2.2.8.4 Nachweise in Europa.....	21
2.2.8.4.1 Nachweise in Deutschland.....	22
3 Methodik.....	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Patientenproben.....	23
3.1.1.1 CAPNETZ-Proben.....	23
3.1.1.2 Proben des Universitätsklinikums Jena.....	24
3.1.2 Chemikalien.....	25
3.1.3 Geräte.....	25
3.1.4 Computerprogramme.....	26
3.2 Methoden.....	27
3.2.1 Antigengewinnung.....	27
3.2.1.1 Zellkultur.....	27
3.2.1.2 Antigenaufbereitung.....	28

3.2.2	Herstellung der Objektträger.....	31
3.2.3	Optimierung der Objektträger.....	32
3.2.4	IFT.....	33
3.2.4.1	Probenvorbereitung.....	33
3.2.4.2	Inkubation.....	34
3.2.4.3	Mikroskopie.....	34
3.2.4.3.1	Beurteilungskriterien.....	35
3.2.4.3.2	Positivkontrollen.....	35
3.2.4.3.3	Festlegung Cut-off-Wert.....	36
3.2.5	Datenverarbeitung.....	36
4	Ergebnisse.....	37
4.1	Validierung der Methoden.....	37
4.1.1	Zellkultur und Antigenpräparation.....	37
4.1.2	IFT.....	37
4.1.2.1	Optimierung der Objektträger	37
4.1.2.2	Optimierung der Fluoreszenzeigenschaften	38
4.1.2.3	Beurteilungskriterien.....	38
4.1.2.4	Positivkontrollen.....	39
4.2	Simkania negevensis in klinischen Materialien.....	40
4.2.1	Untersuchung der CAPNETZ-Proben.....	40
4.2.1.1	Proben aus Berlin.....	42
4.2.1.2	Proben aus Bochum.....	42
4.2.1.3	Proben aus Köln/Köln-Bonn.....	43
4.2.1.4	Proben aus Lübeck.....	43
4.2.1.5	Proben aus Lüdenscheid.....	44
4.2.1.6	Proben aus Magdeburg.....	44
4.2.1.7	Proben aus Rotenburg.....	45
4.2.1.8	Proben aus Ulm.....	45
4.2.1.9	Proben aus Würzburg.....	46
4.2.1.10	Zusammenfassung Verteilung nach Städten.....	47
4.2.1.11	Einzelfallbetrachtung.....	48
4.2.1.11.1	Berlin.....	48
4.2.1.11.2	Bochum.....	49
4.2.1.11.3	Magdeburg.....	51
4.2.1.11.4	Ulm.....	53
4.2.1.11.5	Zusammenfassung Einzelfallbetrachtung.....	54
4.2.2	Untersuchung der Proben des Universitätsklinikums Jena.....	56
5	Diskussion.....	57
5.1	IFT.....	57
5.1.1	Testverfahren.....	57
5.1.2	Cut-off Wert.....	59
5.1.3	Unspezifische Fluoreszenz.....	59
5.1.4	Proben.....	60
5.2	Ergebnisse.....	60
5.2.1	CAPNETZ-Proben.....	60

5.2.1.1	Korrelation PCR und IFT.....	61
5.2.1.2	Einzelfallbetrachtung.....	62
5.2.2	Proben Universitätsklinikum Jena.....	62
5.3	Pathogene Bedeutung von Simkania negevensis.....	63
6	Schlussfolgerungen.....	65
7	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	67
8	Anhang.....	79
8.1	Lebenslauf.....	79
8.2	Danksagung.....	80
8.3	Ehrenwörtliche Erklärung.....	81

Zusammenfassung

Simkania negevensis, ein 1993 durch die Forschungsgruppe um Simone Kahane neu entdecktes chlamydienähnliches Bakterium, steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Schon kurz nach seiner Entdeckung wurde es von Liebermann 1997 erstmals mit ambulant erworbenen Pneumonien bei Erwachsenen in Verbindung gebracht. 37% der Untersuchten zeigten IgG-Antikörper gegen *S. negevensis* und in 2,6% gab es Hinweise auf eine akute Infektion. Seitdem wurde *S. negevensis* mit Bronchiolitis, AECOPD, Asthma und akuten Abstoßungsreaktionen bei Lungentransplantierten in Verbindung gebracht. Ein Zusammenhang von *S. negevensis* und ambulant erworbenen Pneumonien bei Kindern scheint besonders wahrscheinlich. Keine der bisher durchgeführten Studien kann jedoch einen pathogenen Einfluss statistisch signifikant belegen. Sicher ist, dass *S. negevensis* menschliche Zellkulturen, insbesondere Epithelzellen des Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes, des Genitaltraktes und Endothelzellen vaskulären Ursprungs, infizieren und sich in ihnen vermehren kann. Das legt einen Humanpathogenität sehr nahe.

Bisher konnte *S. negevensis* in weiten Teilen der Welt, unter anderem Israel, Brasilien, Dänemark, Kanada, Japan, England, Finnland und Italien, nachgewiesen werden. Die Seroprävalenzen von IgG-Antikörpern schwanken dabei von 4,3% (Japan) bis 80% (Beduinen in Israel). 2004 konnte Tischer das Bakterium erstmals auch in Deutschland im Respirationstrakt von Kindern nachweisen. Dafür nutzte er eine PCR-Technik. Ein serologisches Nachweisverfahren war bisher in Deutschland nicht vorhanden.

Ziel dieser Arbeit war es, ein serologisches Nachweisverfahren für *Simkania negevensis* auch an einem deutschen Labor zu etablieren. Zusätzlich sollten erste serologische Daten bei Erwachsenen, die an radiologisch gesicherter CAP sowie an im Krankenhaus erworbenen Pneumonien und atypischen Penumonien erkrankt waren, gesammelt werden.

Yamaguchi et al. konnten 2005 erstmals mittels Mikroimmunfluoreszenz Antikörper gegen *S. negevensis* nachweisen.

Dieses ursprünglich von 1970 durch Wang und Grayston entwickelte Verfahren zum Antikörpernachweis (heutzutage vor allem für *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* und *C. psittaci* genutzt) wurde in dieser Arbeit für *Simkania negevensis* eingerichtet und optimiert.

Nur in sieben von 401 Proben von an CAP erkrankten Patienten ließen sich Antikörper nachweisen. Mit 1,75% liegt die Seroprävalenz damit von allen bisher durchgeführten Studien am niedrigsten. Eine Übereinstimmung mit den vorliegenden PCR-Ergebnissen konnte nicht

beobachtet werden. Auch bei Patienten mit positiver *C. pneumoniae*-PCR waren kaum Antikörper gefunden worden, die auf eine akute Infektion mit diesem Erreger hinweisen. Nur eine der auf positiv auf *Simkania negevensis* untersuchten Proben wies auch eine positive PCR auf.

Eine regionale Häufung von positiven Seren konnte für Berlin, Bochum, Ulm und Magdeburg aufgezeigt werden.

Ein Zusammenhang zwischen der CAP und *S. negevensis* ist aufgrund zu niedriger Titer von maximal 1:32 nicht sicher herstellbar. In vier von sieben positiven Proben war jedoch außer *S. negevensis* kein pathogenes Agens nachweisbar.

In den 337 Seren der Probengruppe des Universitätsklinikums Jena mit im Krankenhaus erworbenen Pneumonien und atypischen Pneumonien konnten keine IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Ein Einfluss von *S. negevensis* auf im Krankenhaus erworbene Pneumonien und atypische Pneumonien ist für den untersuchten Zeitraum sehr unwahrscheinlich.

Eine Ursache für die geringe Anzahl an positiven Proben könnte die geringe Sensitivität des IFT sein. Ein zu früher Abnahmezeitpunkt des Serums und damit noch fehlende Bildung von Antikörpern beim Patienten ist ebenfalls zu diskutieren.

Mit dieser Arbeit konnte das Vorkommen von *Simkania negevensis* in Deutschland serologisch bestätigt werden. Um die Ergebnisse besser einordnen zu können, sind weitere serologische Untersuchungen an Gesunden notwendig. Eine Methode zur serologischen Aufarbeitung steht nun zur Verfügung.

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Weltweit sind ambulant erworbene Pneumonien (CAP =community-acquired pneumonia) eine wichtige Ursache für Morbidität und Mortalität (Welte und Köhnlein 2009). Infektionen der unteren Atemwege sind nach der Ischämischen Herzkrankheit und Cerebrovaskulären Erkrankungen die dritt-häufigste Todesursache in der Welt (Mathers et al. 2009). In Deutschland starben nach Angaben des Statistischen Bundesamtes im Jahr 2008 21.051 Menschen an Pneumonien und diese stehen damit auf dem siebten Platz der Todesursachen in Deutschland. Für einen positiven Krankheitsverlauf sollte frühzeitig eine antibiotische Therapie erfolgen. Da ein Erreger zu diesem Zeitpunkt in der Regel nicht sicher bekannt ist, und mikrobiologische Diagnostik einige Zeit in Anspruch nimmt, sollte diese Therapie auf empirischen Daten zum erwarteten Erregerspektrum basieren (Höffken et al. 2004). Die häufigsten Erreger ambulant erworbener Pneumonien in Europa sind *Streptococcus pneumoniae* 19,3%, Viren 11,7%, *Mycoplasma pneumoniae* 11.1% und *Chlamydomphila pneumoniae* 8%. Weniger häufig sind Infektionen mit *Haemophilus influenzae* 3,3%, *Legionella* spp 1,9% und *Chlamydomphila psittaci* 1,5%. In fast 50% der Fälle kann jedoch kein pathogenes Agens nachgewiesen werden (Woodhead 2002, Woodhead 2009 und Lamoth und Greub 2010). Die Ursachen für die hohe Rate an CAP, bei denen kein Erreger nachgewiesen werden kann, sind vielschichtig. So sind einige der verursachenden Keime mit herkömmlichen mikrobiologischen Nachweismethoden schwer erfassbar. Es ist auch davon auszugehen, dass bis jetzt nicht alle Pathogene identifiziert sind (Woodhead 2002, Lamoth und Greub 2010).

Eine solches Pathogen könnte *Simkania negevensis* sein. Das Bakterium wurde 1993 von einer israelischen Forschungsgruppe um Simone Kahane in kontaminierten Zellkulturen entdeckt. Der ursprünglich als „Stamm Z“ bezeichnete Organismus zeigte in seiner Morphologie und in seinen Wachstumseigenschaften Ähnlichkeiten zu den Chlamydien, ließ sich aber anhand der äußeren Membranproteine 1 und 2 (OMP), welche typisch für die Chlamydien sind, nicht sicher zuordnen. Erst die Analyse seiner ribosomalen DNA, welche zu 80-87% identisch mit denen der Chlamydiaceae ist, erlaubte Rückschlüsse auf seine Verwandtschaftsbeziehungen und führte zum Entstehen einer eigenständigen Familie der Simkaniaceae (Friedman et al. 2003). Seit seiner Entdeckung werden sein Vorkommen und eine mögliche Pathogenität weltweit von Forschungsgruppen untersucht.

Schon 1997 versuchte Lieberman et al. einen Zusammenhang zwischen *Simkania negevensis* und CAP herzustellen (Lieberman et al. 1997). Seitdem wurde das Bakterium mit ambulant erworbenen Pneumonien, Bronchiolitis, AECOPD, Asthma und akuten Abstoßungsreaktionen bei Lungentransplantierten in Verbindung gebracht. Neue im Zellmodell gewonnene Erkenntnisse erhärten den Verdacht eines humanpathogenen Keimes. Der Organismus ist in der Lage, Epithelzellen des Respirationstraktes (BEAS-2B, NCI), des Gastrointestinaltraktes (HT-29) des Genitaltraktes (HEC-1A) und Endothelzellen vaskulären Ursprungs (HUVEC-C) zu infizieren (Kahane et al. 2007). Sicher ist bisher, dass die Verbreitung des Bakteriums nicht auf den israelischen Raum begrenzt ist. So konnte der Organismus bisher auch in Japan, der USA, in Kanada, in Brasilien und mehreren Ländern Europas, wie Dänemark, England, Italien, Finnland und Deutschland, nachgewiesen werden. Diese ersten Daten aus Deutschland sind der Arbeit von Matthias Tischer zu verdanken, der in Zusammenarbeit mit der israelischen Forschungsgruppe Techniken zur Anzucht und Antigenaufbereitung sowie dem PCR-Nachweis am Institut für Medizinische Mikrobiologie in Jena etablierte (Tischer 2004). Neben Kultur und PCR spielt der serologische Nachweis eine entscheidende Rolle in der Chlamydiendiagnostik (Tuuminen et al. 2000). Eine für *Simkania negevensis* optimierte serologische Nachweismethode stand bisher für Deutschland nicht zur Verfügung.

1.2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist der Aufbau einer Nachweismethode für Antikörper gegen *S. negevensis* in Anlehnung an bestehende Nachweisverfahren. Dieser Antikörpernachweis soll insbesondere bei Patienten erfolgen, welche an Pneumonien erkrankt sind. Diese Daten sollen einen Beitrag zur Einschätzung der klinischen Relevanz von *Simkania negevensis* bei CAP in Deutschland leisten.

2 Grundlagen

2.1 Chlamydien

2.1.1 Einführung

Die Geschichte der Chlamydien beginnt mit einer Forschungsreise des deutschen Radiologen Ludwig Halberstädter und des österreichischen Zoologen Stanislaus von Prowazek nach Java, Indonesien im Jahre 1907. Ursprünglich auf der Suche nach dem Erreger der Syphilis kehrten sie mit neuen Erkenntnissen über das Trachom zurück. In mittels Giemsa gefärbten Konjunktivazellen von an Trachom Erkrankten fanden sie Einschlüsse mit kleinen dichten Partikeln. Diese nannten sie „Chlamydozoa“ - griechisch für Mantel oder Umhang.

Der von Halberstädter und Prowazek entdeckte Erreger wurde unter dem Namen *Chlamydia trachomatis* bekannt und gehört zu den wichtigsten humanpathogenen Chlamydien (Horn 2008).

Eine klare Zuordnung zu den Bakterien erfuhren die Chlamydien erst in den 1960ern. Bis dahin waren sie als Mischform zwischen Viren und Bakterien in der Diskussion (Moulder 1966 und Horn 2008).

2.1.2 Taxonomie

Die Klassifizierung der Chlamydien hat sich in den letzten Jahrzehnten mehrfach geändert. Neue Arten wurden als den Chlamydien zugehörig identifiziert und bilden nun neue Familien innerhalb der Ordnung Chlamydiales.

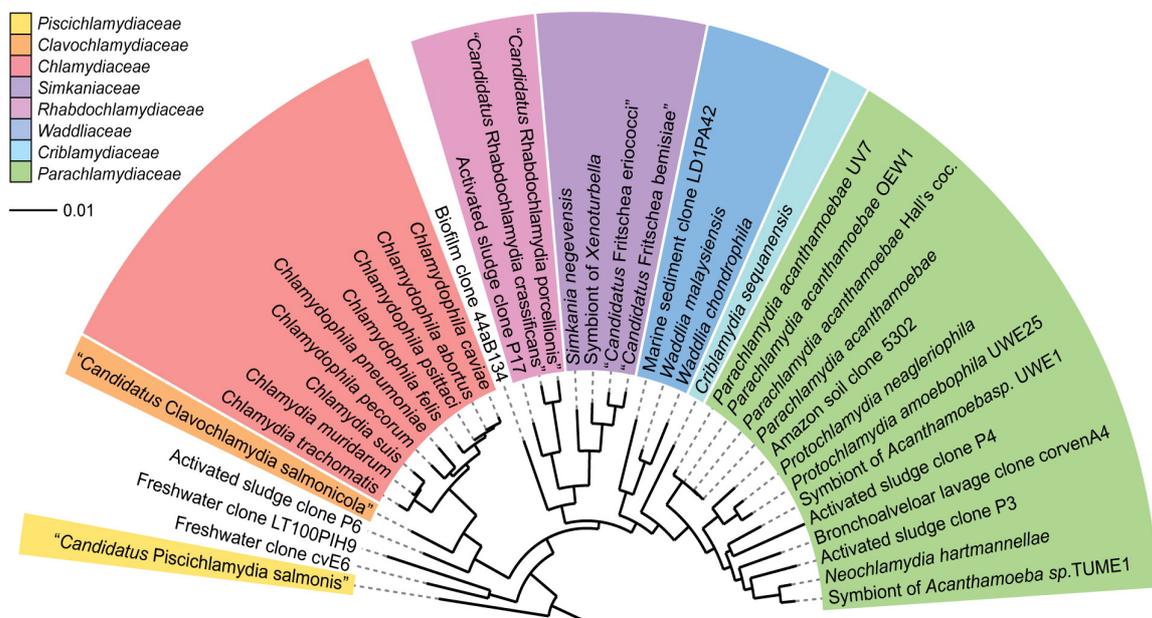
Die aktuelle Klassifikation wurde von Dr. Karin Everett auf dem Fourth Meeting of the European Society for Chlamydia Research im August 2000 in Helsinki (Finnland) vorgestellt (<http://www.chlamydiae.com>).

Diese Taxonomie der Chlamydien beruht auf der Analyse von Oberflächen-Antigenen und anderen Chlamydienproteinen wie dem Major-Outer-Membrane-Protein (MOMP), GroEL-Chaperonin, KDO-Transferase, Small-Cysteine-Rich-Lipoprotein und dem 60kDa Cysteine-Rich-Protein in Kombination mit Spezifika des jeweiligen Organismus wie seiner Virulenz (Bush and Everett 2001).

Ergebnisse aus der Analyse konservierter Insertions/Deletions-Stellen in den Enzymen UDP-N-Acetylglucosamine-1-Carboxyvinyltransferase (MurA), Protein-Synthesis-Elongation-

Factor-P (EF-P) und dem Mg^{2+} -Transport-Protein (MgtE) bestätigen die aktuelle Einteilung. Die untersuchten Proteine sind für die Zellwandsynthese der Bakterien von Bedeutung und daher in allen Hauptgruppen der Bakterien vertreten. Dabei scheinen die beobachteten Insertions/Deletions-Stellen für die Chlamydien charakteristisch zu sein (Griffiths und Gupta 2002). Auch der Vergleich von 400-500 Basenpaaren langen Sequenzen von Fragmenten von sieben Housekeeping Genen der Chlamydiales: *enoA*, *fumC*, *gatA*, *gidA*, *hemN*, *hlfX*, *oppA* unterstützt die momentane Taxonomie (Pannekoek et al. 2008).

Basierend auf der phylogenetischen 16S rRNA Analyse zeigt folgende Abbildung von Horn 2008 den aktuellen Artenreichtum der Chlamydiales.



 Horn M. 2008.
Annu. Rev. Microbiol. 62:113–31

Abbildung 1: Übersicht über die Ordnung der Chlamydiales nach Horn 2008

2.1.3 Lebenszyklus der Chlamydien

Während ihrer Entwicklung durchlaufen Chlamydien verschiedene Entwicklungsformen. Man unterscheidet Elementar- und Retikularkörperchen (Elementary Body = EB und Reticulate Body = RB) (Moulder 1991). Elementarkörperchen sind die vor allem extrazellulär vorkommende Form. Sie sind metabolisch weitgehend inaktiv und wegen ihrer Fähigkeiten, an Wirtszellen anzudocken und diese zu infiltrieren, verantwortlich für die Krankheitsausbreitung. Die EB werden während der Infektion in membrangebundene Vakuolen aufgenommen. Diese Vakuolen werden Einschlüsse (Inclusions) genannt. Die EB können sich in metabolisch aktive Formen umwandeln - die Retikularkörperchen. Diese sind die reproduktive Form der Chlamydien. Sie vermehren sich durch Zellteilung (Binary Fission). Sie sind in der Lage sich wieder in EB umzuwandeln. Nach einer artspezifischen Zeitdauer, wird die Wirtszelle lysiert und lässt die so vermehrten EB und Reste der RB frei (AbdelRahman und Belland 2005).

Die Elementarkörperchen sind klein, rund und elektronendicht. Sie sind etwa 0,3µm groß (Matsumoto 1973). Ihr bakterielles Nukleotid ist durch Bindung an histonähnliche Proteine Hct A und Hct B hochkondensiert (Brickman et al. 1993). Das bakterielle Nukleotid liegt exzentrisch und wahrscheinlich im Kontakt mit der Zellmembran oder Zellwand. Die Zellwand der EB enthält fast keine Peptidoglycane. Sie besitzen einen stark quervernetzten Außenmembrankomplex (Outer membran complex = Omc), der für die strukturelle Stabilität verantwortlich scheint. Er besitzt viele cysteinreiche Proteine OmpA (Outer membran protein A), OmcA und OmcB (Outer membran complex A und B), die über Cysteinbrücken intra- und intermolekular verbunden sind. Zusätzlich gibt eine hexagonale Proteinschicht, vor allem aus OmcB, dem EB Stabilität (AbdelRahman und Belland 2005).

Es wird vermutet, dass für den Kontakt zwischen Chlamydie und Wirtszelle spezielle Membranrezeptoren von Bedeutung sind. Als mögliche Adhärenzproteine werden unter anderem OmpA, OmcB, Hsp70 und verschiedene Pmp (Polymorphic membrane protein) diskutiert (AbdelRahman und Belland 2005, Grimwood und Stephens 1999, Wehrl et al. 2004). Die Kontaktaufnahme zwischen EB und Wirtszelle erfolgt in zwei Stufen. Die Anlagerung erfolgt zu Beginn reversibel über elektrostatische Effekte mittels heparansulfathaltigen Glykosaminykanen und dem OmpA. Der zweite Schritt der Bindung ist irreversibel. Dafür könnten Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) verantwortlich sein, der

genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (Stephens et al. 2001, Su et al. 1996, Carabeo und Hackstadt 2001, Davis et al. 2002).

Nach der irreversiblen Verbindung wird ein TTSS (Type III Secretion System) assoziiertes Protein ins Wirtszellinnere geschleust. Dieses Protein, genannt Tarp (Translocated actin recruiting phosphoprotein, CT456), wird im Zellinneren an Tyrosinresten phosphoryliert. Diese phosphorylierten Tarp ließen sich in der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran nachweisen, während das EB noch mit der Außenmembran verbunden war (Clifton et al. 2004).

Die Moleküle scheinen eine Rolle in der Vorbereitung der Zelle auf die Aufnahme der Chlamydie sowie bei der Umwandlung in die RB zu spielen. Die EB werden dann in Form von Vakuolen aufgenommen (AbdelRahman und Belland 2005).

Es folgt nun das Stadium der Primären Differenzierung: Die Umwandlung der EB in die replizierende, metabolisch aktive Form der RB. Zuerst muss das Nucleotid dekondensiert werden. Das geschieht durch Molekülinteraktionen zwischen kleinen Metaboliten des MEP (Non-Mevalonate-Pathway) und den chlamydialen Histon-DNA-Komplexen. Als möglicher Metabolit wird 2-C-Methylerythritol-2,4-Cyclodiphosphat betrachtet, der bei der Inaktivierung von HctA mitwirkt. Wie die Inaktivierung von HctB abläuft, ist bisher noch nicht bekannt (Grieshaber et al. 2004, AbdelRahman und Belland 2005).

Nach der Dekondensation der Chromosomen werden diese sehr schnell metabolisch aktiv. Zu Beginn dieses Zyklus sind große Mengen an mRNA von Genprodukten aus späteren Zyklusabschnitten vorhanden, wie beispielsweise für das HctA, während momentan benötigte mRNA für frühere Zyklusabschnitte in eher geringen Mengen vorliegt. Dieses Phänomen wird als Carryover-mRNA bezeichnet. Die Chlamydienzelle muss also über einen Mechanismus verfügen diese, Carryover-mRNA von der frisch synthetisierten zu unterscheiden. Wie das genau passiert, ist derzeit nicht bekannt. Man vermutet aber RNA-bindende Proteine, welche hier selektieren (AbdelRahman und Belland 2005, Belland et al. 2003).

Die Transkription beginnt in dem sich bildenden Retikularkörperchen schon kurze Zeit nach der Aufnahme in den Wirtsorganismus. Schon 15min post infectionem (PI) ist die Synthese neuer Chlamydienproteine nachweisbar (Plaunt und Hatch 1988). Man unterscheidet anhand

ihres zeitlichen Auftretens frühe (1-2h PI), mittlere (3-18h PI) und späte (20-48h PI) Genexpression. Zu den in der frühen Phase der Genexpression gebildeten Proteinen zählen Moleküle für den Transport von Metaboliten in das RB, wie zum Beispiel die ADP/ATP-Translokase oder ein Nukleotidphosphat-Transporter, Moleküle zur Umwandlung von Metaboliten, wie die Malat-Dehydrogenase oder die Methionine-Amino-peptidase, Moleküle zur Modifikation des Einschlusses und Proteine unklarer Funktion. Die Moleküle dienen also vor allem der Ernährung und der Modifikation der Einschluss-Vakuole, um eine Verschmelzung mit den Lysosomen und damit eine Verdauung des Bakteriums zu verhindern (Belland et al. 2003).

Die sich so bildenden Retikularkörperchen sind mit 1µm größer als die EB. Sie erscheinen granuliert mit diffusen, fibrillenartig angeordneten Nukleinsäuren. Die RB sind die metabolisch aktive, nichtinfektiöse Form der Chlamydien. Sie werden durch eine innere und eine äußere Membran umgrenzt. Im mittleren Teil des Entwicklungszyklus erfolgt die Vermehrung der RB mittels Zellteilung (AbdelRahman und Belland 2005, Matsumoto 1973). Die RB sind bereits nach sechs bis acht Stunden PI hoch transkriptiv aktiv. Zwischen 16 und 24 Stunden PI wachsen die Retikularkörperchen stark und teilen sich. Die Gene, die hierbei aktiviert werden unterteilt man in zwei Phasen. Die erste Phase beginnt ab sechs Stunden PI und enthält frühe, konstitutive und mittlere Zyklus-Cluster-Gene. Die größte Gruppe dabei bilden die konstitutiven Gene, welche grundlegende Zellfunktionen, wie Translation, DNA-Replikation und deren Energieversorgung, steuern. Die zweite Phase beginnt ab 18 Stunden PI und enthält zwei Gencluster. Den mittelspäten Gencluster I und II. Der mittelspäte Gencluster I enthält Gene für die Zellmembransynthese, Metabolismus, TTSS, Proteinfaltung, DNA-Replikation und Reparatur. Der mittelspäte Gencluster II scheint für Gene der Transkriptionskontrolle zu kodieren (AbdelRahman und Belland 2005, Nicholson et al. 2003, Belland et al. 2003).

Um im Wirtsorganismus nicht der Phagozytose und Lyse zum Opfer zu fallen, modifizieren die Chlamydien die Einschlussvakuole. (Friis 1972) So sind keine phagosomalen oder lysosomalen Marker in der Membran der Einschlussvakuole nachweisbar, was dafür spricht, dass die Membran nicht mit Phagosomen oder Lysosomen fusionieren kann (Al-Younes et al. 2004). Die Einschlussvakuolen untereinander sind jedoch in der Lage zu fusionieren.

Andere Modifikationen, wie die Aufnahme von Vesikeln mit Sphingomyelin und Cholesterol aus dem Golgi-Apparat, sind notwendig für die spätere Replikation der Chlamydien (Hackstadt et al. 1996, Carabeo et al. 2003). Innerhalb von zwei Stunden nach Absorption in den Wirtsorganismus bewegt sich die Vakuole unter Nutzung von zytoplasmatischem Dynein zum Minuspol des Golgiapparates und interagiert mit seinem mikrotubulusorganisierenden Zentrum (Grieshaber et al. 2003). Man vermutet, dass die Chlamydien das wirtseigene zelluläre Phagozytosesystem für ihre Ernährung nutzen (Al-Younes et al. 2004). Ebenfalls innerhalb der ersten zwei Stunden beginnt die Synthese sogenannter Inc-Proteine (Scidmore-Carlson et al. 1999). Sie besitzen ein doppelseitiges hydrophobes Motiv. Man nimmt an, dass sie die Einschlussvakuolenmembran spannen (AbdelRahman und Belland 2005).

Nach der Replikationsphase beginnen sich die RB wieder in EB umzuwandeln. Dieser Prozess wird von den Autoren als Sekundäre Differenzierung bezeichnet (AbdelRahman und Belland 2005). Wodurch genau dies ausgelöst wird, ist derzeit nicht genau geklärt. Vermutet wird ein Einfluss des TTSS (Bavoil et al. 2000). Die in dieser Phase aktiven Gene gehören zu denen der späten Genexpression. Hierzu gehören Gene des Außenmembrankomplexes (Omc) und Proteine, welche die Kondensation der Chromosomen bewirken, wie Hct A und B (Belland et al. 2003). Andere hier aktive Gene kodieren für die Thioredoxindisulfid-isomerasen CT780 und CT783 und die Membranethiolproteasen mtpA und mtpB. Sie werden bei der Quervernetzung des Außenmembrankomplexes über Disulfidbrücken benötigt (AbdelRahman und Belland 2005).

2.1.4 serologische Untersuchungsmethoden

2.1.4.1 Complement Fixations Test

Dieser Test wurde erstmals 1935 durch Bedson genutzt um Antikörper gegen *C. psittacii* und später Lymphogranuloma venereum nachzuweisen. Er wurde angewendet um Erstinfektionen mit *Chlamydia pneumoniae* zu erfassen. Mit diesem Test lässt sich entweder Antigen oder Antikörper nachweisen. Er beruht auf der Bindungsfähigkeit der Complementfaktoren mit Antigen-Antikörper-Komplexen und der Fähigkeit freier Complementfaktoren Blutzellen zu lysieren. Der Test ist also positiv, wenn die Blutzellen nicht lysieren, da in diesem Fall eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat und keine freien Complementfaktoren

vorhanden sind (United States National Library of Medicine). Ein Nachteil dieses Tests ist in Bezug auf die Chlamydiendiagnostik, dass er Antikörper gegen ein bei allen Chlamydien vorkommendes Polysaccharid-Antigen nachweist. Seine Sensitivität ist gering und damit zum Nachweis geringer Antikörpertiter wenig geeignet (Mahony et al. 1983, Treharne et al. 1983, Wang 2000 und Dowell et al. 2001). Heutzutage findet der Test aufgrund der geringen Spezifität bei Chlamydien keine Anwendung mehr. Beim Nachweis von Infektionen mit *Mycoplasma pneumoniae* wird sein Einsatz aufgrund einer Sensitivität von 90% von de Barbeyrac empfohlen (de Barbeyrac et al. 2006).

2.1.4.2 MIF (MicroImmunoFluorescence test)

Dieser Test wurde erstmals 1970 durch Wang und Grayston beschrieben. Er stellte über 30 Jahre den Goldstandard in der Chlamydienserologie dar und wird heute vor allem für den Nachweis von akuten *C. pneumoniae* Infektionen eingesetzt (Frikha-Gargouri et al. 2008). Ursprünglich wurde er entwickelt, um bei *C. trachomatis* Infektionen verschiedene Serovare zu unterscheiden. Bereits kurze Zeit später optimierten Wang und Grayston den Test, um auch antichlamydiale Antikörper nachweisen zu können. Mit Hilfe des MIF-Tests konnte *C. pneumoniae* als eigenständige Art der Chlamydiales identifiziert werden (Saikuu et al. 1985, Kuo et al. 1986). Auch dieser Test beruht auf einer Antigen-Antikörperreaktion. Als Antigen werden Elementar- und Retikularkörperchen benötigt. Diese werden auf Objektträgern fixiert und mit Seren verschiedener Verdünnung inkubiert. Die Sichtbarmachung einer Reaktion erfolgt mittels eines sekundären Anti-Human-Antikörpers, der mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) markiert ist. Es ist mit dieser Methode möglich, Antikörper der Klassen IgA, IgG und IgM zu unterscheiden (Treharne et al. 1983, Wang 2000, Tuuminen et al. 2000 und Dowell et al. 2001). Ein Nachteil dieser Technik ist, dass sie sehr zeitaufwendig ist und die Beurteilung der Proben stark vom Erfahrungsschatz des Untersuchers abhängig ist (Frikha-Gargouri et al. 2008). Er setzt außerdem die Gewinnung von antigenem Material, also Elementarkörperchen und Retikularkörperchen, voraus, was die Anzucht sämtlicher zum Nachweis gewünschter Bakterien und deren Aufbereitung nötig macht.

Sensitivität und Spezifität des Tests sind stark abhängig von der untersuchten Chlamydienart, ihrer Prävalenz und dem als Vergleichswert gesetzten Goldstandard. Für *C. pneumoniae* werden aufgrund höherer Prävalenzen in der Regel bessere Sensitivität und Spezifität sowie bessere prädiktive Werte ermittelt als für *C. trachomatis*.

Papaetis et al. beschreiben für den Nachweis von IgG-Antikörpern von *C. pneumoniae* eine Sensitivität von 88,5% bei einer Spezifität von 52,4%. Als positiver und negativer Vorhersagewert ergaben sich 53,5% und 88% (Papaetis et al. 2008), während Hvidsten et al. für IgM-Antikörper von *C. pneumoniae* eine Sensitivität von 79% und Spezifität von 86% beschreiben (Hvidsten et al. 2009). Diese Ergebnisse ähneln denen von Verkooyen et al. 1998. Die Autoren fanden für den Nachweis von akuter *C. pneumoniae* Infektion bei CAP-Patienten abhängig von der gewählten Goldstandardkombination Sensitivitäten von 38,5, 65,2 und 100% bei Spezifitäten von 97,9 bis 100%. Als positiver und negativer Vorhersagewert ergaben sich Werte von 80-100% bzw. 83-100% (Verkooyen et al. 1998).

Weitere Daten für den IgG-Nachweis von *Chlamydia pneumoniae* stammen von Hermann et al. 2004. In ihren Tests war eine Übereinstimmung der ELISA-Ergebnisse mit denen des MIF-Testes von $\geq 90\%$ zu verzeichnen.

Für *C. trachomatis* wurden für die IgG-Antikörperbestimmung von Bas et al. 2001 eine Sensitivität von 44 % und eine Spezifität von 89 % ermittelt (Bas et al. 2001). Morré et al. 2002 konnten hingegen für *Chlamydia trachomatis* IgG- und IgA-Antikörper eine deutlich bessere Sensitivität von 79,2 % zeigen. Die Spezifität betrug 83,1 % (Morré et al. 2002).

Es wird außerdem von falsch positiven Ergebnissen berichtet, wofür zirkulierende IgG-Rheumafaktoren verantwortlich gemacht werden (Kuo et al. 1995).

Als Hauptproblem für die großen Schwankungen gilt, dass die meisten MIF-Test keine Standard-Tests sondern haus-eigen entwickelte und angepasste Methoden sind. Sie sind daher untereinander schwer vergleichbar (Tuuminen et al. 2000).

2.1.4.3 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

1976 erstmals von Luis et al. für die Chlamydiendiagnostik verwendet (Lewis et al. 1977), eignet sich dieser Test zum Nachweis verschiedener Antikörperklassen. Der Test wurde ursprünglich zur Unterscheidung zwischen Antikörpern von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* entwickelt. Er beruht ebenfalls auf einer Antigen-Antikörperreaktion. Fertige ELISA-Kits sind dabei mit fest gebundenem Antigen erhältlich, sodass eine Antigenaufbereitung hier nicht nötig ist. Zu dem so gebundenem Antigen wird das Untersuchungsmaterial zugegeben. Nach einer Inkubationszeit wird das Material gewaschen, sodass nur an das Antigen gebundene Antikörper zurückbleiben. Eine Immunreaktion kann dann mittels eines sekundären an ein Enzym gekoppelten Antikörpers sichtbar gemacht werden. Dabei wird meist eine enzymatisch getriggerte Farbumschlagreaktion verwendet

(Tuuminen et al. 2000). Die im ELISA häufig vorkommenden geringen Extinktionen für niedrige oder mittlere Antikörperkonzentrationen bereiten regelmäßig erhebliche Probleme bei der klinischen Interpretation dieser Befunde.

2.2 Simkania negevensis

2.2.1 Taxonomie

Simkania negevensis ist ein obligat intrazellulär lebendes, chlamydienähnliches Bakterium. Der Name *Simkania negevensis* ist ein Akronym des Namens seiner Entdeckerin Simone Kahane und der Wüste Negev. Bisher existiert nur ein Bakterienstamm von *Simkania negevensis*: ZT=ATCCVR1471T (<http://www.chlamydiae.com>). *S. negevensis* gehört zur Familie der Simkaniaceae in der Ordnung der Chlamydiales. Die Einteilung erfolgte ursprünglich aufgrund seines den Chlamydien ähnlichen Entwicklungszyklus sowie phylogenetischer Analysen der 16S und 23S rRNA Gene. Für neue Mitglieder des Genus *Simkania* gilt, dass sie mindestens 95% Identität zu den 16S oder 23S rRNA von *Simkania negevensis* haben sollten (Kahane et al. 1993, 1995 und Everett et al. 1999). Sowohl Analysen des Major-Outer-Membrane-Protein (MOMP), GroEL-Chaperonin, KDO-Transferase, Small-Cysteine-Rich-Lipoprotein und des 60kDa Cysteine-Rich-Protein als auch des Protein-Synthesis-Elongation-Factor-P (EF-P) von *Simkania negevensis* mit seinem Insertions/Deletions-Muster bestätigten seine taxonomische Klassifizierung (Bush and Everett 2001, Griffiths und Gupta 2002, siehe 1.1).

2.2.2 Entdeckung

Simkania negevensis wurde 1993 von der Arbeitsgruppe um Simone Kahane von der Ben Gurion University of the Negev, Israel entdeckt. Die Forschungsgruppe gab ihm den Namen Bakterium „Z“ (Kahane et al. 1993). Aufmerksam wurde man auf *S. negevensis* über kontaminierte Verozellkulturen. In ihrer lichtmikroskopischen Untersuchung fielen sich schnell bewegende Partikel in zytoplasmatischen Einschlüssen der Verozellen auf. In der Transmissionselektronenmikroskopie ließen sich kleine, dichte sowie lange, homogene Formen erkennen, ähnlich den Elementar- und Retikularkörperchen der Chlamydien (Friedman et al. 2003).

2.2.3 Genom

Das Genom von *Simkania negevensis* umfasst $1,744 \pm 0,028$ Mbp und ist damit deutlich größer als die Durchschnittsgenomgröße der Chlamydia mit 1,1 Mbp. Es lässt sich ein Guanin/Cytosin-Gehalt des Genoms von $42,5 \pm 1,8$ mol% bestimmen. Die 16s und 23s rRNA Sequenzen von *Simkania negevensis* sind zu 80-87% identisch mit denen der Chlamydiaceae.

Eine Besonderheit ist, dass die 23S rRNA das Gruppe-I-Intron SnLSU,1 in der Intron-Encoded-Homing-Nuklease-I-CpaI-Target-Site aufweist. Dieses Intron wird nicht aus der rRNA durch Splicing entfernt. *Simkania negevensis* ist das erste Bakterium, in dem dies nachgewiesen werden konnte. Diese Art von Intron ist sonst in der 23S rRNA der Chloroplasten von Algen und in denen der Mitochondrien von Amöben zu finden. Da *S. negevensis* intrazellulär lebt, liegt der Verdacht nahe, dass es durch einen horizontalen Genaustausch entstanden ist (Friedman et al. 2003 und Everett et al. 1999). Auch könnte *S. negevensis* phylogenetisch so alt sein, dass diese Mitochondrien und Chloroplasten das entsprechende Gen mit *S. negevensis* teilen.

2.2.4 Morphologie und Wachstumscharakteristika

Simkania negevensis kann in einer Vielzahl verschiedener Zellkulturen vermehrt werden. Dazu zählen BGM-, HeLa-, Vero-, Humane Fibroblasten-, McCoy- und HL-Zellen. Bei 37°C wächst es unter Standardbedingungen für die Chlamydienanzucht. Es eignet sich dazu ein RPMI-Medium mit 15% fetalem Kälberserum, 1% Glukose, 10µg/ml Ampicillin, 100µg/ml Gentamicin, 160µg/ml Vanomycin und 1µg/ml Cycloheximide. Infizierte Zellen lassen sich durch dunkle, vor allem perinukleäre Streifen im Zytoplasma erkennen. Im Unterschied zu den anderen Chlamydien, welche nicht in der Lage sind Glukose zur Energieversorgung zu nutzen, benötigt *S. negevensis* obligat Glukose. Bei Fehlen von Glukose in der Nährlösung stagniert seine Entwicklung reversibel (Kahane et al. 1993).

Es werden zwei Entwicklungsformen von *Simkania negevensis* beschrieben: Elementar- und Retikularkörperchen. Die Retikularkörperchen sind homogen, fleckig und etwa 0,3-0,7µm lang. Die Elementarkörperchen sind mit 0,4-0,6 µm Größe etwa doppelt so groß wie bei den anderen Chlamydienarten üblich. Sie zeigen in der Transmissionselektronenmikroskopie dichte und weniger dichte Areale. Im Unterschied zu den anderen Chlamydienarten gibt es Hinweise, dass auch die Retikularkörperchen infektiös sind (Kahane et al. 1993, 2002, Friedman et al. 2003 und Ward 1983).

Der Entwicklungszyklus von *Simkania negevensis* ist dem der anderen Chlamydien sehr ähnlich. Mit zwölf bis 15 Tagen Zyklusdauer ist er jedoch deutlich länger. Die ersten zwei bis drei Tage vermehrt sich das Bakterium sehr schnell. Das Zytoplasma der infizierten Zellen zeigt dunkle Flecken, welche Unmengen an kleinen Vakuolen entsprechen. Zu diesem

Zeitpunkt lassen sich bereits hohe Titer an infektiösen Partikeln nachweisen. Danach folgt eine etwa acht Tage dauernde stationäre Phase. In ihr bilden sich eckige Vakuolen, welche zu Beginn leer, nach sieben bis zwölf Tagen mit kleinen Partikeln gefüllt erscheinen. Nach zwölf bis 14 Tagen beginnt die Lyse der Wirtszellen und die Membranen reißen auf (Kahane et al. 1999 und 2002). Die stationäre Phase ist sehr ungewöhnlich, da sie bei Chlamydien sonst nicht obligat auftritt (siehe 1.2). Sie wird sonst bei Nährstoffmangel, wie z.B. Tryptophanmangel bei *C. trachomatis*, beobachtet.

2.2.5 Membranstruktur und Antigene

In Kreuzreaktivitätstest mittels Westernblot zeigten sich nur eine kleine Menge an kreuzreaktiven Antikörpern. Es handelte sich vor allem um Hitzeschockproteine, die *S. negevensis* mit *Waddlia chondrophila*, *Parachlamydia acanthamoebae*, *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydophila pneumoniae* gemeinsam hat (Friedman et al. 2003). Monoklonale Antikörper gegen die chlamydienspezifischen Membranproteine OmcB, OmpA und Lipopolysaccharide zeigen keine Reaktionen (Kahane et al. 1993 und 1999). In der Immunoblotanalyse von *S. negevensis* Zelllysaten und hyperimmunisierten Mäusen ließen sich drei Gruppen von Banden nachweisen. (37-42 kDa, 26, 52, 58 und 64 kDa und eine größer 100kDa) Dabei reagierten monoklonale Antikörper vor allem mit der 37-42 kDa Bande (Friedman et al. 2003).

2.2.6 Infektionsmodelle

Simkania negevensis ist in der Lage verschiedenste, humane Zellarten zu infizieren. Dazu zählen Epithelzellen des Respirationstraktes (BEAS-2B, NCI), des Gastrointestinaltraktes (HT-29) des Genitaltraktes (HEC-1A) und Endothelzellen vaskulären Ursprungs (HUVEC-C). Kahane et al. 2007 konnte zeigen, dass die Infektion mit *S. negevensis* verschiedene Verlaufsformen aufweisen kann:

- Die aktive Infektion mit zytopathischen Effekten, Zunahme der Infektiösität, Nachweis von *Simkania negevensis* DNA und Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin sechs und Interleukin acht.
- Die persistierende Infektion ohne zytopathische Effekte, aber mit Nachweis von DNA und geringer Infektiösität sowie Zytokinfreisetzung.
- Die kryptische Infektion ohne zytopathische Effekte oder Infektiösität, aber mit Nachweis von DNA und Zytokinfreisetzung.

Persistierende Infektionen ließen sich künstlich durch Mangel an Nährstoffen, wie beispielsweise Eisen, induzieren oder traten spontan in den Zelllinien des gastrointestinalen oder endovaskulären Ursprungs auf (Kahane et al. 2007).

Der Fund des Gruppe-I-Intron in der 23S rRNA, welches sonst nur in Algen und Amöben nachweisbar ist, regte Nachforschungen bezüglich anderen Wirtsorganismen an. So konnten Kahane et al. 2001 *Acanthamoeba polyphaga* mit *Simkania negevensis* infizieren. Das Bakterium ist in der Lage, sich in der Amöbe zu vermehren und in den Amöbenzysten zu überleben. Außer *A. polyphaga* kann *S. negevensis* auch andere Amöbenarten, wie *Balamuthia mandrillaris* und *Hartmannella vermiformis*, infizieren und sich in ihnen vermehren (Michel et al. 2005).

Es wird diskutiert, ob Amöben ein natürliches Reservoir für *Simkania negevensis* darstellen und eine Rolle in der Krankheitsausbreitung spielen.

So ließ sich DNA von *Simkania negevensis* mittels PCR auch in Trinkwasserproben und wiederaufbereitetem Abwasser der Negev -Region (Israel) nachweisen (Kahane et al. 2004). Wasser könnte als Infektionsmedium eine Rolle spielen. Gestützt wird dies durch den Nachweis von *S. negevensis* in den häuslichen Wasserversorgungen von mit CAP hospitalisierten Kindern (Kahane et al. 2006). Auch in Deutschland konnte *Simkania negevensis* neben anderen relativ neuen Vertretern der Chlamydiales aus den Familien *Waddlia*, *Parachlamydia* und *Neochlamydia* aus Wasserpflanzen zur Reinigung von Abwässern nachgewiesen werden (Horn und Wagner 2001).

An Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass *Chlamydia pneumoniae* sich in Monozyten/Makrophagen über Lymph- und Blutbahn systemisch ausbreiten kann (Moazed et al. 1998).

Ähnlich dazu ist *S. negevensis* in der Lage, in der Monozyten/Makrophagen-Line U937 zu überleben. Kahane et al. 2008 zeigte, dass das Bakterium diese Zellen zu seinem Transport und seiner Entwicklung nutzen kann. Man konnte über infizierte U937-Zellen die Infektion auf verschiedene Gewebe übertragen (Kahane et al. 2008).

2.2.7 Behandlungsmöglichkeiten

Simkania negevensis ist gegen Penicillin und Bacitracin resistent. Es weist Sensibilitäten für Makrolidantibiotika, Tetracykline und D-Cycloserine auf. Experimente an infizierten mit Cyclohexamid behandelten Vero-Zellen zeigten, dass Azithromycin, Minocycline und Erythromycin am effektivsten inhibitorisch und bakterizid auf *S. negevensis* wirken.

Schwächere Wirkung haben Doxycycline und Ofloxacin. Ciprofloxacin ist am schwächsten wirksam (Friedman et al. 2003).

In neueren Untersuchungen von Kahane et al. 2007 wurde gezeigt, dass auch nach der Behandlung mit Azithromycin oder Rifampicin oder beiden, zwar effektiv die Infektiösität bekämpft werden kann, aber dennoch Simkania-DNA in der Kultur nachweisbar bleibt. Nach Absetzen der Antibiotika kam es in einigen Fällen zur Reaktivierung von kryptischen zu persistierenden Infektionen (Kahane et al. 2007).

Das Bakterium scheint gegen Interferon-gamma unempfindlich zu sein. Sein Wachstum wird jedoch durch Anwesenheit von Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha) gehemmt (Friedman et al. 2003).

2.2.8 Nachweise

Seit seiner Entdeckung sind die Verbreitung und Pathogenität von *S. negevensis* Gegenstand von Forschungsarbeiten in aller Welt. Es wird derzeit mit ambulant erworbenen Pneumonien, Infektionen der Atemwege wie Bronchiolitis, AECOPD, Asthma und akuten Abstoßungsreaktionen bei Lungentransplantierten assoziiert. Um Ergebnisse bei Kranken besser beurteilen zu können, ist es notwendig, die Seroprävalenz von *S. negevensis* in der gesunden Bevölkerung zu kennen. Die Durchseuchungsrate ist dabei regional sehr unterschiedlich. Daten wurden bisher für Israel, Brasilien, Dänemark, Kanada, Japan, England, Finnland und Italien publiziert, wobei die Seroprävalenzen bei Gesunden zwischen 4,3% (Japan) bis 80% (Beduinen in Israel) schwanken. Gemeinsam ist den meisten Untersuchungen, dass die Seroprävalenz mit zunehmendem Alter steigt.

2.2.8.1 Nachweise in Asien

Eine der ersten Untersuchungen erfolgte an an CAP erkrankten Erwachsenen der Region Beer-Sheva in Israel mittels eines für Simkania optimierten ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay). Es wurden Seren auf IgG- und IgA-Antikörper gegen *S. negevensis* untersucht. Bei 112 (37%) von 308 Personen (Durchschnittsalter 49,3 Jahre) konnte serologisch eine durchgemachte Infektion mit Simkania negevensis nachgewiesen werden.

In acht Fällen gab es Hinweise auf eine akute Infektion. In vier dieser acht Patienten ließ sich mindestens ein weiteres mögliches pathogenes Agens für CAP nachweisen. In den anderen vier jedoch nicht (Lieberman et al. 1997).

Bereits 1998 konnten Kahane et al. Simkania mit Bronchiolitis in Verbindung bringen. Dazu wurden am Soroka Medical Center in der Negev-Region-Israels 239 Kinder mit Bronchiolitis und 78 gesunde Kinder im Alter von zwei Wochen bis zwölf Monaten Rachenspülwasser und Blutproben entnommen. Die Proben wurden auf RSV, Adenoviren, Zytomegalie-Viren und Simkania negevensis untersucht. Bei 116 Kindern (46%) konnten sie einen möglichen Erreger nachweisen. In 60 (25%) der Rachenspülwässer konnte Simkania negevensis mittels PCR festgestellt werden und in 38 (15%) wurde außer Simkania negevensis kein weiterer Erreger nachgewiesen. In der Kontrollgruppe waren alle Proben negativ. ($P < 0.001$). Die Seren wurden mittels eines Immunoperoxidase-Assays auf IgA-Antikörper untersucht. Dabei zeigten 15% der erkrankten aber nur 1,3% der gesunden Kinder Antikörper. ($P < 0.001$) Simkania negevensis wird hier als mögliches pathogenes Agens diskutiert, kann aber auch nur als Kommensale die Schleimhäute besiedeln (Kahane et al. 1998).

Um diese Daten einordnen zu können, sammelten Friedman et al. 1999 Informationen über die Seroprävalenz bei Gesunden. Sie führten dazu IgG-Antikörperbestimmungen bei gesunden Erwachsenen mittels ELISA durch. Es wurden dabei 94 Medizinstudenten und Krankenschwesterschülerinnen/ Krankenpflegerschüler, 100 Blutspender, 106 Erwachsene aus landwirtschaftlichen Siedlungen der Negev-Region und 45 erwachsene Beduinen getestet. Die Seroprävalenz von IgG-Antikörpern lag zwischen 55% und 80%, wobei die Beduinen mit 80% die höchste Rate aufwiesen. Auf Basis dieser Ergebnisse vermuten die Autoren, dass Infektionen mit Simkania negevensis in Süden Israels häufig auftreten (Friedman et al. 1999).

2002 versuchte die Arbeitsgruppe um Lieberman einen Zusammenhang zwischen Simkania negevensis und AECOPD (Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease) herzustellen. 217 Krankenhausaufenthalte von 190 Patienten mit AECOPD sowie 100 Patienten ohne COPD-Diagnose der Region Beer-Sheva in Israel wurden hierbei betrachtet. Mittels ELISA wurde auch hier auf IgA- und IgG-Antikörper getestet. Mit 63% in COPD und 69% in der Kontrollgruppe fand sich jedoch kein signifikanter Unterschied beim Test auf eine durchgemachte Infektion mit Simkania. In fünf Fällen der COPD-Patienten ließen sich Hinweise auf eine akute Infektion mit Simkania negevensis finden (Lieberman et al. 2002).

In den Untersuchungen von Kahane et al. 2006 konnten mit *S. negevensis* belastete Trinkwasserproben aus dem häuslichen Umfeld von an ambulant erworbenen tiefen Atemwegsinfektionen erkrankten Kindern mit ihren Nasenspülwässern in Beziehung gesetzt werden. Der Nachweis erfolgte über PCR, Membranimmunoassay (MEIA) und Isolation in

Zellkultur. 34 Kinder wurden untersucht und in 76% waren sowohl das Nasenspülwasser als auch die Trinkwasserprobe positiv (Kahane et al. 2006).

Yamaguchi et al. 2005 sammelten serologische Daten in Japan. 588 gesunde Japaner der Stadt Shimonoseki im Westen Japans wurden mittels MIF auf IgG-Antikörper gegen *S. negevensis* untersucht. Es waren insgesamt 4.3% (25 von 588) der untersuchten Japaner seropositiv. Es wurde ein Ansteigen der Prävalenz auf bis 15% mit zunehmendem Alter der Probanden beobachtet. In der Altersgruppe 20 und älter waren 7.5% (22 of 292) seropositiv (Yamaguchi et al. 2005).

2.2.8.2 Nachweise in Nordamerika

2003 publizierten Greenberg et al. ihre Beobachtungen an 22 mit akuter Bronchitis hospitalisierten Inuits in Baffin Island, Kanada. Mittels IFA konnten sie in 14 (64%) der gewonnenen Rachenspülwässer *S. negevensis* nachweisen. In zwei Fällen ließ sich außer *Simkania negevensis* kein anderes pathogenes Agens nachweisen. In den restlichen Fällen lagen Mischinfektionen mit CMV, RSV, Adenoviren, Parainfluenzaeviren, Rhinoviren, Enteroviren, Influenzae A oder C. pneumoniae vor. Die Autoren vermuten, dass *S. negevensis* vor allem als opportunistischer Erreger auftritt (Greenberg et al. 2003).

Auch in Brooklyn, New York, wurden Kinder und Erwachsene im Alter zwischen zwei Wochen und 83 Jahren mit Bronchiolitis, Pneumonie oder Asthma auf eine Infektion mit *S. negevensis* mittels PCR, Kultur und ELISA getestet. 108 Patienten und 110 gesunde Kontrollpersonen wurden in die Studie einbezogen. Die Gesamtprävalenz von IgG-Antikörpern gegen *S. negevensis* lag bei 23,5%. Die Prävalenz nahm dabei mit steigendem Alter zu. Es gab keine signifikanten Unterschiede in den beiden Gruppen, sodass die Autoren annehmen, dass *S. negevensis* im Zeitraum der Untersuchung kein wesentlicher pathogener Faktor für respiratorische Erkrankungen in Brooklyn darstellt (Kumar et al. 2005).

Neuere Forschungsergebnisse von Husain et al. 2007 haben zeigen können, dass *S. negevensis* in hoher Prävalenz bei Lungentransplantierten vorkommt und im Zusammenhang mit einer akuten Abstoßungsreaktion stehen könnte. Verglichen wurden BAL-Analysen (Bronchoalveoläre Lavage) von Lungentransplantierten und anderen immunkompromittierten Patienten mittels PCR. Bei 40 von 41 (97,5%) der Lungentransplantierten wurde *S. negevensis* nachgewiesen, verglichen mit einem von sieben (14%) in den anderweitig immunsupprimierten Patienten. In der zweiten Phase wurden dann 19 der Lungentransplantierten weiter untersucht, wobei 51 BALs eingeschlossen wurden.

80% (41) der Proben waren dabei positiv auf *S. negevensis*. 59% (24 von 41) zeigten sowohl positive PCR als auch Abstoßungsreaktion verglichen mit 30% (drei von zehn) mit negativer PCR und Abstoßung (Husain et al. 2007).

2.2.8.3 Nachweise in Südamerika

Aus Südamerika liegen derzeit nur Daten aus Brasilien vor. 184 Kinder unter fünf Jahren mit einer radiologisch gesicherten Pneumonie ambulanten Ursprungs wurden in die Untersuchung einbezogen. Mithilfe eines inhouse Mikroimmunfluoreszenztestes wurden Seren der Kinder auf IgG- und IgM-Antikörper gegen *C. pneumoniae* und *S. negevensis* getestet. In drei (1,6%) der untersuchten Fälle wurden anhand eines vierfachen Titeranstiegs der IgM-Antikörper Hinweise auf eine akute Infektion mit *S. negevensis* gefunden. Zwei der Patienten wiesen gleichzeitig Infektionen mit RS-Viren, eine davon zusätzlich mit Influenza-B-Viren auf. Alle Kinder zeigten nur milde Symptome und erholten sich schnell. Eine antibiotische Therapie erfolgte mit Penicillin-G i.v. gefolgt von einer oralen Amoxicillintherapie (Nascimento-Carvalho et al. 2009).

2.2.8.4 Nachweise in Europa

In Dänemark konnte eine Seroprävalenz von IgG-Antikörpern von 41% festgestellt werden. Johnsen et al. 2005 untersuchten mittels Immunofluorescence Assay (IFA) und Real-Time-PCR 100 gesunde Blutspender und 185 an persistierendem Husten erkrankte Personen. Auch 43% der Erkrankten wiesen IgG-Antikörper auf. IgA-Antikörper und *Simkania*-DNA waren nicht nachweisbar. Die Autoren vermuten eine hohe Seroprävalenz von *S. negevensis* in Dänemark. Es ließ sich ein Ansteigen der Prävalenz mit zunehmendem Alter zeigen. Einen Zusammenhang mit persistierendem Husten ließ sich jedoch nicht belegen (Johnsen et al. 2005).

In Cornwall, England, untersuchten Friedman et al. 2006 200 gesunde Schwangere zwischen 16 und 42 Jahren und 120 Patienten zwischen einem und 55 Jahren mit Infektionen des Respirationstraktes mittels PCR, Zellkultur und ELISA auf Hinweise einer Infektion mit *S. negevensis*. 42% der gesunden Schwangeren wiesen IgG-Antikörper gegen *Simkania negevensis* auf. In der Patientengruppe nahm die IgG-Prävalenz mit steigendem Alter zu. Sie betrug 15% bei Kindern zwischen einem und vier Jahren und stieg auf 62% bei Erwachsenen zwischen 16 und 55 Jahren. Der Unterschied in der IgG-Seroprävalenz der erwachsenen Patienten und gesunden Schwangeren war aber nicht statistisch signifikant.

Bei sechs von 200 gesunden Schwangeren (3%) und bei fünf von 29 erwachsenen Patienten (17%) wurden IgA-Antikörper nachgewiesen, was aus Sicht der Autoren auf eine akute Infektion hinweist (Friedman et al. 2006).

In Studien aus Finnland wurde versucht, *Simkania negevensis* mit dem Ausbruch von Asthma in Verbindung zu bringen. Auch hier ließ sich dieser Zusammenhang nicht nachweisen, es zeigte sich aber ebenfalls eine relativ hohe Prävalenz. Korppi et al. 2006 untersuchten dazu 104 Kinder mit Asthmasymptomatik und 122 Kontrollkinder, jeweils im Alter von ein bis sechs Jahren. Mittels MIF wurden IgM-, IgA- und IgG-Antikörper gegen *S. negevensis* nachgewiesen. IgG-Antikörper fanden sich bei zwölf (12%) der erkrankten und zwölf (10%) der gesunden Kinder; IgM-Antikörper in zwei (2%) der erkrankten und neun (8%) der gesunden Kinder. IgA-Antikörper konnten nicht nachgewiesen werden. Die Seroprävalenz stieg auch hier mit zunehmendem Alter an (Korppi et al. 2006).

Eine weitere Untersuchung in Finnland von Heiskanen-Kosma et al. 2008 verstärkt die Vermutung eines Zusammenhangs der Infektion mit *S. negevensis* und CAP bei Kindern. Dazu wurden 174 Seren von Kindern mit CAP mittels MIF auf IgM-Antikörper untersucht. In 18(10%) konnte eine Infektion nachgewiesen werden. Auch hier nahm die Infektionsrate mit steigendem Alter zu und in 67% ließen sich Mischinfektionen nachweisen. In 16 Fällen (9%) waren IgG-Antikörper nachweisbar (Heiskanen-Kosma et al. 2008).

Auch aus Nord-Italien gibt es Daten zur Seroprävalenz bei Kindern im Alter von 16 Monaten bis zehn Jahren mit CAP. Mittels MIF wurden IgM- und IgG-Antikörper bestimmt. Hinweise auf eine akute Infektion lagen in fünf (4.9%) der Fälle vor. In zwei Fällen Mischinfektionen mit *Mycoplasma pneumoniae* und in einem Fall mit RSV. Die Gesamtprävalenz von Antikörpern lag in der gesamten Altersspanne zwischen 20 und 30% (Fasoli et al. 2008).

2.2.8.4.1 Nachweise in Deutschland

Erste PCR-Ergebnisse liegen für Kinder mit respiratorischen Infekten vor. In der Untersuchung von Tischer 2004 konnte bei sechs von 49 Kindern (12%) aus der Kinderklinik Jena im Rachen- bzw. Nasensekret ribosomale DNA von *S. negevensis* nachgewiesen werden. Auch in sieben von 193 Gewebeproben aus Adenoid- bzw. Tonsillektomien der HNO-Klinik Jena ließ sich simkaniale rDNA nachweisen. Es konnte hier erstmals gezeigt werden, dass der Organismus auch in Deutschland vorkommt (Tischer 2004). Serologische Untersuchungsdaten aus Deutschland stehen derzeit nicht zur Verfügung.

3 Methodik

3.1 Material

3.1.1 Patientenproben

Die Ergebnisse von Lieberman et al. 1997 lassen eine Assoziation von *S. negevensis* und CAP vermuten. Die Untersuchungen dieser Arbeit konzentrierten sich daher auf Patienten aus der CAPNETZ-Studie. Da aus dieser Patientengruppe nur Einzelseren aus der Einschlussuntersuchung in die Studien zur Verfügung standen, wurde später eine zweite Gruppe Patienten eingeschlossen, von denen im Abstand von mindestens zwei Wochen zwei Serumproben vorhanden waren. Gesucht wurde hierbei vor allem nach atypischen Pneumonieverläufen.

3.1.1.1 CAPNETZ-Proben

Die Proben stammen aus den Beständen der CAPNETZ-Studie. Das Institut für Medizinische Mikrobiologie Jena war an dieser Studie beteiligt. Im Rahmen dieser Studie wurde Untersuchungsmaterial von an CAP erkrankten Patienten aus ganz Deutschland gewonnen. Folgende Einschlusskriterien waren zwingend zu erfüllen: unterschriebene Einverständniserklärung, Anonymisierung, Alter ≥ 18 und sichtbares Infiltrat im Röntgenthorax. Zum Einschluss musste dann mindestens ein weiteres der folgenden Kriterien erfüllt sein: Husten, purulentes Sputum, positiver Auskultationsbefund und Fieber $\geq 38,3$ (rektal) oder $\geq 37,8$ (axillär/oral/aurikulär/sublingual). Ausgeschlossen wurden Patienten mit stationärem Krankenhausaufenthalt in den letzten 28 Tagen, Zytostatikatherapie in den letzten 28 Tagen bzw. Neutropenie mit neutrophilen Granulozyten $<1000/\mu\text{l}$, Steroidtherapie ($\geq 20\text{mg}$ Prednisolon-Äquivalent/Tag > 14 Tage) und HIV-Infektion, immunsupprimierender Therapie nach Organ- oder Knochenmarks-Transplantation und florider Tuberkulose.

Am Institut für medizinische Mikrobiologie der FSU-Jena wurden im Rahmen der CAPNETZ-Studie die Antikörper gegen *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* bei eingeschlossenen Patienten bestimmt und die *C. pneumoniae*-PCR aus respiratorischen Proben durchgeführt. Auf Grundlage dieser Arbeiten sollten nur Seren von Patienten einbezogen werden, von denen Rachenspülwasser bereits mittels PCR untersucht worden war. Die Proben waren bisher nur durch ihre Lieferschiene in analoger Form verwaltet, wobei sie nach ihrem jeweiligen Lieferdatum sortiert vorlagen. Um der jeweiligen Pseudonymnummer

eines Rachenspülwassers eine Serumprobennummer zuordnen zu können, habe ich die gesamten Lieferlisten digitalisiert. Es wurden so 4448 Serumproben mit Pseudonymnummer und Lieferdatum erfasst. Mittels Textsuche konnte von 520 mit PCR untersuchten Proben 401 zugehörige Serumproben anhand ihrer Pseudonymnummer identifiziert und einer Lagerungsnummer im Institut zugeordnet werden. Anhand dieser Lagerungsnummer konnten die Proben dann im Tiefkühlager aufgefunden werden. Die Proben waren wie üblich bei -30°C in Plastiktubes gelagert worden. Von diesen 410 Proben stammen 71 aus Berlin, 20 aus Bochum, 20 aus Köln/Köln-Bonn, 89 aus Lübeck, 35 aus Lüdenscheid, 75 aus Magdeburg, 49 aus Rotenburg, 31 aus Ulm, vier aus Würzburg und sieben konnten keinem Ort zugeordnet werden.

Das positive Votum der Ethikkommission zu diesen Untersuchungen vom 13.12.2005 liegt vor.

3.1.1.2 Proben des Universitätsklinikums Jena

Diese Proben stammen aus Rückstellbeständen der Medizinischen Mikrobiologie Jena der Jahre 2003-2006. Die Auswahl erfolgte nach zwei Kriterien: der Verdachtsdiagnose und dem Vorhandensein von mindestens zwei Seren im Abstand von mindestens 14 Tagen. Gesucht wurde nach Verdachtsdiagnosen, welche Pneumonie oder atypische Pneumonie beinhalteten. Auf diese Weise wurden 337 Patientenserum von 160 Patienten rekrutiert. 68 Patienten mit der Verdachtsdiagnose atypische Pneumonie und 92 mit der Verdachtsdiagnose Pneumonie. Die Proben wurden anhand ihrer Labor- und Lagerungsnummer identifiziert und anonymisiert. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -30°C in dafür vorgesehenen Plastiktubes.

Das positive Votum der Ethikkommission wurde am 13.12.2005 erteilt.

3.1.2 Chemikalien

PBS	Nährbodenküche der Mikrobiologie
(Zusammensetzung: Aqua dest.:	1000ml
Natriumchlorid:	8,0g Fa. Merck
Dinatriumhydrogenphosphat-Diphosphat:	1,44g Fa. Merck
Kaliumdihydrogenphosphat:	0,2g Fa. Merck
Kaliumchlorid:	0,2g Fa. Merck
ph-Wert:	7,0 +/- 0,2)
Immersionsöl	Fa. Merck KGaA Corporate Purchasing Darmstadt, Deutschland
Aceton	Fa. Mallinckrodt Baker Inc., Griesheim, Deutschland
Aqua dest.	Nährbodenküche der Mikrobiologie
(Reinstwassersystem GenPure	Fa. TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert, Deutschland)
Dottersack	
RIDA Fluor Eindeckmedium	Fa. biopharm GmbH, Eppelheim, Deutschland
Biognost-r-IgG-FITC-Konjugat	Fa. Biognost Labordienst GmbH, Bochum Deutschland
Fluorescein(FITC)-conjugated- affinipure-Goat-Anti-Rabbit IgG (H+L)	Fa. Biognost Labordienst GmbH, Bochum Deutschland

3.1.3 Geräte

CO ₂ -Brutschrank	Fa. Thermo Fischer Scientific, München, Deutschland
Schwenkplatte Heidolph polymax 1040	Fa. Heidolph Elektro GmbH & Co KG, Kelheim, Deutschland
96 Well Mikrotiterplatten	Fa. Greiner Bio-ONE GmbH, Frickenhausen, Deutschland
sterile 10 ml Schraubröhrchen	Fa. Greiner Bio-ONE GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Objektträger mit 21 Felder Maske	Fa. Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Deckgläschen	Fa. Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Fixationsgläser	Fa. Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Deutschland
feuchte Kammern (Instrumentenschalen)	Fa. Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Deutschland
Multipette plus	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
verschiedene Pipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipettenfilterspitzen	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Fa. Zeiss, Jena, Deutschland
Objektiv: Plan Neofuar 100x Öl	Fa. Zeiss, Jena, Deutschland
Vortex Heidolph Reax 2000	Fa. Heidolph Elektro GmbH & Co KG, Kelheim, Deutschland

3.1.4 Computerprogramme

OpenOffice.org 3.0.1 Writer	Sun Microsystems Inc. 2000-2008
OpenOffice.org 3.0.1 Calculator	Sun Microsystems Inc. 2000-2008

3.2 Methoden

Im Folgenden werden alle für die Durchführung eines indirekten Immunfluoreszenztests nötigen Arbeitsschritte beschrieben. Die Methodik ist der von Wang 2000 beschriebenen Technik für die Mikroimmunfluoreszenz bei *Chlamydia pneumonia* angelehnt (Wang 2000).

3.2.1 Antigengewinnung

Für die Antigengewinnung ist es notwendig, *S. negevensis* zu vermehren. Dafür haben sich BGM-Zellen (Buffalo-Green-Monkey = grüne Meerkatzenzellen) als günstig erwiesen. Diese müssen mit den Simkanien infiziert werden. Danach wird ein Vermehrungszyklus abgewartet, bevor das Ernten beginnen kann. Der optimale Zeitpunkt des Erntens ist dabei von der Geschwindigkeit des Zyklus abhängig. Daher sollten regelmäßige mikroskopische Kontrollen durchgeführt werden. Nach dem Ernten muss das gewonnene Material noch aufgetrennt und von unerwünschten Stoffen, vor allem Zellresten, befreit werden.

3.2.1.1 Zellkultur

Für Anzucht und Vermehrung von *S. negevensis* stehen am Institut, Dank der Arbeit von Matthias Tischer, bereits geeignete Methoden zur Verfügung (Tischer 2004). Daher soll hier nur kurz darauf eingegangen werden. Für die Zellkultur wurde der *Simkania negevensis* Stamm VR-1471 aus der „American Type Culture Collection“ (ATCC), Manassas/USA, verwendet.

Wie schon unter 2.2.4. beschrieben, eignen sich verschiedene Zelllinien zur Anzucht von *S. negevensis*. Am Institut für Medizinische Mikrobiologie in Jena werden dafür BGM-Zellen verwendet. Diese werden in Flaschen und auf Deckgläser aufgebracht. Als Nährmedium dient den Zellen Opti-MEM1 (GIBCO) und 10%iges fetales Kälberserum (GIBCO). Die Zellen müssen nun drei Tage im CO₂-Brutschrank bei 37°C wachsen, dabei soll ein gleichmäßiger einschichtiger Zellrasen entstehen. Die Deckgläschen dienen dabei der Kontrolle von Wachstum und Verteilung der BGM-Zellen, welche regelmäßig mikroskopisch durchgeführt werden sollte.

Im zweiten Schritt werden die Flaschen mit *S. negevensis* infiziert. Dazu wird das Medium aus den Flaschen abgesaugt. Jetzt kann mit $3,3 \times 10^7$ IFU/ml infiziert werden. Zur Erleichterung des Eindringens der Simkanien kann eine Zentrifugation, ähnlich wie bei *C. pneumoniae* durchgeführt werden. Dadurch werden die Zellen ausgebreitet und den

Bakterien der Zugang zu den Rezeptoren für die Internalisierung erleichtert. Anschließend werden die Flaschen im 5% CO₂-Brutschrank bei 37°C ca. acht Tage lang bebrütet.

3.2.1.2 Antigenaufbereitung

In diesem Schritt werden die in den BGM-Zellen vermehrten Simkanien aufbereitet. Dabei werden Elementarkörperchen und Retikularkörperchen gewonnen.

Es werden vier Fläschchen vorbereitet:

- 1 - erster Schabedurchgang
- 2 - zweiter Schabedurchgang
- 3 - erstes und zweites mal Spülen
- 4 - abgesaugtes Medium

Zuerst wird das Medium bis auf einen kleinen Rest (ca. 0,5ml) aus den Fläschchen abgesaugt. Dieser Rest ist nötig, um abschaben zu können, und sollte daher bei den beiden Schabeschritten immer beibehalten werden. Der folgende Schritt dient dem mechanischen Abtragen und Aufschließen der Zellen. Mit einem Schaber (nunc cell Scraper, 23 cm) werden die Fläschchen quer und längs abgeschabt. Den Schaber dabei steril halten, um ein Auswechseln zu vermeiden, da dies einen hohen Zellverlust bedeuten würde. Die restliche Flüssigkeit absaugen. Nun wird das Medium von einem Fläschchen zum anderen überführt, mit dem Ziel, so wenig wie möglich zu verdünnen. Danach alle Fläschchen ein zweites Mal abschaben. Das Medium wieder überführen. Nun werden die Fläschchen zweimalig mit dem abgesaugten Medium aus Fläschchen vier gespült, dabei die Fläschchen nur leicht schütteln und absaugen. Das Medium dazu wie beim Schaben in das nächste Fläschchen überführen. Nun den Inhalt der Fläschchen eins bis drei vereinigen. Anschließend muss das so befüllte Fläschchen gut verschlossen und mittels Ultraschall (30s bei 80 Schlägen) werden nun die Zellen weiter aufschlossen. Dazu wurde der Ultraschall-Desintegrator Sonifer II W-250/W450 Classic der Firma G.Heinemann mit 20kHz Eingangsenergie verwendet. Den Inhalt des Fläschchens in 50ml Greiner-Röhrchen überführen. Da in den nächsten Schritten zentrifugiert werden muss, ist auf eine Gleichverteilung des Materials zu achten und es sind gegebenenfalls mehrere Röhrchen zu nutzen. Danach bei 3999g, drei Minuten bei 6°C zentrifugieren.

Für den sich nun anschließenden Arbeitsschritt, die Auftrennung des bis jetzt gewonnenen Zell-Simkanien-Gemischs mittels Ultrazentrifugation, hat sich die Verwendung einer

Schlauchpumpe (ismatec) bewährt. Mit ihr kann Flüssigkeit mit konstanter Geschwindigkeit von einem Gefäß in ein anderes überführt werden. Damit können Wirbelbildungen und somit Vermischungen einzelner Schichten untereinander minimiert werden.

Mit Hilfe der Schlauchpumpe wird der Überstand aus den Greiner-Röhrchen in ein Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) überführt. Die verbleibenden Zelltrümmer mit Lösung aus Fläschchen vier aufspülen und gut mischen. Anschließend erneut bei 3999g, drei Minuten bei 6°C zentrifugieren. Der Überstand muss erneut abgesaugt und in die Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) verteilt werden. Die Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) jetzt auf 24ml mit PBS auffüllen.

Zur Vorbereitung des nächsten Arbeitsganges muss eine Visitrast-Verdünnungsreihe angelegt werden. Das Visitrast (Röntgenkontrastmittel) dient in den nächsten Schritten als Trennmedium, durch die unterschiedlichen Konzentrationen lässt sich so ein Gradient aufbauen. Folgendes Schema eignet sich für die Anlage der Verdünnungsreihe:

Konzentration in %	Visitrastmenge in ml	PBS-Menge in ml	Gesamtmenge in ml
8	1,2	13,8	15
15	3,0	17,0	20
30	7,2	16,8	24
36	9,0	16,0	25
40	7,2	10,8	18
47	6,4	7,4	13,8

Tabelle 1: Schema zur Anlage einer Visitrast-Verdünnungsreihe

Erste Zentrifugation:

Die Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) nach Schema mit 8%, 15% und 30% Visitrastlösung unterschichten, dabei hilft das Verwenden der Schlauchpumpe Verwirbelungen zu vermeiden. Die Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) müssen komplett gefüllt sein, da es sonst bei der Ultrazentrifugation zu Verformungen kommt und sich die Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) nicht, ohne den Inhalt wieder zu verwirbeln, aus der Ultrazentrifuge entnehmen lassen. Jetzt werden die Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) mit Quick Charge (isotip) verschweißt. Anschließend eine Stunde bei 38000g (entspricht 17500 U/min) und 8°C zentrifugieren.

Die Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) nun vorsichtig aus der Zentrifuge entnehmen und aufschneiden. Die Flüssigkeit bis zum Grund absaugen, dabei den Bodensatz möglichst nicht

aufwirbeln. Im Folgenden den Rückstand mit 3ml PBS versetzen und gut aufmischen, dabei die Pipette am Boden aufsetzen, um die mechanische Einwirkung zu erhöhen.

Konzentration in %	1. Zentrifugation	2. Zentrifugation
8	2 ml	1 ml
15	3 ml	1 ml
30	5 ml	1 ml
36		12 ml
40		8 ml
47		5 ml

Tabelle 2: Schema für die erste und zweite Zentrifugation

Zweite Zentrifugation:

Zuerst werden die Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) auf 6ml aufgefüllt und in neue Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) überführt, nach Schema mit Visitrastlösung unterschichtet und verschweißt. Nun werden die Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) eine Stunde bei 19500U/min und 10°C zentrifugiert. Jetzt die Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) wieder vorsichtig entnehmen und aufschneiden. Anschließend zwei Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) vorbereiten, um die gleich abzusaugenden Retikularkörperchen und Elementarkörperchen getrennt aufzufangen. Den obersten Gradienten absaugen. Das Absaugen kann einmal von oben her oder vom Boden des Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) durchgeführt werden, wobei sich das Absaugen vom Boden aus als einfacher herausgestellt hat. Besondere Vorsicht ist dabei jedoch beim Eintauchen der Absaugpipetten angebracht, um beim Durchstoßen der Schichten so wenig wie möglich zu vermischen. Nun unter Sichtkontrolle die unterste Schicht absaugen. In der nächsten Schicht sollten sich die Elementarkörperchen befinden. Diese müssen nun in das dafür vorgesehene Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) überführt werden. Danach unter Sichtkontrolle weitere Schichten absaugen, bis die Retikularkörperchen den Grund erreicht haben. Diese in das vorbereitete Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) absaugen. Abschließend beide Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) mit PBS auffüllen.

Dritte Zentrifugation:

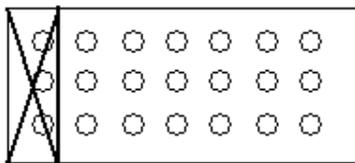
In diesem Schritt soll das noch in den Röhrchen verbliebene Visitrast entfernt werden, dafür die Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) 50min bei 15000U/min und 4°C zentrifugieren, den Überstand entfernen und das Sediment in 2 ml PBS aufnehmen und vermischen.

Die Retikularkörperchen- und Elementarkörperchenlösungen können nun beliebig portioniert und eingefroren werden.

3.2.2 Herstellung der Objektträger

In diesem Arbeitsgang wird das Antigen (die aufbereiteten Elementar- und Retikularkörperchen) auf maskierte Objektträger aufgebracht und fixiert. Die verwendete Maske besitzt drei mal sieben Felder, von denen aber nur drei mal sechs benötigt werden. Pro Feld soll $1\mu\text{l}$ Antigenlösung aufgetragen werden. Diese Antigenlösung setzt sich aus der Elementar- und Retikularkörperchenlösung und einer 3%igen Dottersackverdünnung zusammen. Die Dottersackverdünnung hat dabei die Funktion eines Bindemittels und soll das Antigen am Objektträger festkleben. Die Antigenmenge auf dem Objektträger sollte etwa $1\mu\text{g}$ betragen. Die Mischungsvolumina sind abhängig von der Antigenkonzentration in der Elementarkörperchenlösung sowie der gewünschten Anzahl an herzustellenden Objektträgern. Die Konzentration an Antigen in der Elementar- und Retikularkörperchenlösung nach der Aufbereitung betrug $3,6 \times 10^8 \text{IFU/ml}$. Das entspricht $0,91 \text{mg}$ Antigenmaterial pro Milliliter.

Das folgende Beispiel zeigt die Mischungsvolumina für die Herstellung von 100 Objektträgern bei einer Antigenkonzentration von $0,91 \text{mg/ml}$.



18 Felder pro Objektträger
 pro Feld $1\mu\text{l}$
 pro Objektträger $\approx 20\mu\text{l}$
 pro Objektträger $1\mu\text{g}$ Antigen
 pro Feld $0,05\mu\text{g}/\mu\text{l}$ d.h. $0,05\mu\text{g}$

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Objektträgers

Bei 100 Objektträgern sind also $1800 \text{Felder} + 20\% \text{Sicherheitsmenge durch Pipettierverlust}$ zu kalkulieren, das entspricht circa $2200 \text{Feldern} = 2200\mu\text{l}$.

Bei unserer Antigenkonzentration von $0,91 \text{mg/ml} = 0,91\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sind das $2002\mu\text{g} / 2200\mu\text{l}$. Dies gilt es auf $0,05\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zu verdünnen.

Für 2200 Felder sind das also $0,05\mu\text{g} * 2200 = 110\mu\text{g}$. Die benötigte Antigenmenge (AG) wäre dann $110\mu\text{g} / 0,91\mu\text{g}/\mu\text{l} \approx 121\mu\text{l}$.

Berechnung der 3%igen Dottersackverdünnung (DSV):

$$\begin{aligned} 3 / 100 &= x / 2200 \mu\text{l} \\ x &= 66\mu\text{l} \end{aligned}$$

$$2200\mu\text{l DSV} = 66\mu\text{l DS} + 2134\mu\text{l PBS}$$

Die Antigenlösung (AG + DSV) setzt sich damit aus $121\mu\text{l AG} + 2079\mu\text{l DSV}$ zusammen.

Im ersten Schritt müssen Dottersack und Elementarkörperchenlösung aufgetaut und mit dem Vortexer bearbeitet werden. Nun die Antigenlösung je nach gewünschter Objektträgermenge vorbereiten, dazu die Antigenlösung noch einmal gut vortexen.

Anschließend wird jeweils $1\mu\text{l}$ Lösung pro Feld auf den Objektträger aufgetragen. Multipipetten haben sich dabei als schlechte Wahl erwiesen, da das Antigen dabei in der Lösung zu schnell absinkt, was zu einer schlechten Antigenverteilung auf den Objektträger mit Antigenhaufenbildung führt. Günstig ist es, nach jedem Objektträger die Antigenlösung erneut mit dem Vortexer zu bearbeiten, um optimale Verteilung zu erreichen. Jetzt die Objektträger eine Stunde lang trocknen lassen. Danach werden die trockenen Objektträger in Fixationsständer einsortiert und in Fixationsgläser gestellt. Die Objektträger so mit Aceton übergießen, dass sie komplett bedeckt sind. Die Gläser abdecken und die Objektträger 15min lang fixieren lassen. Zum Schluss werden die Objektträger entnommen und 15min lang getrocknet und zur Lagerung bei -30°C eingefroren.

3.2.3 Optimierung der Objektträger

Um gute Beurteilungsbedingungen unter dem Mikroskop zu erreichen, ist eine ideale Antigenverteilung wichtig. Proben mit Antigenanhäufungen sind schwer zu beurteilen, da sich hier auch unspezifische Fluoreszenzen bilden. Es wurden daher Objektträger mit $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $1,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Antigenkonzentrationen hergestellt und mit fünf verschiedenen Humanseren zur Mikroskopie aufbereitet. Ergebnisse siehe 4.2.1.

3.2.4 IFT

3.2.4.1 Probenvorbereitung

In diesem Arbeitsgang wird das zu untersuchende Serum auf die präparierten Objektträger aufgebracht und für die Mikroskopie vorbereitet.

Zuerst müssen die Objektträger, die Serumproben und das Kontroll-Kaninchenserum aufgetaut werden. Die Serumproben und das Kaninchenserum gut vortexen. Als nächstes wird eine Verdünnungsreihe angelegt.

Für die Verdünnungsreihe wurden Mikrotiterplatten verwendet. Vor Arbeitsbeginn sollten die Platten und die Objektträger gut beschriftet werden. Nun mit einer Multikanalpipette (8er) je 10µl PBS vorgeben. Durch leichtes Klopfen der Platten können die Tropfen zum Absinken bewegt und anschließend visuell der Erfolg der Pipettierung kontrolliert werden. Nun jeweils 10µl Serum in den ersten Slot zugeben, PBS und Serum gut mischen, dazu zwei- bis dreimal auf und ab pipettieren. Danach werden 10µl der Verdünnung in den nächsten Slot überführt und erneut gut gemischt. Diese Prozedur bis zum sechsten Slot fortführen. Auf die gleiche Weise mit den anderen zu untersuchenden Seren verfahren. Das Kaninchenserum muss extra behandelt werden, da hier eine andere Verdünnung (siehe Schema) gewünscht ist.

	Serumproben	Kaninchenserum	
1	1 : 2	1 : 100	
2	1 : 4	1 : 200	
3	1 : 8	1 : 400	
4	1 : 16	1 : 800	
5	1 : 32	1 : 1000	gesondert!
6	1 : 64	1 : 1600	

Tabelle 3: Verdünnungsschema

3.2.4.2 Inkubation

Von den verdünnten Seren 10µl pro Feld auf die Objektträger auftragen. Die Objektträger in eine feuchte Kammer stellen und eine Stunde bei 37 °C inkubieren lassen. Nach der Inkubationszeit werden die Objektträger entnommen und nach dem folgenden Schema gewaschen:

Waschen:

Dazu werden die Objektträger in PBS gespült und in einen Glasständer gestellt. Den Glasständer mit PBS auffüllen und fünf Minuten auf einer Schwenkplatte stehen lassen. Jetzt das PBS wechseln und erneut fünf Minuten auf der Schwenkplatte stehen lassen. Nun die Objektträger in Aqua dest. spülen und gut abtropfen lassen. In Zugluft (zum Beispiel: Luftabzugshaube) 15min trocknen lassen. Die Objektträger müssen absolut trocken sein, da sonst im nächsten Schritt das Antiserum verläuft.

Nach Abschluss des Trockenvorgangs werden auf jedes Feld je 10µl Anti-Human-Biognost IgG-FITC-Konjugat aufgetragen. Für das Kaninchenserum ist Fluorescein(FITC)-conjugated-affinipure-Goat-Anti-Rabbit-IgG (H+L) zu verwenden. Erneut eine Stunde bei 37°C inkubieren. Nach der Inkubation wieder waschen, jedoch diesmal nur abtropfen lassen. Für den nächsten Schritt ist es nicht nötig, dass die Objektträger vollständig trocken sind. Im letzten Arbeitsgang werden zwei Tropfen r-biopharm-RIDA-Fluor-Eindeckmedium in die Mitte jedes Objektträgers gegeben und diese danach mit Deckgläschen versehen. Die Objektträger können nun mikroskopiert werden.

3.2.4.3 Mikroskopie

Die Mikroskopie der Objektträger sollte unmittelbar erfolgen, da mit fortschreitender Zeit, der Fluoreszenzfarbstoff an Intensität verliert. Eine lichtgeschützte Lagerung der Objektträger hat sich dabei bewährt. Zur Verbesserung der Brechungseigenschaften wurde zum Mikroskopieren je ein Tropfen Immersionsöl auf die Objektträger gegeben. Die Anregung der Proben erfolgte mit einer Wellenlänge von 492nm. Dadurch wird eine grüne Fluoreszenz mit einem Emmisionsmaximum bei 517nm erreicht. Es wurden jeweils alle sechs Verdünnungsstufen in 100-facher Vergrößerung beurteilt.

3.2.4.3.1 Beurteilungskriterien

Da am Institut keine Erfahrung in der Beurteilung von *S. negevensis* mittels IFT vorhanden war, orientierte ich mich an den am Institut für *C. pneumoniae* üblichen Bewertungskriterien. Zuerst wurde der Objektträger nach gut zu beurteilenden Arealen abgesucht. Solche Areale zeichnen sich durch eine gute Antigenverteilung aus, wobei die Elementar- und Retikularkörperchen möglichst gleichmäßig verteilt und einschichtig vorliegen. Antigenanhäufungen sind äußerst ungünstig, da sich hier eine starke Hintergrundfluoreszenz bilden kann, wodurch eine Bewertung kaum möglich ist. Als nächstes werden Spezifität und Brillanz/Intensität der Fluoreszenz beurteilt. Mit Spezifität ist hierbei gemeint, dass nur Elementar- und Retikularkörperchen markiert erscheinen. Proben, bei denen der Dottersack oder Zellreste Fluoreszenz aufwiesen, wurden als unspezifisch deklariert, da hier von Interaktionen mit dem Hühnereiweiß oder mit den zur Anzucht verwendeten Zellen auszugehen war. Die Beurteilung der Brillanz stellte zu Beginn ein Problem dar, da nicht klar war, in welchem Maße sie bei *S. negevensis* ausfallen würde und keine positiven Humansenen zur Verfügung standen. Als Referenz diente hyperimmunisiertes Kaninchenserum. Pro Probe ist diese Beurteilung für jede Verdünnungsstufe durchgeführt worden. Für ein positives Testergebnis war außerdem ein Fluoreszenzabfall mit zunehmender Verdünnung Voraussetzung.

3.2.4.3.2 Positivkontrollen

Zur Orientierung und sicheren Bewertung der IFT ist es üblich, Positiv- und Negativkontrollen mitzuführen. Da sich schon nach den ersten Versuchsreihen eine sehr niedrige Prävalenz vermuteten ließ und keine sicher negativen Seren zur Verfügung standen, haben wir uns auf das Mitführen von Positivkontrollen beschränkt.

Am Institut für Medizinische Mikrobiologie der FSU-Jena waren im Rahmen früherer Arbeiten bereits Kaninchen mit *S. negevensis* hyperimmunisiert worden, sodass hyperimmunisiertes Kaninchenserum als Positivkontrolle zur Verfügung stand.

3.2.4.3.3 Festlegung Cut-off-Wert

Der Cut-off-Wert beschreibt, bis zu welcher Verdünnung eine Probe als positiv bewertet sein muss, um insgesamt als positiv zu gelten. Dieser Wert ist abhängig von der Fragestellung und der bestimmten Antikörperfraktion. Für *S. negevensis* gibt es keinen gültigen Referenzwert. In der Untersuchung von Yamaguchi et al. 2005 wurde für die IgG-Bestimmung einer zurückliegenden Infektion mit *Simkania negevensis* ein Wert von 1:8 genutzt (Yamaguchi et al. 2005). In Anlehnung daran wurde für diese Studie ebenfalls ein Cut-off-Wert von mindestens 1:8 festgelegt.

3.2.5 Datenverarbeitung

Die Untersuchungsergebnisse wurden mittels OpenOffice.org 3.0.1 Writer und OpenOffice.org 3.0.1 Calculator der Firma Sun Microsystems Inc. 2000-2008 erfasst und ausgewertet. Dabei wurden bei den CAPNETZ-Proben Serumnummer, PCR-Ergebnis, Ursprungsort, Pseudonymnummer, Titer und Besonderheiten dokumentiert. Bei den Proben des Universitätsklinikums Jena wurden Probennummer, Verdachtsdiagnose, Auftragsdatum, Titer und Bemerkungen festgehalten.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der Methoden

3.1.1 Zellkultur und Antigenpräparation

Sowohl Zellkultur als auch die Antigenpräparation waren als Methode bereits am Institut für Medizinische Mikrobiologie der FSU-Jena aufgrund früherer Arbeiten zu *Simkania negevensis* etabliert.

3.1.2 IFT

Die Anpassung und Anwendung der Methode an *S. negevensis* war problemlos möglich. Die Objektträger konnten mit Hilfe verschiedener Antigenkonzentrationen für *S. negevensis* angepasst werden. Zur Verbesserung der Fluoreszenz wurden Versuchsreihen mit 5µl sowie 10µl Anti-Human-Biognost-IgG-FITC-Konjugat durchgeführt. Nach Optimierung der Technik konnten bis zu 32 Proben in einem Durchgang untersucht werden.

3.1.2.1 Optimierung der Objektträger

Es wurden Objektträger mit 1µg/µl, 1,5µg/µl und 2µg/µl Antigenkonzentrationen hergestellt und mit fünf verschiedenen Humanseren zur Mikroskopie aufbereitet. Beurteilt wurde die Qualität der Antigenverteilung. Optimale Beurteilungsbedingungen fanden sich bei 1µg/µl Antigenkonzentration. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Probennummer	Antigenkonzentration in µg		
	1	1,5	2
1059	negativ	negativ bis 2	negativ bis 2
1052	16 bis 32	16	8 bis 16
1195	8 bis 16	4 bis 8	4 bis 8
1193	8 bis 16	16	8 bis 16
1203	unspezifisch	unspezifisch	unspezifisch

Tabelle 4: Bestimmung der optimalen Antigenkonzentration. Aufgetragen sind die gemessenen Antikörpertiter der jeweiligen Proben bei verschiedenen Antigenkonzentrationen.

Bei zunehmender Antigenkonzentration nahm die Hintergrundfluoreszenz zu und erschwerte die exakte Beurteilung.

3.1.2.2 Optimierung der Fluoreszenzeigenschaften

Zur Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften der Proben wurden zwei Versuchsdurchgänge je mit 5µl und 10µl Anti-Human-Biognost-IgG-FITC-Konjugat durchgeführt. Ausschlaggebend für die Beurteilung war die Fluoreszenz des Serums 1088.

Im Versuchsdurchgang mit 10µl wurde bei sehr guter Brillanz ein Titer von 1:16 bestimmt. Im Durchgang mit 5µl lag der bestimmte Titer zwischen 1:8 und 1:16 bei deutlich schwächerer Brillanz. Es wurde für die weiteren Versuchsdurchführungen eine Anti-Human-Biognost-IgG-FITC-Konjugat-Menge von 10µl festgelegt.

3.1.2.3 Beurteilungskriterien

Da aufgrund fehlender Untersuchungserfahrungen nicht bekannt war, wie sich eine Simkania negevensis positive Probe im IFT verhält, wurden die Proben anhand der bis dahin gefundenen positiven Humansenen bewertet. Referenz blieb das Kaninchenserum, welches jedoch in seinen Fluoreszenzeigenschaften und vor allem seiner Brillanz deutlich stärker war, als die gefundenen Humansenen. Innerhalb der ersten 100 getesteten Proben wurden mit den Seren 1088 und 1222 zwei Seren gefunden, die dem Kaninchenserum in diesen Eigenschaften glichen. Dadurch standen zwei positive Humansenen als Referenz zur Verfügung. Die bis dahin als positiv bewerteten Proben wurden erneut getestet und evaluiert.

3.1.2.4 Positivkontrollen

Als Positivkontrolle wurde das Serum eines hyperimmunisierten Kaninchens verwendet. Das Kaninchenserum wies eine außerordentliche Brillanz auf, d.h. es zeigte eine intensive neongrüne Fluoreszenz. Die Intensität nahm mit jeder Verdünnungsstufe bis 1:400 leicht und dann deutlich ab. Es wurde ein Titer von 1:400 festgelegt. Nur bei Feststellung eines Titers der Positivkontrolle von 1:400 bis 1:800 wurde der Versuchsdurchlauf ausgewertet, andernfalls wiederholt. Später wurden die Proben 1088 und 1222 ebenfalls in jedem Versuchsdurchgang als Positivkontrolle mitgeführt. Beide Proben wiesen einen Titer zwischen 1:8 und 1:16 auf. Probe 1088 wurde insgesamt 28-mal untersucht, Probe 1222 insgesamt 24-mal. Tabelle 5 zeigt die Häufigkeit der festgestellten Titer.

	Titer 1:4	Titer 1:8	Titer 1:16
Probe 1088	-	21	7
Probe 1222	1	16	7

Tabelle 5: Titer der Positivkontrollen

Um nicht für jeden Durchgang das Serum erneut auftauen und wieder tiefrieren zu müssen, wurden die Seren portioniert, während einer Messreihe aufgetaut und einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Bei Titerabfall wie bei Probe 1222 auf 1:4 wurde neues Material aufgetaut. Die gemessenen Titer waren dann wieder zwischen 1:8 und 1:16. Die Brillanz war bei frisch aufgetautem Material stets am besten.

3.2 Simkania negevensis in klinischen Materialien

3.2.1 Untersuchung der CAPNETZ-Proben

Von den 401 Proben wiesen 20 (4,99%) unspezifische Fluoreszenz auf. Bei elf (2,74%) Proben konnte ein Titer >2 bestimmt werden. Davon einmal ein Titer von 1:32 (0,25%), zweimal ein Titer von 1:16 (0,50%), viermal ein Titer von 1:8 (1,00%) und viermal ein Titer von 1:4 (1,00%). Bei einem Cut-off-Wert von 1:8 sind demnach sieben von 401 Proben (1,75%) als positiv zu werten.

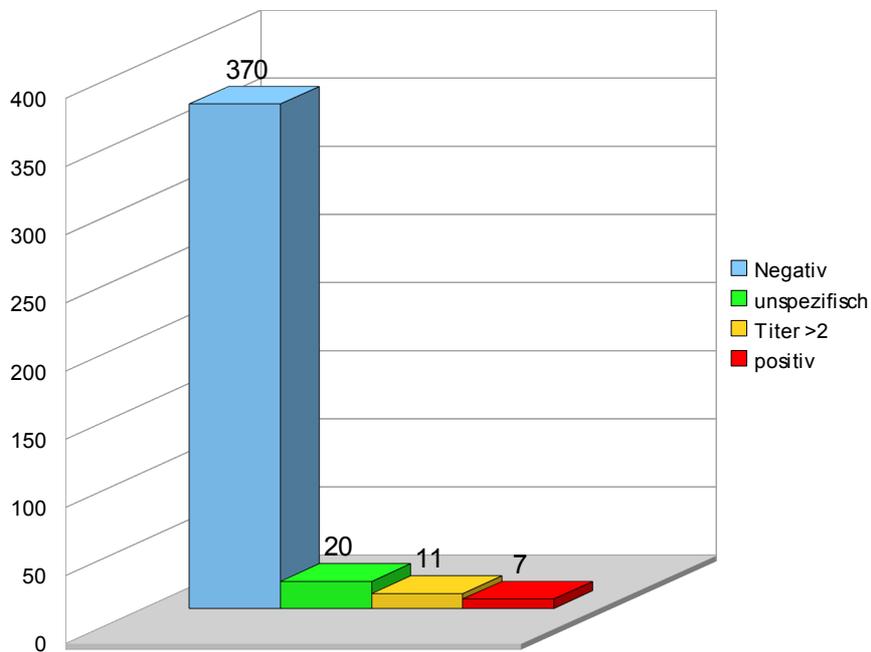


Abbildung 3: Das Diagramm zeigt die jeweilige absolute Menge von gefundenen negativen und unspezifischen Proben, Proben mit Titer>2 und positiven Proben.

Nur bei einer der gefundenen positiven Proben war die PCR auf Simkania im Rachenspülwasser ebenfalls positiv.

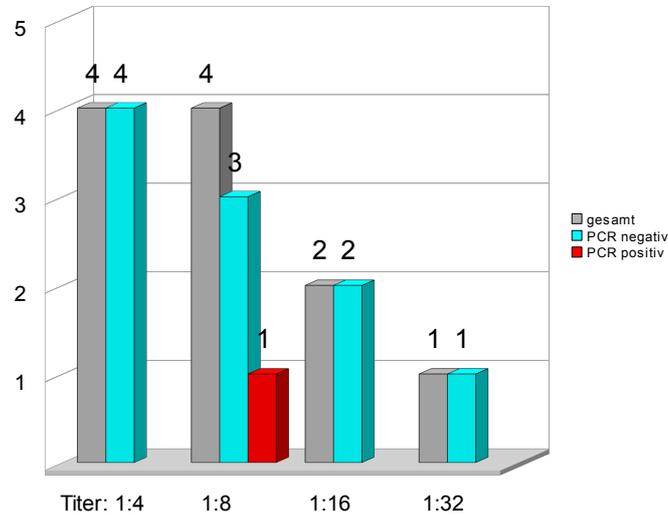


Abbildung 4: Das Diagramm zeigt die Verteilung der Proben mit Titer > 2 und ihre jeweiligen PCR Ergebnisse.

Von den untersuchten Seren waren 372 (92,77%) in der PCR negativ und 29 (7,23%) positiv.

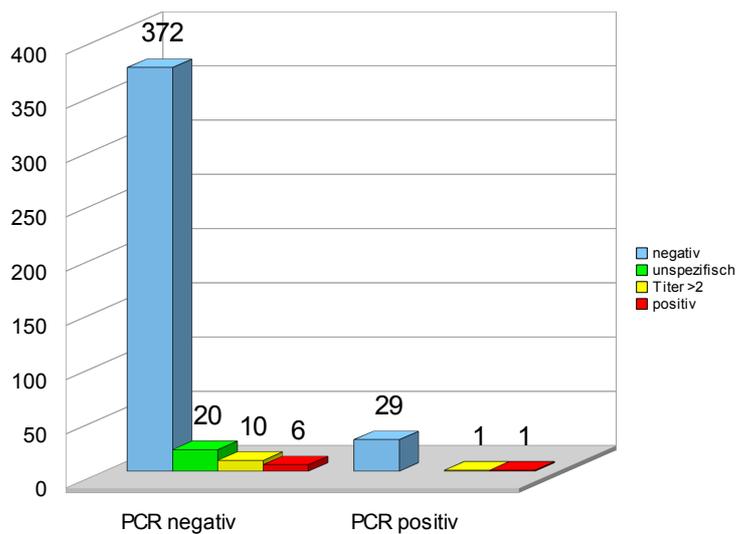


Abbildung 5: Das Diagramm zeigt die Verteilung der negativen und unspezifischen Proben, der Proben mit Titer > 2 und der positiven Proben in Bezug auf ihr PCR-Ergebnis.

3.2.1.1 Proben aus Berlin

Von den 71 untersuchten Seren konnte bei zwei (2,82%) Seren ein Titer festgestellt werden. Je einmal 1:4 und 1:8 (jeweils 1,41%). Die Probe mit dem Titer 1:8 war auch in der PCR positiv.

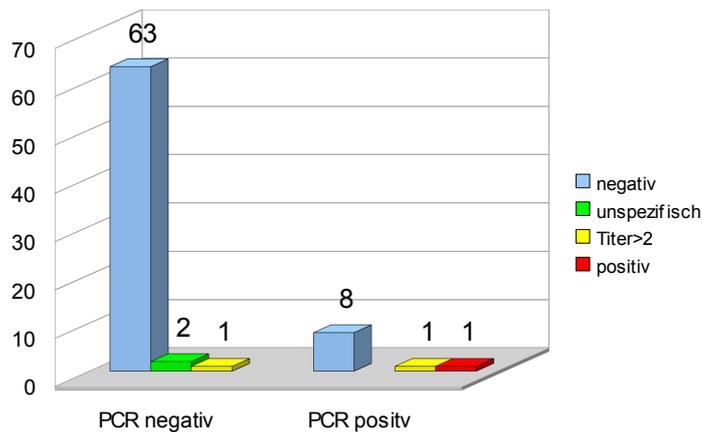


Abbildung 6: Das Diagramm zeigt die Verteilung der negativen und unspezifischen Proben, der Proben mit Titer>2 und der positiven Proben in Bezug auf ihr PCR-Ergebnis für Berlin.

3.2.1.2 Proben aus Bochum

Von den 20 untersuchten Seren konnte bei zwei Seren (10%) ein Titer festgestellt werden. Je einmal 1:8 und 1:32 (jeweils 5%). Es wurden in der PCR keine positiven Proben gefunden. Abbildung 7 fasst die Ergebnisse zusammen.

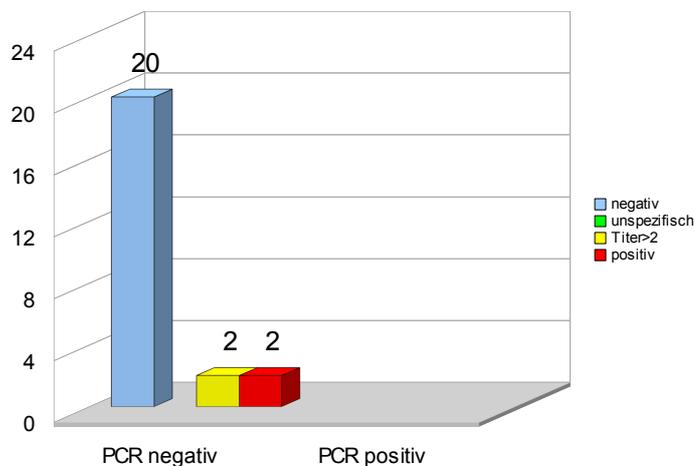


Abbildung 7: Das Diagramm zeigt die Verteilung der negativen und unspezifischen Proben, der Proben mit Titer>2 und der positiven Proben in Bezug auf ihr PCR-Ergebnis für Bochum.

3.2.1.3 Proben aus Köln/Köln-Bonn

Bei keiner der 20 Serumproben konnte ein Titer nachgewiesen werden. Eine Probe zeigte unspezifische Fluoreszenz (5%). Abbildung 8 fasst die Ergebnisse zusammen.

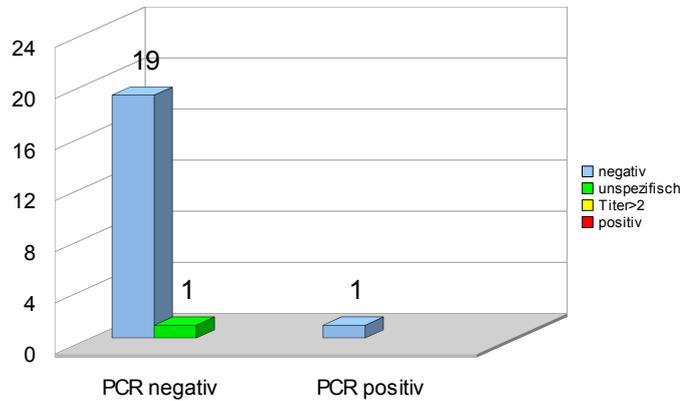


Abbildung 8: Das Diagramm zeigt die Verteilung der negativen und unspezifischen Proben, der Proben mit Titer>2 und der positiven Proben in Bezug auf ihr PCR-Ergebnis für Köln/Köln-Bonn.

3.2.1.4 Proben aus Lübeck

Von den 89 untersuchten Seren konnte bei einer Probe (1,12%) ein Titer von 1:4 festgestellt werden. Die Probe war in der PCR negativ. Vier Proben (4,49%) wiesen unspezifische Fluoreszenz auf.

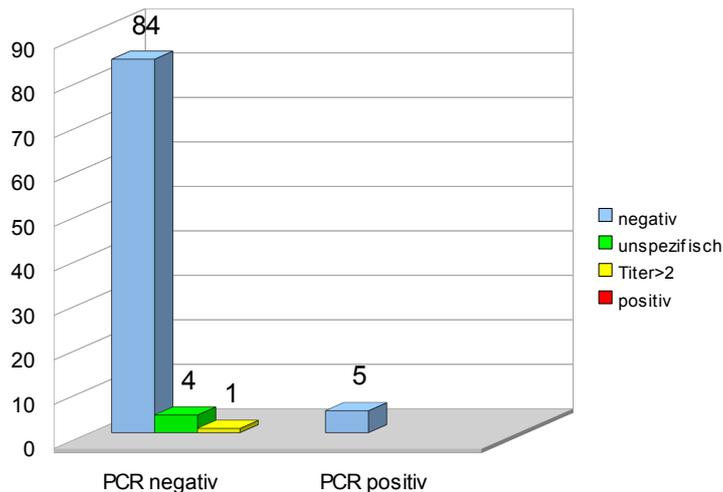


Abbildung 9: Das Diagramm zeigt die Verteilung der negativen und unspezifischen Proben, der Proben mit Titer>2 und der positiven Proben in Bezug auf ihr PCR-Ergebnis für Lübeck.

3.2.1.5 Proben aus Lüdenscheid

Bei keinem der 35 untersuchten Seren konnte ein Titer festgestellt werden. Zwei Proben (5,71%) wiesen unspezifische Fluoreszenz auf. Abbildung 10 fasst die Ergebnisse zusammen.

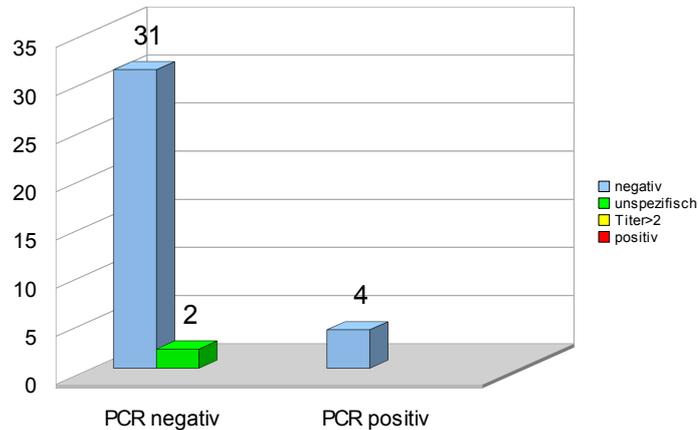


Abbildung 10: Das Diagramm zeigt die Verteilung der negativen und unspezifischen Proben, der Proben mit Titer>2 und der positiven Proben in Bezug auf ihr PCR-Ergebnis für Lüdenscheid.

3.2.1.6 Proben aus Magdeburg

Von den 75 untersuchten Seren konnte bei vier Seren (5,33%) ein Titer festgestellt werden. Je einmal 1:4 (1,33%) und 1:8 (1,33%) und zweimal 1:16 (2,66%). Drei Proben (4%) zeigten unspezifische Fluoreszenz.

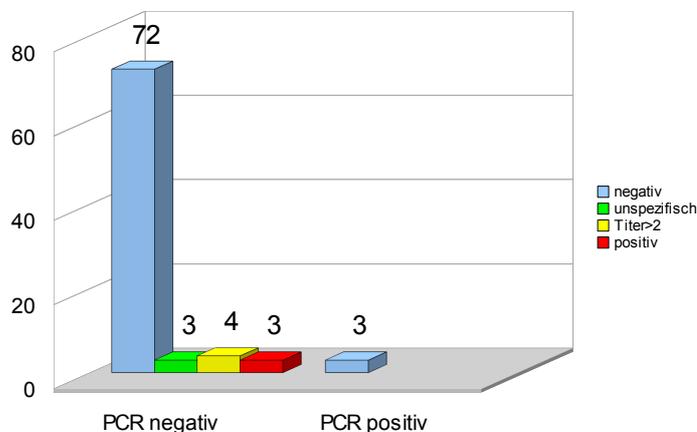


Abbildung 11: Das Diagramm zeigt die Verteilung der negativen und unspezifischen Proben, der Proben mit Titer>2 und der positiven Proben in Bezug auf ihr PCR-Ergebnis für Magdeburg.

3.2.1.7 Proben aus Rotenburg

Von den 49 untersuchten Seren konnte bei einer Probe (2,04%) ein Titer von 1:4 festgestellt werden. Fünf Seren (10,20%) wiesen unspezifische Fluoreszenz auf. Abbildung 12 fasst die Ergebnisse zusammen.

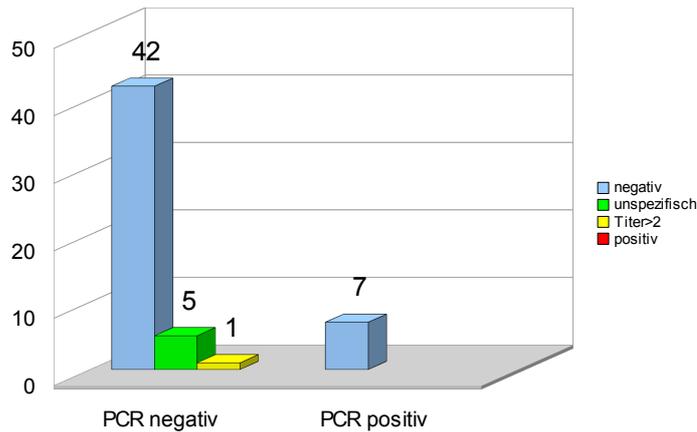


Abbildung 12: Das Diagramm zeigt die Verteilung der negativen und unspezifischen Proben, der Proben mit Titer>2 und der positiven Proben in Bezug auf ihr PCR-Ergebnis für Rotenburg.

3.2.1.8 Proben aus Ulm

Von den 31 untersuchten Seren wurde einmal ein Titer von 1:8 erhoben (3,23%). Die Probe war in der PCR negativ. Eine Probe (3,23%) zeigte unspezifische Fluoreszenz.

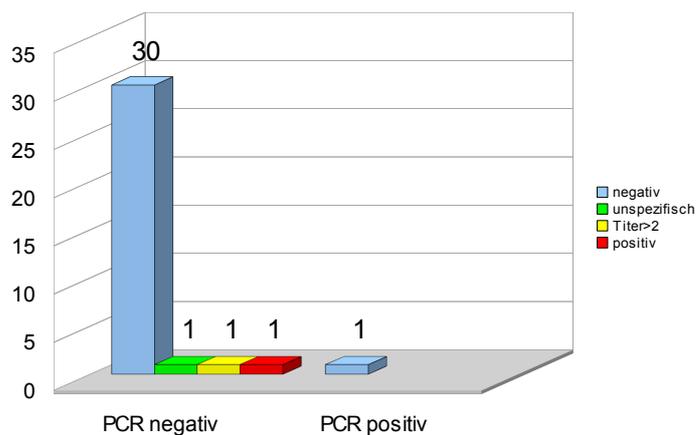


Abbildung 13: Das Diagramm zeigt die Verteilung der negativen und unspezifischen Proben, der Proben mit Titer>2 und der positiven Proben in Bezug auf ihr PCR-Ergebnis für Ulm.

3.2.1.9 Proben aus Würzburg

Alle vier untersuchten Seren wurden mit dem IFT als negativ getestet.

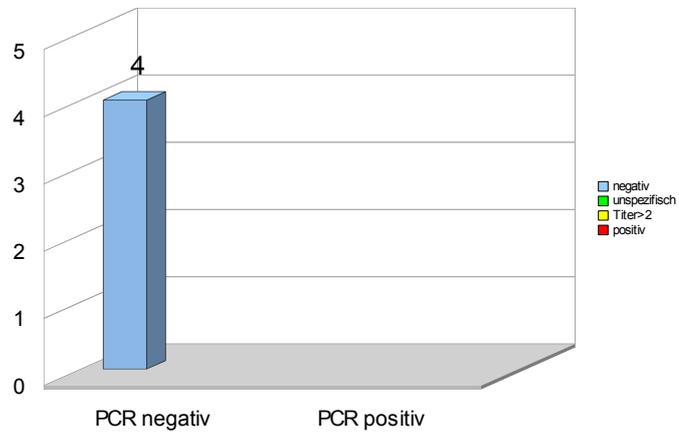


Abbildung 14: Das Diagramm zeigt die Verteilung der negativer und unspezifischer Proben, der Proben mit Titer>2 und der positiven Proben in Bezug auf ihr PCR-Ergebnis für Würzburg.

3.2.1.10 Zusammenfassung Verteilung nach Städten

Die höchste Prävalenz mit 10% konnte in Bochum festgestellt werden. Gefolgt von Magdeburg mit 4% und Ulm 3,23%. In Berlin konnte ein Wert von 1,41% ermittelt werden. In den Städten Köln/Köln-Bonn, Lübeck, Lüdenscheid, Rotenburg und Würzburg konnten keine positiven Seren nachgewiesen werden. Der Mittelwert an positiven Proben liegt bei 2,07%, für unspezifische Fluoreszenz bei 3,94%.

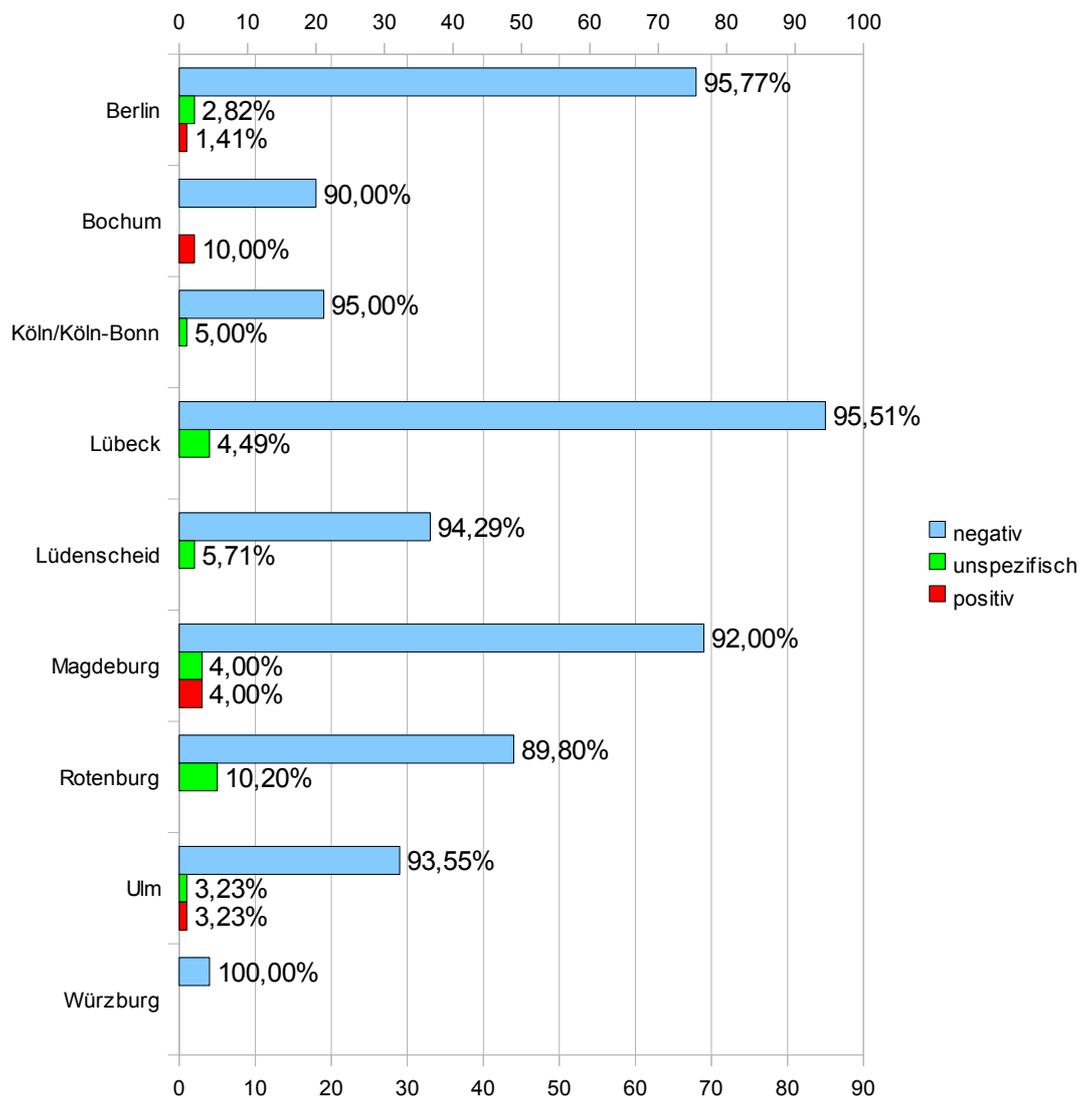


Abbildung 15: Das Diagramm zeigt die prozentuale Verteilung negativer, unspezifischer und positiver Proben für die untersuchten Städte.

3.2.1.11 Einzelfallbetrachtung

In diesem Abschnitt werden alle mittels IFT positiv getesteten Proben genauer vorgestellt und den im CAPNETZ vorliegenden Untersuchungsergebnissen zugeordnet. Dargestellt werden einige Daten zur Anamnese der Patienten, soweit vorhanden, die Ergebnisse der klinisch chemischen Labordiagnostik und die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen. Da die Proben in verschiedenen Instituten aufgearbeitet wurden, sind für jede der Untersuchungen meist mehrere Ergebnisse vorhanden. Gleiche Laborergebnisse unterschiedlicher Institute wurden zusammengefasst. Für einige der Proben liegen neben der Chlamydienserologie auch Chlamydien-PCR und Fish-Untersuchungen vor. Diese zeigten aber keine anderen Resultate als die Serologie, weshalb sie nicht explizit aufgeführt werden. Die Legionellenkultur war für alle Patienten negativ.

3.2.1.11.1 Berlin

Die Probe mit der Pseudonymnummer 291-124-248 wurde von einer zum Zeitpunkt der Materialentnahme 60-jährigen Frau gewonnen. Sie war 161 cm groß und wog 85 kg, der BMI betrug 32,8.

Die Patientin erfüllte neben den geforderten Haupteinschlusskriterien folgende Nebenbedingungen: Sie litt unter Husten und wies einen positiven Auskultationsbefund der Lunge auf. Sie litt außerdem unter Dyspnoe und Pleuraschmerzen.

In der Anamnese wurden eine chronische Atemwegserkrankung, eine chronische Herzerkrankung sowie Diabetes mellitus erfasst. Ein Zigarettenkonsum von 60py ist bekannt. In der radiologischen Diagnostik war im Röntgenthorax neben dem Infiltrat auch ein Pleuraerguss auffällig.

Es wurde ein kleines Blutbild bestimmt, welches sich mit Leukozyten: $6.9 \times 10^3/\mu\text{l}$, Hämoglobin: 7.5762mmol/l, Hämatokrit: 40%, Thrombozyten: $240 \times 10^3/\mu\text{l}$ unauffällig zeigte. Das CRP war mit 99mg/l erhöht.

Die mikrobiologische Diagnostik konnte eine Infektion mit *M. pneumoniae* nachweisen. Im Sputum wurde kein Erreger gefunden. Die Leukozyten betrugten weniger als zehn pro Gesichtsfeld ebenso wie die Epithelien. Sowohl Pneumokokken-Antigen als auch Legionellen-Antigen im Urin waren negativ. Die Chlamydienserologie (MIF und ELISA) ergab keinen Anhalt auf aktuelle oder frühere Infektion. Die Untersuchungen auf Influenza-, RS-, Adeno- und Enteroviren waren negativ.

Sowohl Simkania PCR als auch IFT waren positiv. Es wurde ein Titer von 1:8 bestimmt.

Es erfolgte eine antibiotische Therapie mit einem Cephalosporine der dritten Generation i.v. in Kombination mit Clarithromycin oral. Zum Verlauf sind keine Daten hinterlegt, da der Einschluss anonym erfolgte.

3.2.1.11.2 Bochum

Die zwei positiven Proben aus Bochum haben die Pseudonymnummern 611-948-304 und 655-143-854.

Die Probe mit der Pseudonymnummer 611-948-304 wurde von einem zum Zeitpunkt der Materialentnahme 56-jährigen Mann gewonnen. Er war 165 cm groß und wog 60 kg, der BMI betrug 22.

Der Patient erfüllte neben den geforderten Hauptbedingungen folgende Nebenbedingungen: Er litt unter Husten und Fieber. Zur weiteren Klinik wurden keine Angaben vermerkt.

In der Anamnese wurde eine chronische Atemwegserkrankung erfasst.

Die radiologische Diagnostik zeigte im Röntgenthorax ein Infiltrat. Ein Erguss wurde nicht gesehen.

Es wurde ein kleines Blutbild bestimmt, welches eine erhöhte Thrombozytenzahl von $791 \times 10^3/\mu\text{l}$ aufwies. Leukozyten: $9.1 \times 10^3/\mu\text{l}$, Hämoglobin: 8.3214mmol/l und Hämatokrit: 40% waren unauffällig. Im Differentialblutbild zeigten sich 59% Segmentkernige Granulozyten, 7% Monozyten und 22% Lymphozyten. Das CRP war mit 23.7mg/l leicht erhöht.

Die mikrobiologische Diagnostik der respiratorischen Proben, des Serums und der Urinproben konnte keinen Erreger nachweisen.

Die Sputumdiagnostik ergab Leukozyten von mehr als 25 pro Gesichtsfeld, ebenso wie die Epithelien. Sowohl Pneumokokken-Antigen als auch Legionellen-Antigen konnten im Urin nicht nachgewiesen werden. Die Chlamydienserologie (MIF und ELISA) ergab keinen Anhalt auf aktuelle Infektion. Im ELISA gab es Hinweise auf eine länger zurückliegende Infektion mit *Chlamydia pneumoniae*. Die Untersuchungen auf Influenza-, RS-, Adeno- und Enteroviren waren negativ.

Die Simkania-IFT ergab einen Titer von 1:8. Die PCR war negativ.

Es erfolgte eine antibiotische Therapie mit einem Aminopenicillin, welche über zehn Tage ambulant durchgeführt werden konnte. Der Patient zeigte unter der Therapie eine Besserung der Symptomatik.

Die Probe mit der Pseudonymnummer 655-143-854 wurde von einem zum Zeitpunkt der Materialentnahme 73-jährigen Mann gewonnen. Er war 181 cm groß und wog 100 kg, der BMI betrug demnach 30,5.

Der Patient erfüllte neben den geforderten Hauptbedingungen folgende Nebenbedingungen: Er litt unter Husten und wies neben purulentem Sputum außerdem einen positiven Auskultationsbefund der Lunge auf. Der Patient klagte über Dyspnoe.

In der Anamnese wurden eine Herzinsuffizienz und eine chronische Herzerkrankung erfasst. Beide Diagnosen wurden nicht näher spezifiziert.

In der radiologischen Diagnostik wurde im Röntgenthorax ein interstitielles, retikulonoduläres Infiltrat im Sektor 5 beschrieben. Es lag kein Erguss vor.

Es wurde ein kleines Blutbild bestimmt, in dem sich eine leicht erhöhte Leukozytenzahl von $12.6 \times 10^3/\mu\text{l}$ feststellen lies. Hämoglobin: 7.70mmol/l, Hämatokrit: 37% und Thrombozyten $188 \times 10^3/\mu\text{l}$ lagen im Normbereich. Das CRP war mit 36mg/l leicht erhöht.

Die mikrobiologische Diagnostik konnte eine Infektion mit Enterobacter spp. nachweisen. Der Erreger ließ sich im Sputum in einer Keimzahl von mehr als 10^5 nachweisen. Die Leukozyten betrugten zwischen zehn und 25 pro Gesichtsfeld, ebenso wie die Epithelien. Sowohl Pneumokokken-Antigen als auch Legionellen-Antigen im Urin waren negativ. Die Chlamydienserologie (MIF und ELISA) ergab Hinweise auf eine länger zurückliegende Infektion. Es gab keinen Anhalt auf eine aktuelle Infektion. Die Untersuchungen auf Influenza-, RS-, Adeno- und Enteroviren waren negativ.

Die Untersuchung auf *M. pneumoniae* mittels ELISA und Immunoblot ergab den Verdacht einer Infektion.

Die Simkania-IFT ergab einen Titer von 1:32.

Es erfolgte die stationäre Einweisung. Eine antibiotische Therapie mit einem Cephalosporin der zweiten Generation i.v. und Roxithromycin oral erfolgte über zehn Tage. Der Patient konnte nach elf Tagen aus der stationären Behandlung mit gebessertem Allgemeinbefinden entlassen werden.

3.2.1.11.3 Magdeburg

Die drei positiven Proben aus Magdeburg haben die Pseudonymnummern 416-242-429, 467-494-154 und 950-648-08X.

Die Probe mit der Pseudonymnummer 416-242-429 wurde von einem zum Zeitpunkt der Materialentnahme 63-jährigen Mann gewonnen. Er war 180 cm groß und wog 95 kg, der BMI betrug 29,3.

Der Patient erfüllte neben den geforderten Hauptbedingungen folgende Nebenbedingungen: Neben Husten konnte ein positiver Auskultationsbefund erhoben werden.

Klinisch war eine Dyspnoe auffällig.

Neben einer Raucheranamnese von 30py sind ein Tumorleiden, eine Lungenoperation 1993, eine chronische Atemwegserkrankung, eine chronische Herzerkrankung und ein Diabetes mellitus bekannt.

Die radiologische Diagnostik zeigte im Röntgenthorax ein Infiltrat. Ein Erguss wurde nicht vermerkt.

Es wurde ein kleines Blutbild bestimmt, welches eine leicht erhöhte Leukozytenzahl von $12.9 \times 10^3/\mu\text{l}$ aufwies. Die Thrombozyten: $318 \times 10^3/\mu\text{l}$, Hämoglobin: 7.07mmol/l und Hämatokrit mit 35% waren unauffällig.

Im Differentialblutbild zeigten sich 79% segmentkernige Granulozyten, 6% Monozyten und 14% Lymphozyten. Das CRP war mit 61.1 mg/l erhöht.

Die mikrobiologische Diagnostik konnte keinen Erreger nachweisen.

Es wurde kein Sputum gewonnen. Sowohl Pneumokokken-Antigen als auch Legionellen-Antigen im Urin waren negativ. Die Chlamydienserologie (MIF und ELISA) ergab Hinweise auf eine länger zurückliegende Infektion. Es gab keinen Anhalt auf eine aktuelle Infektion. Die M. pneumoniae Diagnostik ergab keinen Anhalt auf eine Infektion. Die Untersuchungen auf Influenza-, RS-, Adeno- und Enteroviren waren negativ.

Die Simkania-IFT ergab einen Titer von 1:8. Die PCR war negativ.

Der Patient wurde stationär eingewiesen. Es erfolgte eine antibiotische Therapie mit Cephalosporinen der dritten Generation i.v. über 14 Tage. Es konnte eine Besserung der Symptomatik erreicht werden.

Die Probe mit der Pseudonymnummer 467-494-154 wurde von einem zum Zeitpunkt der Materialentnahme 33-jährigen Mann gewonnen. Er war 187 cm groß und wog 80 kg, der BMI betrug 22,9.

Der Patient erfüllte neben den geforderten Hauptbedingungen folgende Nebenbedingungen: Husten, purulentes Sputum, ein positiver Auskultationsbefund und Fieber.

Zur weiteren Klinik wurden keinen Angaben vermerkt.

Neben einer Raucheranamnese von 20py sind eine chronische Lebererkrankung sowie eine nicht näher bezeichnete chronische neurologische Erkrankung bekannt.

Die radiologische Diagnostik zeigte im Röntgenthorax ein Infiltrat. Ein Erguss wurde nicht gesehen.

Es wurde ein kleines Blutbild bestimmt, welches mit Leukozyten: $5.8 \times 10^3/\mu\text{l}$,

Hämoglobin: 7.9mmol/l, Hämatokrit: 37% und Thrombozyten: $554 \times 10^3/\mu\text{l}$ unauffällig war.

Im Differentialblutbild zeigten sich 77% segmentkernige Granulozyten, 8% Monozyten und 14% Lymphozyten. Das CRP war mit 129,9mg/l erhöht.

Die mikrobiologische Diagnostik konnte keinen Erreger nachweisen.

Die Sputumdiagnostik zeigte mehr als 25 Leukozyten pro Gesichtsfeld, ebenso die Epithelien.

Sowohl Pneumokokken-Antigen als auch Legionellen-Antigen im Urin waren negativ.

Die Chlamydienserologie (MIF und ELISA) ergab keinen Anhalt auf eine aktuelle Infektion.

Im ELISA zeigten sich Hinweise auf eine länger zurückliegende Infektion.

Die M. pneumoniae Diagnostik ergab keinen Anhalt auf eine Infektion. Die Untersuchungen auf Influenza-, RS-, Adeno- und Enteroviren waren negativ.

Die Simkania-IFT ergab einen Titer von 1:16. Die PCR war negativ.

Es erfolgte eine ambulante antibiotische Therapie mit Ciprofloxacin oral über 14 Tage.

Es konnte eine Besserung der Symptomatik erreicht werden.

Die Probe mit der Pseudonymnummer 950-648-08X wurde von einem zum Zeitpunkt der Materialentnahme 94-jährigen Mann gewonnen. Er war 180 cm groß und wog 75 kg, der BMI betrug 23,1.

Der Patient erfüllte neben den geforderten Hauptbedingungen folgende Nebenbedingungen: Husten und purulentes Sputum. Der Mann litt außerdem unter Dyspnoe und Verwirrtheit.

Neben einer Raucheranamnese von 20py ist ein Tumorleiden bekannt.

Die radiologische Diagnostik zeigte im Röntgenthorax ein Infiltrat. Ein Erguss wurde nicht gesehen.

Es wurde ein kleines Blutbild bestimmt, welches mit Leukozyten: $8.2 \times 10^3/\mu\text{l}$, Hämoglobin: 7.14mmol/l, Hämatokrit: 34% und Thrombozyten: $171 \times 10^3/\mu\text{l}$ unauffällig war.

Im Differentialblutbild zeigten sich 75% segmentkernige Granulozyten, 8% Monozyten und 17% Lymphozyten. Das CRP war mit 62,5 mg/l erhöht.

Die mikrobiologische Diagnostik ergab eine Infektion mit *Haemophilus* spp. und *Enterobacter* spp..

Beide Erreger konnten im Sputum nachgewiesen werden. *Haemophilus* spp. mit einer Keimzahl von mehr als 10^6 und *Enterobacter* spp. mit einer Keimzahl größer 10^4 . Die Leukozyten betragen weniger als zehn pro Gesichtsfeld die Epithelien mehr als 25.

Sowohl Pneumokokken-Antigen als auch Legionellen-Antigen im Urin waren negativ. Die Chlamydienserologie (MIF und ELISA) zeigte Hinweise auf eine länger zurückliegende Infektion. Es gab keinen Anhalt auf eine aktuelle Infektion. Die *M. pneumoniae* Diagnostik ergab keinen Verdacht auf eine Infektion. Die Untersuchungen auf Influenza-, RS-, Adeno- und Enteroviren waren negativ.

Die Simkania-IFT ergab einen Titer von 1:16. Die PCR war negativ.

Es erfolgte die stationäre Aufnahme. Eine antibiotische Therapie mit einem Cephalosporin der dritten Generation i.v. wurde begonnen. Zum Verlauf sind keine weiteren Daten hinterlegt, da der Einschluss anonym erfolgte.

3.2.1.11.4 Ulm

Die Probe mit der Pseudonymnummer 565-837-502 wurde von einer zum Zeitpunkt der Materialentnahme 80-jährigen Frau gewonnen. Sie war 176 cm groß und wog 95 kg, der BMI betrug 30,7.

Die Patientin erfüllte neben den geforderten Hauptbedingungen folgende Nebenbedingungen: Husten und purulentes Sputum. Sie litt außerdem unter Dyspnoe.

In der Anamnese konnten eine chronische Atemwegserkrankung und ein Tumorleiden erfragt werden.

Die radiologische Diagnostik zeigte im Röntgenthorax ein Infiltrat. Ein Erguss wurde nicht gesehen.

Es wurden keine Daten zur Untersuchung mittels klinischer Chemie hinterlegt.

Die mikrobiologische Diagnostik konnte keinen Erreger nachweisen.

In der Sputumdiagnostik zeigten sich weniger als zehn Leukozyten pro Gesichtsfeld und mehr als 25 Epithelien.

Sowohl Pneumokokken-Antigen als auch Legionellen-Antigen im Urin waren negativ. Die Chlamydienserologie (MIF und ELISA) zeigte Hinweise auf eine länger zurückliegende

Infektion. Es gab keinen Anhalt auf eine aktuelle Infektion. Die M. pneumoniae Diagnostik ergab keinen Verdacht auf eine Infektion. Die Untersuchungen auf Influenza-, RS-, Adeno- und Enteroviren waren negativ.

Die Simkania-IFT ergab einen Titer von 1:8. Die PCR war negativ.

Es erfolgte eine ambulante antibiotische Therapie mit Clarithromycin oral über zehn Tage. Unter der Therapie besserte sich die Symptomatik.

3.2.1.11.5 Zusammenfassung Einzelfallbetrachtung

Zur besseren Übersicht fasst Tabelle 6 die wesentlichen Daten der einzelnen positiven Patientenserien zusammen.

Ort	Berlin	Bochum	Bochum	Magdeburg	Magdeburg	Magdeburg	Ulm
Pseudonymnummer	291-124-248	611-948-304	655-143-854	416-242-429	467-494-154	950-648-08X	565-837-502
Alter	60	56	73	63	33	94	80
Geschlecht	w	m	m	m	m	m	w
Größe in cm	161	165	181	180	187	180	176
Gewicht in kg	85	60	100	95	80	75	95
BMI	32,8	22	30,5	29,3	22,9	23,1	30,7
weitere Einschlusskriterien	H, A	H, F	H, S, A	H, A	H, S, A, F	H, S	H, S
Röntgen	Pleura-Erguß	kein Erguß					
Leukozyten x 10 ³ /µl	6,9	9,1	12,6	12,9	5,8	8,2	-
Hämoglobin in mmol/l	7,5762	8,32	7,7	7,07	7,9	7,14	-
Hämatokrit in %	40	40	37	35	37	34	-
Thrombozyten x 10 ³ /µl	240	791	188	318	554	171	-
Segmentkern. Granulozyten in %	-	59	-	79	77	75	-
Monozyten in %	-	7	-	6	8	8	-

3.2.2 Untersuchung der Proben des Universitätsklinikums Jena

Bei keinem der 337 Seren konnten IgG-Antikörper gegen *Simkania negevensis* nachgewiesen werden. Insgesamt 45 Seren (13,01%) wiesen unspezifische Fluoreszenz auf. In der Serengruppe mit der Verdachtsdiagnose atypische Pneumonie war bei 14 von 145 Proben unspezifische Fluoreszenz auffällig (9,66%) In der Patientengruppe mit Verdachtsdiagnose Pneumonie bei 30 von 192 Seren (15,62%). Die Abbildung 16 stellt die Ergebnisse grafisch dar.

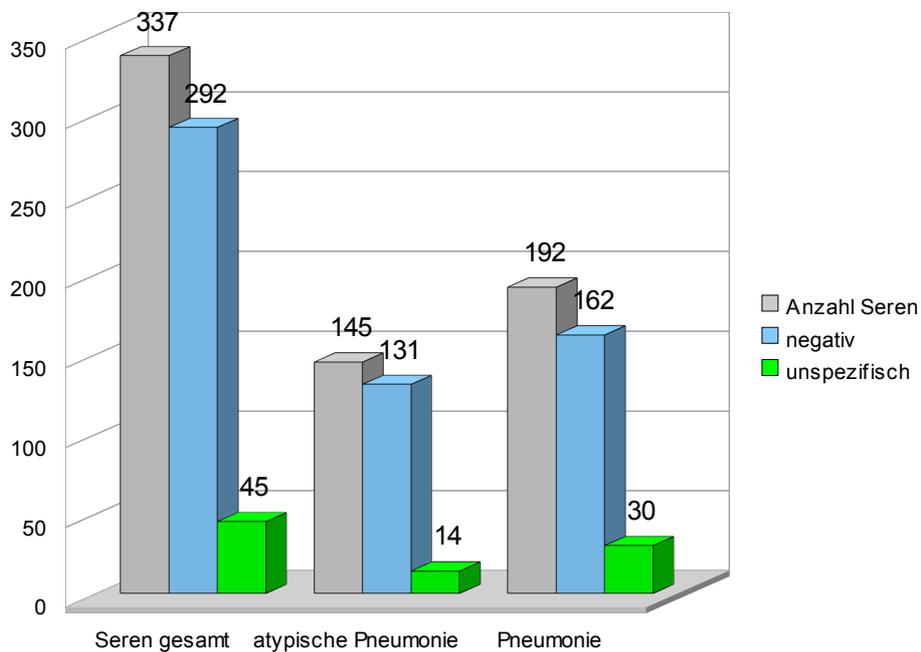


Abbildung 16: Das Diagramm stellt die Anzahl der Seren sowie die Menge der zugehörigen negativen und unspezifischen Messwerte dar.

4. Diskussion

Seit seiner Entdeckung 1993 ist *Simkania negevensis* Gegenstand von Forschungsarbeiten in der ganzen Welt. Anhand von Genvergleichen konnte eine nahe Verwandtschaft mit den Chlamydien belegt werden. Diese Arbeiten führten auch zur Entwicklung einer neuen Taxonomie der Chlamydiales (Bush and Everett 2001, Pannekoek et al. 2008, siehe 2.1). In Zellmodellen konnte die Fähigkeit von *S. negevensis* gezeigt werden, humane Zellen zu infizieren und sich erfolgreich in ihnen zu vermehren (Kahane et al. 2007). Auch zeigen Versuche mit humanen Leukozyten *in vitro*, dass der Erreger diese als Vehikel verwendet und sich erfolgreich der Immunabwehr entziehen kann (Kahane et al. 2008, siehe 2.2.6). Dies legt eine Humanpathogenität auch *in vivo* nahe. Bisher wird das Bakterium vor allem mit respiratorischen Erkrankungen in Verbindung gebracht.

Die heutige Diagnostik bei Chlamydieninfektionen beruht auf Zellkultur, PCR- und serologischem Nachweis. Welcher Nachweis bevorzugt zum Einsatz kommt, ist abhängig von der Chlamydienart und der zu beantwortenden Fragestellung (Tuuminen et al. 2000, siehe 2.1.3). Für den Nachweis von *S. negevensis* ist derzeit noch unklar, welche Methoden zu bevorzugen sind.

Durch die Arbeit von Matthias Tischer konnten bisher Zellkultur und PCR-Nachweis an einem deutschen Labor etabliert werden. So konnte *S. negevensis* erstmals auch in Thüringen im Respirationstrakt von Kindern nachgewiesen werden (Tischer 2004). 2005 konnte eine Japanische Forschungsgruppe um Yamaguchi erstmals zeigen, dass man *S. negevensis* auch mittels Immunfluoreszenz nachweisen kann (Yamaguchi et al. 2005).

4.1 IFT

4.1.1 Testverfahren

In der Vergangenheit als der „einzig spezifische und sensitive Test für alle Chlamydien“ bezeichnet (Kuo et al. 1995, Black 1997), wird der Mikroimmunfluoreszenztest derzeit von vielen Autoren kritisch diskutiert. Einige Autoren halten ihn nach wie vor für die Goldstandardmethode der serologischen Diagnostik von Infektionen durch Chlamydien (Verkooyen et al. 1998, Yamaguchi et al. 2005) insbesondere beim Nachweis von *Chlamydia pneumoniae* Infektionen (Frikha-Gargouri et al. 2008). Andere geben Testverfahren wie ELISA aufgrund einfacherer Durchführbarkeit den Vorzug (Morré et al 2002, Bas et al. 2001).

Für den serologischen Nachweis von *Simkania negevensis* gibt es derzeitig noch keinen Standard (Friedman et al. 1997). Für den Nachweis einer zurückliegenden Chlamydien-Infektion mittels IgG-Bestimmung wird der MIF-Test jedoch empfohlen (Black 1997). Den von Yamaguchi et al. 2005 erstmals gezeigten Nutzen der MIF zum Nachweis von *S. negevensis*, konnte auch in Studien aus Dänemark, Finnland und Italien sowie in dieser Arbeit bestätigt werden (Johnsen et al. 2005, Korppi et al. 2006, Heiskanen-Kosma et al. 2008, Fasoli et al. 2008).

Strittig bleiben Sensitivität und Spezifität des Tests (siehe 2.1.4.2). Eine neue Untersuchung von Baud et al. 2010 vergleicht für *Chlamydia trachomatis* fünf kommerziell erhältliche serologische Testverfahren miteinander. Darunter neben einem IFT auch drei ELISA, zwei davon nutzen zum Nachweis das MOMP und einer das chlamydiale HSP60, sowie einen neuen Epifluoreszenz Immunoassay. Der Goldstandard wurde aus den Ergebnissen aller fünf Tests zusammengesetzt wobei echt-positiv als vier von fünf oder fünf von fünf Tests positiv und echt-negativ als null von fünf oder einer von fünf positiv definiert wurde. Der IFT erreicht hierbei eine Sensitivität von 83,3% und eine Spezifität von 95,6%. Seine Sensitivität ist dabei den anderen genutzten Verfahren unterlegen. Diese erreichen Werte von 93,3 bis 100%. Seine Sensitivität liegt im Mittelfeld, die Testwerte reichen von 87,4 bis 99,7%. Den Tests gemeinsam ist ihr hoher negativ prediktiver Wert. Für den IFT wurde er mit 98,3% bestimmt (Baud et al. 2010). Das bedeutet, dass Proben, die im Test negativ gewertet wurden, mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch echt-negativ sind.

Ein weiteres Problem der Immunfluoreszenztests stellen Kreuzreaktivitäten zwischen den einzelnen Chlamydiales dar, die aufgrund gemeinsamer Oberflächenantigene auftreten (siehe 2.1.2 und 2.1.3). Für *S. negevensis* wurde durch Absorptionstests gezeigt, dass eine Kreuzreaktivität mit *C. pneumoniae* als sehr gering zu betrachten ist (Yamaguchi et al. 2005). Der IFT für *C. trachomatis* weist zwar Kreuzreaktivitäten mit *C. pneumoniae* und *C. psittaci* auf, es wurden aber keine für *W. chondrophila*, *P. acanthamoebae*, *N. Hartmannellae* und *S. negevensis* gefunden (Baud et al. 2010).

Es werden außerdem Kreuzreaktionen mit zirkulierenden IgG-Rheumafaktoren diskutiert (Kuo et al. 1995).

Die meisten Untersuchungen beziehen sich auf die typischen humanpathogenen Erreger wie *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* und *C. psittaci*. Für die neuen Vertreter der Chlamydiales ist eine Evaluierung der Messmethoden bisher noch nicht ausreichend vorhanden.

4.1.2 Cut-off Wert

Für Chlamydien wird empfohlen, Proben, die einen Anstieg um vier Titerstufen, einen IgM-Titer ≥ 16 oder einen IgG-Titer ≥ 512 aufweisen, als positiv für eine akute Infektion zu werten. Hohe Antikörpertiter allein können auch Ausdruck einer früheren Infektion sein (Wang 2000). Für *Simkania negevensis* sind bisher keine Standardwerte festgelegt. Corsaro und Greub empfehlen die Verdünnungsreihen ab 1:8 zu beginnen. Für den Nachweis einer bereits durchgemachten Infektion sollte ein Cut-off-Wert für IgG-Antikörper von 1:64 gelten. Der Nachweis einer akuten Infektion orientiert sich an den Werten für Chlamydien, wobei ein IgM-Titer von $>1:32$ oder ein Anstieg um vier Titerstufen für IgG-Antikörper als Richtwert empfohlen wird (Corsaro und Greub 2006). Diese Cut-off-Werte insbesondere der Wert für zurückliegende Infektionen, scheinen mir sehr hoch angesetzt. In der japanischen Studie von Yamaguchi et al. 2005 war der höchste festgestellte Titer 1:64, wobei gesunde Japaner untersucht wurden. Der Cut-off für positive Ergebnisse wurde auf 1:8 festgelegt und liegt damit deutlich niedriger als der vorgeschlagene Wert von Corsaro und Greub. Die finnische Studie von Korppi et al. 2006 nutzt die gleichen festgelegten Cut-off-Werte von 1:8 für IgG-Antikörper während Johnsen et al. 2005 einen Wert von 1:16 nutzen. Ohne eine Festlegung einheitlicher Standardwerte ist ein Vergleich der Studien kaum möglich. Die Festlegung einheitlicher Werte ist daher dringend erforderlich.

4.1.3 Unspezifische Fluoreszenz

Die Anzahl der unspezifischen Proben lag mit 4,99% bei den CAPNETZ-Proben und 13,01% bei den Proben des Universitätsklinikums unerwartet hoch. Ursächlich dafür ist meiner Ansicht nach der eingesetzte Dottersackkleber. Es handelt sich dabei um eine aus Hühnereiern gewonnene Substanz, gegen die Antikörper vorkommen.

4.1.4 Proben

Für den Nachweis von Antikörpern spielt der Zeitraum nach Infektionsbeginn eine wichtige Rolle. Im Tiermodell entwickelten Meerschweine bei ocularen Infektionen mit *C. psitacci* bereits nach fünf Tagen Antikörper. Bei genitaler *C. trachomatis* Infektion jedoch zeigten Krallenaffenweibchen beispielsweise erst nach zwölf bis 15 Tagen IgM- und nach 24 bis 27 Tagen IgG-Antikörper (Monnickendam und Pearce 1983). Bei humanen *C. trachomatis* Infektionen zeigten Seren bei Erstinfektion meist erst nach etwa drei Wochen IgM- und nach acht Wochen IgG-Titer (Grayston et al. 1989).

Bei denen im Rahmen der CAPNETZ-Studie gewonnenen Proben wurden die Seren im Rahmen der Einschlussuntersuchung in die Studie gewonnen. Ein niedriger Titer muss nicht gleichzeitig eine Infektion ausschließen, da das Serum auch aus einem zu frühen Infektionsstadium stammen kann. Optimal wäre das Vorhandensein mehrerer Seren, um einen eventuellen Titeranstieg beobachten zu können.

4.2 Ergebnisse

In dieser Untersuchung wurden erstmals IgG-Antikörper gegen *Simkania negevensis* bei an CAP erkrankten Personen aus verschiedenen Städten in Deutschland nachgewiesen. Bisherige Ergebnisse aus Deutschland beschränkten sich auf den Nachweis mittels Zellkultur oder PCR (Tischer 2004). Mit dem durch diese Arbeit am Institut etablierten IFT steht nun ein Werkzeug für weitere serologische Untersuchungen zur Verfügung. Bisherige serologische Untersuchungen lassen auf eine weltweite Verbreitung schließen. Die Seroprävalenzen bei Gesunden schwanken dabei stark von 4,3% in Japan bis über 80% bei Beduinen in Israel (Friedman et al. 1999, Yamaguchi et al. 2005 siehe 2.2.8). Der Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Simkania negevensis* mithilfe des IFT war problemlos möglich.

4.2.1 CAPNETZ-Proben

Bei elf von 401 untersuchten Seren (2,74%) konnten Antikörper gegen *Simkania negevensis* nachgewiesen werden. Bei einem Cut-off-Wert von 1:8 sind sieben der 401 Proben (1,75%) als positiv zu werten. Nur eine dieser Proben war auch in der PCR positiv.

Die Untersuchungsergebnisse stehen im Kontrast zu den aus anderen europäischen Ländern, wie Dänemark mit 41% oder England mit 42%, vorliegenden Seroprävalenzen bei Erwachsenen (Johnsen et al. 2005, Friedman et al. 2006). Ich ging daher auch für Deutschland von einer deutlich höheren Seroprävalenz aus. Die Daten dieser Untersuchung ähneln den

Ergebnissen aus Japan, wo die Seroprävalenz bei Gesunden bei 4,3% lag (Yamaguchi et al. 2005). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die geringe Sensitivität des IFT sein (siehe 2.1.3).

Da die gefundenen Titer niedriger als 1:64 sind, lässt sich keinerlei Aussage über eine aktuelle Infektion treffen. Ein Zusammenhang mit CAP bei Erwachsenen lässt sich ohne Vergleichsdaten von gesunden Probanden kaum herstellen. An der Erhebung solcher Daten wird am Institut bereits gearbeitet. Erste Ergebnisse lassen auch hier eine sehr niedrige Prävalenz für den Raum Thüringen vermuten (unpublizierte Daten).

Besonders auffällig war die unterschiedliche Verteilung in den untersuchten Städten. Die besonders hohe Prävalenz von 10% in Bochum ist dabei aufgrund der geringen Fallzahl von nur 20 Proben jedoch nur sehr eingeschränkt aussagekräftig. Deutlicher zeigt sich jedoch der Unterschied zwischen Lübeck mit 89, Berlin mit 71 und Magdeburg mit 75 untersuchten Proben. Die Proben aus Lübeck weisen keine Antikörper auf, die Seren aus Magdeburg in 4% und die Seren aus Berlin in 1,41% der untersuchten Fälle. Dies könnte auf eine regional unterschiedliche Verteilung hinweisen. Aufgrund der als gering einzustufenden Fallzahl kann es sich dabei auch um zufällige Verteilungen handeln.

4.2.1.1 Korrelation PCR und IFT

Insgesamt sind 29 Proben in der PCR und sieben im IFT positiv. Nur eine der PCR-positiven Proben wurde auch mit dem IFT positiv getestet. Dieser Unterschied zwischen PCR und IFT wird am Institut für Medizinische Mikrobiologie der FSU-Jena auch für *C. pneumoniae* beobachtet. Antikörper gegen einen Organismus und der Nachweis seiner DNA bedingen sich nicht zwangsläufig gegenseitig. So können serologisch noch lange nach Kontakt mit einem Organismus Antikörper nachgewiesen werden, ohne dass DNA noch vorhanden wäre. Andersherum kann DNA nachweisbar sein, der Organismus aber serologisch noch keine Spuren hinterlassen haben (siehe 5.1.4.).

4.2.1.2 Einzelfallbetrachtung

Nur bei drei der sieben Patienten ergab die mikrobiologische Diagnostik einen für die Pneumonie verantwortlichen Erreger. Hier kann sich der IgG-Titer für *S. negevensis* im Rahmen einer Koinfektion gebildet haben. Eine klare Assoziation ist jedoch aufgrund der niedrigen Titer nicht möglich.

Von den Patienten mit gesichertem Erreger wurden zwei von drei stationär behandelt, was für Patienten im Alter von 73 und 94 Jahren mit Pneumonien verursacht durch *Enterobacter* spp. und *Haemophilus* spp. durchaus verständlich ist. Zum Patienten Nummer drei sind keine Daten hinterlegt worden.

Bei den anderen vier Patienten wurde kein anderer Erreger nachgewiesen. Nur einer der Patienten dieser Gruppe musste stationär aufgenommen werden. Ursächlich für die stationäre Behandlung könnte dabei die große Anzahl seiner Komorbiditäten, wie Tumorleiden, chronische Atemwegserkrankung, Diabetes mellitus und eine chronische Herzerkrankung, gewesen sein.

Die anderen drei Patienten konnten ambulant behandelt werden. Eine besondere Schwere der Pneumonie wurde dabei in den Unterlagen nicht vermerkt. Hier könnte *S. negevensis* durchaus als Erreger eine Rolle gespielt haben. Bei Kindern wurden unter der Annahme, dass *S. negevensis* für die Infektion verantwortlich war, ebenfalls relativ milde Verläufe beobachtet (Greenberg et al. 2003, Nascimento-Carvalho et al. 2009).

4.2.2 Proben des Universitätsklinikums Jena

Bei keinem der 334 Patientenserum von 160 Patienten konnten IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Im untersuchten Zeitraum ist kein Zusammenhang zwischen *Simkania negevensis* und im Krankenhaus erworbenen Pneumonien/ atypischen Pneumonien zu belegen. Ursächlich könnte auch hier wieder die geringe Sensitivität der IFT sein. Durch die Untersuchung von Serumpaaren ist es sehr unwahrscheinlich, dass eine frische Infektion mit *S. negevensis* bei einem der Patienten für die Pneumonie verantwortlich gewesen ist. Erste Daten lassen vermuten, dass in Thüringen *S. negevensis* nur in vernachlässigbarer Anzahl die Rachenschleimhäute von gesunden Erwachsenen besiedelt (unpublizierte Daten).

4.3 Pathogene Bedeutung von *Simkania negevensis*

Keine der bisher veröffentlichten Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Atemwegserkrankungen bei Erwachsenen und *Simkania negevensis* sicher belegen (Lamoth und Greub 2010). Meist zeigten sich nur minimale Unterschiede zwischen den Kontroll- und Testgruppen. In Einzelfällen lassen sich Hinweise auf eine frische Infektion finden. Diese könnten aber auch unabhängig der jeweiligen Erkrankung zufällig gleichzeitig aufgetreten sein. Die hohen Raten an Seroprävalenzen und frühen Erstinfektionen könnten mit dem als natürliches Reservoir und Übertragungsmedium diskutierten Wasser zusammenhängen.

So konnte gezeigt werden, dass *S. negevensis* in verschiedenen Amöbenarten, wie *Acanthamoeba polyphaga*, *Balamuthia mandrillaris* und *Hartmannella vermiformis*, überleben kann (Kahane et al. 2001, Michel et al. 2005). Auch in Deutschland wurde *Simkania negevensis* in Wasserpflanzen zur Reinigung von Abwässern nachgewiesen (Horn und Wagner 2001). Eine an die Amöben gekoppelte Verbreitung wird daher diskutiert (Lamoth und Greub 2010). Auch konnte seine Fähigkeit, Zellen des Gastrointestinaltraktes (HT-29) zu infizieren und in ihnen zu überleben, gezeigt werden (Kahane et al. 2007). So könnte *S. negevensis* über infizierte Amöben im Trinkwasser aufgenommen werden und den Gastrointestinaltrakt besiedeln. Auch wäre denkbar, dass *S. negevensis* dort vor allem in seiner wenig aktiven kryptischen Infektionsform vorliegt und so keinerlei Antikörperproduktion triggert. Es ist nicht auszuschließen, dass *Simkania negevensis* als natürlicher Kommensale den Menschen besiedelt (Kahane et al. 1998, Kumar et al. 2005). Das macht die These eines opportunistischen Erregers für mich naheliegend (Greenberg et al. 2003). Gefährdet scheinen dabei vor allem Kinder und immungeschwächte/supprimierte Personen. Sowohl Studien aus Italien als auch aus Finnland konnten anhand von IgM-Antikörperbestimmung aktuelle Infektionen mit *S. negevensis* bei Kindern mit CAP nachweisen. In den meisten Fällen lagen dabei Mischinfektionen mit RS-Viren oder Mykoplasmen vor (Heiskanen-Kosma et al. 2008, Fasoli et al. 2008). Sehr ähnlich dazu sind auch die Daten aus Deutschland. Bei vier von sechs PCR-positiv getesteten Kindern lagen Mischinfektionen vor. Nur in zwei Fällen war *S. negevensis* der einzig nachweisbare pathogene Faktor. Ausgeschlossen werden konnten Infektionen mit *H. influenzae*, Staphylokokken, Pneumokokken, RS-Viren, Chlamydien, Legionellen, Mykoplasmen, Influenza- und Parainfluenzaviren (Tischer 2004).

Hinweise auf Pathogenität von *S. negevensis* gibt es nicht nur bei Kindern. Ein Einfluss von *Simkania negevensis* auf Lungentransplantierte scheint wahrscheinlich. So sind Abstoßungsreaktionen häufiger in der *S. negevensis* positiven Gruppe beobachtet worden. Die Daten erreichen keine statistische Signifikanz (Husain et al. 2007).

Auch die Ergebnisse meiner Untersuchung können nur anhand von Einzelfällen einen pathogenen Einfluss vermuten lassen. Um dies besser belegen zu können, wäre eine weitere Untersuchung der CAPNETZ-Proben auf IgM-Antikörper sinnvoll. Jedoch ist auch hier bei zu erwartenden niedrigen Titern ohne ein zweites Serum eine äußerst eingeschränkte Aussagekraft provoziert.

6. Schlussfolgerungen

Mit dieser Arbeit konnten erstmals Antikörper gegen *Simkania negevensis* in Seren von Patienten aus Deutschland nachgewiesen werden. Das Untersuchungsverfahren der IFT konnte unkompliziert an *S. negevensis* adaptiert werden. Es wurden erfolgreich Seren von Erwachsenen, die an CAP und an nosokomial erworbenen Pneumonien erkrankt waren, auf IgG-Antikörper getestet und damit der Grundstein für weitere serologische Untersuchungen in Deutschland gelegt.

Die Untersuchung basiert auf Ergebnissen von Lieberman et al. 1997, welche erstmals einen Zusammenhang zwischen *Simkania negevensis* und CAP bei Erwachsenen herstellten.

Die für andere Länder ermittelten hohen Seroprävalenzen konnten für Deutschland vorerst nicht bestätigt werden. Nur in sieben von 401 Proben von Patienten, die an einer gesicherten CAP erkrankt waren, ließen sich Antikörper nachweisen. Mit 1,75% liegt die Seroprävalenz damit von allen bisher durchgeführten Studien am niedrigsten. Eine Übereinstimmung mit den vorliegenden PCR-Ergebnissen konnte nicht beobachtet werden. Nur eine der positiven Proben wies auch einen positive PCR auf.

Eine regionale Häufung von Fällen konnte für Berlin, Bochum, Ulm und Magdeburg aufgezeigt werden.

Ein Zusammenhang zwischen der CAP und *S. negevensis* ist Aufgrund zu niedriger Titer von maximal 1:32 nicht sicher herstellbar. In vier von sieben positiven Proben war jedoch außer *S. negevensis* kein pathogenes Agens nachweisbar. Gesucht wurde dabei nach Legionellen, Pneumokokken, Chlamydien, Mykoplasmen, Influenza-, RS-, Adeno- und Enteroviren. Die Krankheitsverläufe sind nach den vorliegenden Unterlagen in drei der vier Fälle mit einer ambulanten antibiotischen Therapie unkompliziert verlaufen. Der vierte Patient wies erhebliche Komorbiditäten auf, was die stationäre Therapie erklären könnte.

Bei drei Patienten konnte die mikrobiologische Diagnostik neben *S. negevensis* einen weiteren Erreger finden. Ein Patient wies eine Koinfektion mit *Haemophilus* spp und *Enterobacter* spp, die anderen beiden eine Infektion mit *Enterobacter* spp bzw. *Mykoplasma pneumoniae*. Eine Koinfektion mit *S. negevensis* ist hier nicht auszuschließen, bleibt aber spekulativ.

Eine Pathogenität von *S. negevensis* lässt sich anhand der Daten weder bestätigen noch ausschließen.

In der Probengruppe des Universitätsklinikums Jena mit im Krankenhaus erworbenen Pneumonien und atypischen Pneumonien konnte in keinem der 337 Seren IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Ein Einfluss von *S. negevensis* auf im Krankenhaus erworbene Pneumonien und atypische Pneumonien ist für den untersuchten Zeitraum sehr unwahrscheinlich. In keiner der im Abstand von mindestens 14 Tagen gewonnenen Zweitseren konnte ein Titeranstieg beobachtet werden.

Mit dieser Arbeit konnte das Vorkommen von *Simkania negevensis* in Deutschland bestätigt werden. Um die Ergebnisse besser einordnen zu können, sind weitere serologische Untersuchungen an Gesunden notwendig. Eine Methode zur serologischen Aufarbeitung steht nun zur Verfügung.

7. Literatur- und Quellenverzeichnis

Al-Younes H M, Brinkmann V, Meyer T F. 2004. Interaction of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 with the host autophagic pathway. *Infect Immun* 72; 4751–4762.

AbdelRahman Y M, Belland R J. 2005. The chlamydial developmental cycle. *FSME Microbiology Reviews* 29; 949-59.

Bas S, Muzzin P, Ninet B, Bornand JE, Scieux C, Vischer T L. 2001. Chlamydial serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. *J Clin Microbiol* 39; 1368-77.

Baud D, Regan L, Greub G. 2010. Comparison of five commercial serological tests for the detection of anti-*Chlamydia trachomatis* antibodies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29; 669-75.

Bavoil P M, Hsia R, Ojcius D M. 2000. Closing in on *Chlamydia* and its intracellular bag of tricks. *Microbiology* 146; 2723–2731.

Belland R J, Zhong G, Crane D D, Hogan D, Sturdevant D, Sharma J, Beatty W L, Caldwell H D. 2003. Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100; 8478–8483.

Black CM. 1997. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Rev* 10; 160-84.

Brickman TJ, Barry CE 3rd, Hackstadt T. 1993. Molecular cloning and expression of *hctB* encoding a strain-variant chlamydial histone-like protein with DNA-binding activity. *J Bacteriol* 175; 4274-81.

Bush R M, Everett K D. 2001. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 51; 203-20.

Carabeo R A, Hackstadt T. 2001. Isolation and characterization of a mutant Chinese hamster ovary cell line that is resistant to *Chlamydia trachomatis* infection at a novel step in the attachment process. *Infect Immun* 69; 5899–5904.

Carabeo R A, Mead D J, Hackstadt T. 2003. Golgi-dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 100; 6771–6776.

Clifton, D R, Fields K A, Grieshaber S S, Dooley C A, Fischer E R, Mead D J, Carabeo R A, Hackstadt T. 2004. From The Cover: A Chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 101; 10166–10171.

Corsaro D, Greub G. 2006. Pathogenic Potential of Novel Chlamydiae and Diagnostic Approaches to Infections Due to These Obligate Intracellular Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 19; 283-297.

Davis C H, Raulston J E, Wyrick P B. 2002. Protein disulfide isomerase, a component of the estrogen receptor complex, is associated with *Chlamydia trachomatis* serovar E attached to human endometrial epithelial cells. *Infect Immun* 70; 3413–3418.

de Barbeyrac B, Obeniche F, Ratsima E, Labrousche S, Moraté C, Renaudin H, Pereyre S, Bébéar CM, Bébéar C. 2006. Serologic diagnosis of chlamydial and *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Ann Biol Clin* 64;409-19.

Dowell S F, Peeling R W, Boman J, Carlone G M, Fields B S, Guarner J, Hammerschlag M R, Jackson L A, Kuo C C, Maass M, Messmer T O, Talkington D F, Tondella M L, Zaki S R; C. pneumoniae Workshop Participants. 2001. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis* 33;492-503.

Everett K D, Bush R M, Andersen A A. 1999. Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49; 415 - 440.

Everett K D, Kahane S, Bush R M, Friedman M G. 1999. An Unspliced Group I Intron in 23S rRNA Links Chlamydiales, Chloroplasts, and Mitochondria. *Journal of Bacteriology* 181; 4734-40.

Lamoth F, Greub G. 2010. Amoebal pathogens as emerging causal agents of pneumonia. *FEMS Microbiol Rev* 34; 260–280.

Fasoli L, Paldanius M, Don M, Valent F, Vetrugno L, Korppi M, Canciani M. 2008. *Simkania negevensis* in community-acquired pneumonia in Italian children. *Scand J Infect Dis* 40;269-72.

Friedman M G, Ilan S, Kahane S, Kosashvili N, Bir Y, Lieberman D. 1997. A simple ELISA capable of distinguishing between IgG antibodies to *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Opportunistic Pathogens* 9; 43–49.

Friedman M G, Galil A, Greenberg S, Kahane S. 1999. Seroprevalence of IgG antibodies to the chlamydia-like microorganism 'Simkania Z' by ELISA. *Epidemiol Infect* 122; 117–123.

Friedman M G, Dvoskin B, Kahane S. 2003. Infections with the chlamydia like microorganism *Simkania negevensis*, a possible emerging pathogen. *Microbes and Infection* 5; 1013-21.

Friedman M G, Kahane S, Dvoskin B, Harthley J W. 2006. Detection of *Simkania negevensis* by culture, PCR, and serology in respiratory tract infection in Cornwall, UK. *J Clin Pathol* 59; 331-333.

Friis R R. 1972. Interaction of L cells and *Chlamydia psittaci*: entry of the parasite and host responses to its development. *J Bacteriol* 110; 706–721.

Frikha-Gargouri O, Gdoura R, Znazen A, Ben Arab N, Gargouri J, Ben Jemaa M, Hammami A. 2008. Evaluation and optimization of a commercial enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Chlamydia pneumoniae* IgA antibodies. *BMC Infect Dis* 8;98.

Grayston JT, Wang SP, Kuo CC, Campbell LA. 1989. Current knowledge on *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, an important cause of pneumonia and other acute respiratory diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8; 191-202.

Greenberg D, Banerji A, Friedman MG, Chiu CH, Kahane S. 2003. High rate of *Simkania negevensis* among Canadian inuit infants hospitalized with lower respiratory tract infections. *Scand J Infect Dis* 35;506-8.

Griehaber S S, Griehaber N A, Hackstadt T. 2003. *Chlamydia trachomatis* uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process. *J Cell Sci* 116; 3793–3802.

Grieshaber N A, Fischer E R, Mead D J, Dooley C A, Hackstadt T. 2004. Chlamydial histone–DNA interactions are disrupted by a metabolite in the methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101; 7451–7456.

Griffiths E, Gupta R S. 2002. Protein signatures distinctive of chlamydial species: horizontal transfers of cell wall biosynthesis genes *glmU* from archaea to chlamydiae and *murA* between chlamydiae and *Streptomyces*. *Microbiology* 148; 2541-2549.

Grimwood J, Stephens RS. 1999. Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Comp Genomics* 4; 187-201.

Hackstadt T, Rockey D D, Heinzen R A, Scidmore M A. 1996. *Chlamydia trachomatis* interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *EMBO J* 15; 964–977.

Heiskanen-Kosma T, Paldanius M, Korppi M. 2008. *Simkania negevensis* may be a true cause of community acquired pneumonia in children. *Scand J Infect Dis* 40;127-30.

Hermann C, Gueinzius K, Oehme A, Von Aulock S, Straube E, Hartung T. 2004. Comparison of quantitative and semiquantitative enzyme-linked immunosorbent assays for immunoglobulin G against *Chlamydia pneumoniae* to a microimmunofluorescence test for use with patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 42;2476-9.

Höffken G, Halank M, Gillissen A. 2004. Treatment of severe pneumonia--community-acquired and "early onset" nosocomial. *Med Klin (Munich)* 15; 362-71.

Horn M, Wagner M. 2001. Evidence for additional genus-level diversity of Chlamydiales in the environment. *FEMS Microbiol Lett* 204; 71-4.

Horn M. 2008. Chlamydiae as symbionts in eukaryotes. *Annu Rev Microbiol* 62; 113-31.

<http://www.chlamydiae.com> Stand:5.9.2010 – durch Michael Ward, Professor Emeritus, School of Medicine, University of Southampton, England betreute Webseite über Chlamydien.

<http://www.nlm.nih.gov/nlmhome.html> Stand:5.9.2010 - United States National Library of Medicine.

<http://www.destatis.de> Stand: 23.8.1010 - Websteite des Statistischen Bundesamtes: Todesursachenstatistik.

Husain S, Kahane S, Friedman M G, Paterson D L, Studer S, McCurry K R, Wolf D G, Zeevi A, Pilewski J, Greenberg D. 2007. *Simkania Negevensis* in Bronchoalveolar Lavage of Lung Transplant Recipients: A Possible Association with Acute Rejection. *Transplantation* 83(2);138-43.

Hvidsten D, Halvorsen DS, Berdal BP, Gutteberg TJ. 2009. *Chlamydomydia pneumoniae* diagnostics: importance of methodology in relation to timing of sampling. *Clin Microbiol Infect* 15; 42-9.

Johnsen S, Birkebaek N, Andersen PL, Emil C, Jensen JS, Østergaard L. 2005. Indirect immunofluorescence and real time PCR for detection of *Simkania negevensis* infection in Danish adults with persistent cough and in healthy controls. *Scand J Infect Dis* 37; 251-5.

Kahane S, Gonen R, Sayada C, Elion J, Friedman M G. 1993. Description and partial characterization of a new chlamydia-like microorganism. *FEMS Microbiology Letters* 109; 329-34.

Kahane S, Metzger E, Friedman M G. 1995. Evidence that the novel microorganism „Z“ may belong to a new genus in the family Chlamydiaceae. *FEMS Microbiology Letters* 126; 203-8.

Kahane S, Greenberg D, Friedman M G, Haikin H, Dagan R. 1998. High Prevalence of „Simkania Z,“ a Novel Chlamydia-like Bacterium, in Infants with Acute Bronchiolitis. *JID* 177; 1425-29.

Kahane S, Everett K D, Kimmel N, Friedman M G. 1999. Simkania negevensis strain Z^t: growth, antigenic and genome characteristics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49; 815-20.

Kahane S, Dvoskin B, Mathias M, Friedman M G. 2001. Infection of *Acanthamoeba* polyphaga with Simkania negevensis and S. negevensis Survival within Amoebal Cysts. *Applied and Environmental Microbiology* Oct. 2001; 4789-95.

Kahane S, Kimmel N, Friedman M G. 2002. The growth cycle of Simkania negevensis. *Microbiology* 148; 735-42.

Kahane S, Platzner N, Dvoskin B, Itzhaki A, Friedman M G. 2004. Evidence for the Presence of Simkania negevensis in Drinking Water and in Reclaimed Wastewater in Israel. *Applied and Environmental Microbiology* June 2004; 3346-51.

Kahane S, Dvoskin B, Friedman M G. 2007. The role of monocyte/macrophages as vehicles of dissemination of Simkania negevensis: an in vitro simulation model. *FEMS Immunol Med Mircobiol* 52; 219-27.

Kahane S, Fruchter D, Dvoskin B, Friedman M G. 2007. Versatility of Simkania negevensis infection in vitro and induction of host cell inflammatory cytokine response. *Journal of Infection* 55; e13-e21.

Kahane S, Greenberg D, Newman N, Dvoskin B, Friedman M G. 2007. Domestic water supplies as a possible source of infection with Simkania. *Journal of Infection* 54; 75-81.

Korppi M, Paldanius M, Hyvärinen A, Nevalainen A. 2006. Simkania negevensis and newly diagnosed asthma: a case-control study in 1- to 6-year-old children. *Respirology* 11;80-3.

Kumar S, Kohlhoff S A, Gelling M, Roblin P M, Kutlin A, Kahane S, Friedman M G, Hammerschlag M R. 2005. Infection with *Simkania negevensis* in Brooklyn, New York. *Pediatr Infect Dis J* 24; 989-92.

Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. 1995. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 8;451-61.

Kuo C C, Chen, F F, Wang S P, Grayston J T. 1986. Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR. *J Clin Microbiol* 24;1034-7.

Lewis VJ, Thacker WL, Mitchell SH. 1977. Enzyme-linked immunosorbent assay for chlamydial antibodies. *J Clin Microbiol* 6; 507-10.

Lieberman D, Kahane S, Lieberman D, Friedman M G. 1997. Pneumonia with Serological Evidence of Acute Infection with the Chlamydia-like Microorganism „Z“. *A; J Respor Crit Care Med* 156; 578-82.

Lieberman D, Dvoskin B, Lieberman D V, Kahane S, Friedman M G. 2002. Serological Evidence of Acute Infection with the Chlamydia-Like Microorganism *Simkania negevensis* (Z) in Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21; 307-309.

Mathers CD, Boerma T, Ma Fat D. 2009. Global and regional causes of death. *Br Med Bull* 92;7-32.

Matsumoto A. 1973. Fine structures of cell envelopes of *Chlamydia* organisms as revealed by freeze-etching and negative staining techniques. *J Bacteriol* 116; 1355-63.

- Michel R, Müller K-D, Zöller L, Walochnik J, Hartmann M, Schmid E-N. 2005. Free-living amoebae serve as a host for the Chlamydia-like bacterium *Simkania negevensis*; *Acta Protozoologica* 44; 113-121.
- Moazed T C, Kuo C C, Grayston J T, Campbell L A. 1998. Evidence of systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* via macrophages in the mouse. *J Infect Dis.* 177; 1322-5.
- Monnickendam MA, Pearce JH. 1983. Immune responses and chlamydial infections. *Br Med Bull.* 39; 187-93.
- Morré SA, Munk C, Persson K, Krüger-Kjaer S, van Dijk R, Meijer CJ, van Den Brule AJ. 2002. Comparison of three commercially available peptide-based immunoglobulin G (IgG) and IgA assays to microimmunofluorescence assay for detection of *Chlamydia trachomatis* antibodies. *J Clin Microbiol* 40;584-7.
- Moulder JW. 1991. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev* 55; 143-90.
- Moulder JW. 1966. The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and viruses. *Annu Rev Microbiol* 20; 107-30.
- Nascimento-Carvalho CM, Cardoso MR, Paldanius M, Barral A, Araújo-Neto CA, Saukkoriipi A, Vainionpää R, Leinonen M, Ruuskanen O. 2009. *Simkania negevensis* infection among Brazilian children hospitalized with community-acquired pneumonia. *J Infect* 58; 250-3.

Nicholson T L, Olinger L, Chong K, Schoolnik G, Stephens R S. 2003. Global stage-specific gene regulation during the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* 185; 3179–3189.

Pannekoek, Y, Morelli G, Morré B K, Ossewaarde J M, Langerak A A, van der Ende A. 2008. Multi locus sequence typing of *Chlamydiales*: clonal groupings within the obligate intracellular bacteria *Chlamydia trachomatis*. *BMC Microbiology* 8, 42. doi:10.1186/1471-2180-8-42.

Papaetis GS, Anastasakou E, Tselou T, Karapanagiotou E, Botsis T, Roussou P, Orphanidou D. 2008. Serological diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection in Greek COPD patients by microimmunofluorescence and ELISA. *Med Sci Monit* 14;27-35.

Plaunt M R, Hatch T P. 1988. Protein synthesis early in the developmental cycle of *Chlamydia psittaci*. *Infect Immun* 56; 3021–3025.

Saikku P, Wang S P, Kleemola M, Brander E, Rusanen E, Grayston JT. 1985. An epidemic of mild pneumonia due to an unusual strain of *Chlamydia psittaci*. *J Infect Dis* 151;832–9.

Scidmore-Carlson M A, Shaw E I, Dooley C A, Fischer E R, Hackstadt T. 1999. Identification and characterization of a *Chlamydia trachomatis* early operon encoding four novel inclusion membrane proteins. *Mol Microbiol* 33; 753–765.

Stephens R S, Koshiyama K, Lewis E, Kubo A. 2001. Heparin-binding outer membrane protein of *Chlamydiae*. *Mol Microbiol* 40; 691–699.

Su H, Raymond L, Rockey D D, Fischer E, Hackstadt T, Caldwell H D. 1996. A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93; 11143–11148.

Tischer Matthias. 2004. Der Nachweis von *Simkania negevensis* im oberen Respirationstrakt bei Kindern in Thüringen. [Dissertation] Institut für Medizinische Mikrobiologie. Jena, Friedrich Schiller Universität Jena.

Trehanne J D, Forsey T, Thomas BJ. 1983. Chlamydial serology. *Br Med Bull* 39;194-200.

Tuuminen T, Palomäki P, Paavonen J. 2000. The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections. *J Microbiol Methods* 42;265-79.

Verkooyen R P, Willemsse D, Hiep-van Casteren S C, Joulandan SA, Snijder R J, van den Bosch J M, van Helden H P, Peeters M F, Verbrugh H A. 1998. Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections. *J Clin Microbiol* 36;2301-7.

Wang S. 2000. The Microimmunofluorescence Test for *Chlamydia pneumoniae* Infection: Technique and Interpretation. *The Journal of Infectious Diseases* 181;421–25.

Ward M E. 1983. Chlamydial classification, development and structure. *Brit Med Bull* 39; 109-15.

Wehrle W, Brinkmann V, Jungblut P R, Meyer T F, Szczepek A J. 2004. From the inside out-processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells. *Mol Microbiol* 51; 319–334.

Welte T, Köhnlein T. 2009. Global and local epidemiology of community-acquired pneumonia: the experience of the CAPNETZ Network. *Semin Respir Crit Care Med* 30;127-35.

Woodhead M. 2002. Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns. *Eur Respir J Suppl* 36; 20-27.

Woodhead M. 2009. The European vision of community-acquired pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* 30; 136-45.

Yamaguchi T, Yamazaki T, Inoue M, Mashida C, Kawagoe K, Ogawa M, Shiga S, Nakagawa Y, Kishimoto T, Kurane I, Ouchi K, Ohzeki T. 2005. Prevalence of antibodies against *Simkania negevensis* in a healthy Japanese population determined by the microimmunofluorescence test. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43;21-7.

8.2 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Straube, Leiter des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für die Bereitstellung des Probenmaterials, Anregungen, konstruktive Kritik und Unterstützung während des Entstehungsprozesses der Arbeit sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts;

Herrn Dr. J. Rödel, Privatdozent am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für seine Anregungen und Beratung bei der Etablierung der Nachweismethode und Bewertung des IFT;

den Herren Dr. M. Hartmann, ehemaliger Mitarbeiter am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, und Dr. K. H. Schmidt, Chemiker am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für die Bereitstellung des Serums eines mit *Simkania negevensis* hyperimmunisierten Kaninchens;

Frau Gisela Gaschler, Laboringenieurin und ehemalige Betreuerin des Konsiliarlabors für Chlamydien am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für ihre umfangreiche Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit bei der Einführung in die indirekte Immunfluoreszenz und bei der Adaptation der Nachweismethode;

Frau Kathrin Prager und Frau Beate Haschke, Medizinisch-technische Assistentinnen am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für ihre Hilfsbereitschaft bei der Lösung der vielen kleinen Probleme und

meiner Partnerin Andrea Morales für ihre Geduld und ihr Verständnis.

8.3 Ehrenwörtliche Erklärung

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

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

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. E. Straube und Frau Gisela Gaschler,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Weimar, den 01.10.2010

Dirk Schilder