Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ. Prof. Dr. med. K. Pfeffer

Detektion und Differenzierung der Lymphogranuloma venereum assoziierten L-Serovare von *Chlamydia trachomatis* mittels TaqMan-PCR.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anke Schaeffer

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf Dekan

Referentin: Prof. Dr. Birgit Henrich

Korreferent: Prof. Dr. Ralf Kubitz

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Sexuell übertragbare Erkrankungen	1
1.2	Die Familie der <i>Chlamydiaceae</i>	2
1.2.1	Chlamydia trachomatis	3
1.3	Epidemiologische Hintergründe	10
1.4	Ziel dieser Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Bakterienstämme	13
2.1.2	Klonierungsvektoren	14
2.1.3	Enzyme	14
2.1.4	DNA-Marker (Längenstandards)	14
2.1.5	Ausgewählte Sequenzen der Datenbank des "National Center Biotechnology Information" (www.ncbi.nlm.nih.gov)	of 15
2.1.6	Mastermixe	15
2.1.7	Primer und Sonden	15
2.1.8	Kits	17
2.1.9	Gebrauchsmaterialien, Geräte, Chemikalien	17
2.1.10	Puffer und Lösungen	18
2.1.11	Medien	19
2.2	Methoden	20

2.2.1	Herkunft der Patientenproben	20
2.2.2	Probenaufschluss von Urethral- und Rektalabstriche	20
2.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.2.4	Nukleinsäureaufreinigung	25
2.2.5	Ligation	26
2.2.6	Klonierung	27
2.2.7	Kultivierung und Lagerung der Bakterien	28
2.2.8	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	29
2.2.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	29
2.2.10	Sequenzierung	30
2.2.11	Herstellung von Quantifizierungsstandards	31
2.2.12	Computergestützte Analysemethoden	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Ausgangssituation	32
3.2	Verwendung der CTra-AB-TaqMan-PCR zur Charakterisierung der L-Serovare	33
3.3	Entwicklung einer TaqMan-PCR zur Identifikation der Serovare L1-L3	35
3.3.1	Design der LGV1-, LGV2- und LGV3-TaqMan-PCR am <i>polymorphic-protein H</i> (<i>pmpH</i>)-Gen	35
3.3.2	Spezifität und Sensitivität der LGV1-, der LGV2- und der LGV3-TaqMan- PCR	36
3.4	Entwicklung der CTra-LGV-Duplex-PCR	38
3.4.1	Entscheidung zur Verwendung der LGV2-TaqMan-PCR in der CTra-LGV- Duplex-PCR	38

3.4.2	Validierung der CTra-LGV-TaqMan-PCR	40
3.5	Entwicklung eines TaqMan-PCR-Sets zur Differenzierung der Serotypen L1,	
	L2 und L3: erste Ergebnisse	46
3.5.1	Design L1-, L2- und L3-spezifischer TaqMan-PCR	46
3.5.2	Die Sensitivität der L1/L2/L3-TaqMan-PCR	48
3.5.3	Isolatetestung in der L1- der L2- und der L3-TaqMan-PCR	50
3.6	Besonderheiten des L2b-Serovars	51
3.6.1	L123-TaqMan-PCR	52
3.6.2	L1L2-TaqMan-PCR	53
4	Diskussion	55
5	Zusammenfassung	62
6	Literaturverzeichnis	64
7	Abkürzungsverzeichnis	82

1 Einleitung

1.1 Sexuell übertragbare Erkrankungen

Sexuell übertragbaren Erkrankungen (STDs) werden in erster Linie im Rahmen von sexuellen Kontakten von Person zu Person weitergegeben. Einige können aber auch von infizierten Müttern während der Schwangerschaft oder der Geburt auf ihre Kinder übertragen werden. Zu den durch Bakterien verursachten Geschlechtskrankheiten zählen u. a. Syphilis (durch *Treponema pallidum*), Gonorrhoe (durch *Neisseria gonorrhoeae*), Ulcus molle (durch *Haemophilus ducreyi*) und Infektionen mit *Chlamydia trachomatis* (siehe Kap. 1.2.1). Außerdem können Viren (z. B. humanes Immundefizienz-Virus (HIV), Herpes simplex Virus Typ 2, humanes Papillomavirus, Hepatits B Virus, Zytomegalievirus) oder Pilze (z. B. *Candida albicans*) sowie Protozoen (z. B. *Trichomonas vaginalis*) Verursacher von STDs sein [1, 2].

Da immer mit Mehrfachinfektionen gerechnet werden muss, empfiehlt u. a. das Koch-Institut (RKI) bei Patienten mit Gonorrhoe oder Robert einer Chlamydieninfektion zwei bis vier Wochen nach Therapie ein Screening auf Syphilis und das humane Immundefizienz-Virus (HIV) durchzuführen [3]. STDs spielen in Bezug auf eine HIV-Infektion auch dahingehend eine Rolle, dass eine unbehandelte genitale Infektion das Risiko des Erwerbes (u. a. durch Störung der Mukosabarriere und durch erhöhte Anzahl an CCR5-positiven CD14-Zellen [4, 5]) sowie auch der Übertragung von HIV (z. B. erhöhte Virusreplikation bei Herpes simplex Virus Typ 2 Koinfektion [6]) steigert [7].

Die Verbreitung der STDs in Deutschland beleuchteten Sentinel-Untersuchungen des Robert Koch-Institutes. Im Zeitraum von November 2002 bis Juli 2004 wurden insgesamt 3.021 Fälle von STDs gemeldet. Eine Chlamydieninfektion hatte in dieser Erhebung einen Anteil von 21,3 % und stellte somit noch vor der Gonorrhoe (15,2 %) und der Syphilis (15,6 %) die häufigste STD dar [8]. Von Januar 2003 bis Juni 2005 stieg der Anteil der Chlamydieninfektion auf 25 %. Laut des Robert Koch-Institutes könnten die Chlamydieninfektionen hierbei eher untererfasst sein, womit die Bedeutung der Chlamydiose unter den sexuell übertragbaren Erkrankungen in Deutschland umso deutlicher wird [9].

1.2 Die Familie der Chlamydiaceae

Der Familie der *Chlamydiaceae* gehören humanpathogenen Spezies an, welche der Gattung der *Chlamydia* und *Chlamydophila* zuzuordnen sind [10]. Die humanpathogenen Spezies *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), *Chlamydophila pneumoniae* und *Chlamydophila psittaci* sind ursächlich für unterschiedliche Krankheitsbilder und typisch für verschiedene Infektionsorte (vgl. Tab. 1) [11].

Tab. 1: Humanpathogene Spezies der Gattung der *Chlamydia* und *Chlamydophila* mit den durch sie verursachten Krankheitsbildern und deren Komplikationen [1, 11, 12].

SPEZIES	KRANKHEITSBILDER	KOMPLIKATIONEN
Chlamydia trachomatis	Urogenitalinfektionen (Serovar D-K)	Aszendierende Infektion, Sterilität, Extrauteringravidität, Infertilität, Harnröhrenstrikturen, Perihepatitis, reaktive Arthritis, Reiter-Syndrom (Trias: Arthritis, Konjunktivitis, Urethritis).
	Neugeboreneninfektionen	
	(Serovar D-K)	
	Einschlusskörperchen-	Pannusbildung
	konjunktivitis (Serovar D-K)	
	Lymphogranuloma venereum (Serovar L1-L3)	Fisteln, Strikturen, Elephantiasis genitoanorectalis
	Trachom (Serovar A-C)	Entropium, Pannusbildung, Erblindung
Chlamydophila pneumoniae	Atypische Pneumonie	
Chlamydophila psittaci	Atypische Pneumonie, Ornithose	Kreislaufdekompensation, Myokardschaden, Thrombophlebitis

Neben Pneumonien, die durch *Chlaymdophila pneumoniae* und *Chlamydophila psittaci* hervorgerufen werden, führt *C. trachomatis* zu okularen und urogenitalen Infektionen sowie auch Neugeboreneninfektionen (vgl. Kap. 1.2.1). *Chlamydophila pneumoniae* wird auch als Kofaktor bei der Entstehung der koronaren Herzkrankheit diskutiert [1].

Chlamydien sind gramnegative, unbewegliche Bakterien und leben aufgrund fehlender eigener ATP-Synthese obligat intrazellulär [13]. Es gibt zwei

Erscheinungsformen der Chlamydien: das extrazelluläre Elementarkörperchen stellt die infektiöse Form dar. Es gelangt über Phagozytose in die Zielzelle und wandelt sich dort zum nichtinfektiösen Initialkörperchen um, welches sich durch Teilung vervielfältigt. Durch Ruptur der Reproduktionsvakuole, dem Einschlusskörperchen, werden die durch erneute Umwandlung (Kondensation) gebildeten Elementarkörperchen frei und infizieren weitere Zielzellen [2].

1.2.1 Chlamydia trachomatis

1957 wurde *Chlamydia trachomatis* erstmals von Tang und Mitarbeitern isoliert [14]. Inzwischen sind über 20 Serovare von *C. trachomatis* bekannt [15, 16, 17], welche sich in drei den Krankheitsbildern entsprechende Untergruppen gliedern lassen: Serovar A-C (Trachom), Serovar D-K (Urogenital- und Neugeboreneninfektionen, Einschlusskörperchenkonjunktivitis) und die L-Serovare (Lymphogranuloma venereum) (vgl. Tab. 1) [2,18]. Zusätzlich gibt es durch genetische Analysen entdeckte Mosaik-Typen, die sich aus verschiedenen Serovaren zusammensetzen: den B/D-Mosaiktyp [19], den Ba/D-Mosaiktyp [20], und L1/L2-Mosaiktypen [21].

Ubertragen werden die Erreger sexuell, durch Schmierinfektion oder während der Geburt. Der Mensch ist alleiniges Erregerreservoir. Die Inkubationszeit beträgt in der Regel für eine urogenitale Infektion mit den Serovaren D-K ein bis drei Wochen, maximal bis zu sechs Wochen [1]. Für eine Lymphogranuloma venereum (LGV)-Infektion zeigt sich eine Inkubationszeit von 3-30 Tagen [22].

In den westlichen Ländern sind v. a. die Urogenital- und Neugeboreneninfektionen, hervorgerufen durch die Serovare D-K, von Bedeutung. Dahingegen spielt in den tropischen Ländern zusätzlich u. a. das durch die Serovare L1-L3 verursachte Lymphogranuloma venereum eine große Rolle (vgl. Kap. 1.2.1.1) [11].

Der häufig asymptomatische Verlauf der Urogenitalinfektion (bei Frauen in bis zu 80 % der Fälle) bleibt oft unerkannt und kann untherapiert oder inadäquat behandelt z. B. zu Extrauterin-Gravidität, tubärer Infertilität oder chronischen Bauchbeschwerden führen [1, 8]. Eine reine klinische Diagnostik kann also häufig unzuverlässig und nicht ausreichend zielführend sein.

1.2.1.1 Lymphogranuloma venereum

Für die sexuell übertragbare Erkrankung Lymphogranuloma venereum (LGV) sind die Serovare L1, L2, L2a, L2b und L3 verantwortlich [15, 17, 22].

Der Krankheitsverlauf des Lymphogranuloma venereum kann in drei Stadien eingeteilt werden. Nach einer Inkubationszeit von 3-30 Tagen kommt es an der Eintrittspforte des Erregers (bei Männern typischer Weise die Vorhaut oder die Eichel des Penis; bei Frauen meistens die Vulva, die Vaginawand oder die Zervix uteri) zu einer papulösen, schmerzlosen und selbstlimitierenden Primärläsion, welche ulzerös zerfallen und unbemerkt oder gar nicht auftreten kann. Nach einigen Wochen kommt es im zweiten Stadium zu einer Lymphadenopathie teils begleitet von systemischen Zeichen wie Fieber, Myalgien und/oder Kopfschmerzen. Es können die inguinalen Lymphknoten (meist unilateral und häufiger bei Männern), der Anus, das Rektum oder bei extragenitaler Eintrittspforte auch andere Lymphknotenregionen betroffen sein. Bei Patienten, die analen Sexualverkehr hatten, kann eine Proktitis auftreten [22].

In einer Studie aus Rotterdam konnten Hinweise gefunden werden, dass eine LGV-Proktitis mehr rektale Symptome wie Schmerzen und auch häufiger andere klinische Manifestationen wie z. B. Blutungen zeigte als eine rektale Infektion mit den Serovaren D-K [23].

Erfolgt keine Therapie, geht die Krankheit in ein chronisches Stadium über, welches mit fibrösen Einschlüssen der Lymphbahnen einhergeht, woraus sich eine Elephantiasis der betroffenen Körperregionen entwickeln kann. Bei Befall des Rektums kann es zu Strikturen und Fisteln kommen [2, 22].

Differentialdiagnostisch müssen bei genitalen Ulcera u. a. folgende Infektionserreger berücksichtigt werden: Herpes simplex Virus Typ 2 (Herpes genitalis), *Haemophilus ducreyi* (Ulcus molle), *Calymmatobacterium granulomatis* (Granuloma inguinale) und *Treponema pallidum* (Syphilis). Im Stadium der Lymphadenopathie müssen wiederum genitale Infektionen wie z. B. das Ulcus molle, Herpes genitales oder Syphilis sowie auch andere entzündliche Herde bedacht werden. Bei generalisierter Lymphadenopathie spielen differentialdiagnostisch zusätzlich u. a. eine HIV-Infektion oder ein Lymphom eine Rolle [22].

Lymphogranuloma venereum zählt zu den meldepflichtigen Erkrankungen, wenn zwei oder mehr gleichartige Erkrankungen auftreten und diese wahrscheinlich in epidemiologischen Zusammenhang stehen [24].

1.2.1.2 Therapie

Die Therapie einer Infektion mit *C. trachomatis* erfolgt über mindestens zwei Wochen mit Tetrazyklinen (z. B. Doxycyclin), Makroliden (z. B. Erythromycin oder Azithromycin) oder Chinolonen (z. B. Levofloxacin) [11], wobei eine einmalige Gabe von 1 g Azithromycin zur Therapie der unkomplizierten urogenitalen Infektion mit *C. trachomatis* ausreicht [24].

Eine Sonderstellung nimmt die Behandlung des Lymphogranuloma venereum ein, wo als Mittel der Wahl eine Therapie mit Doxycyclin 100 mg zweimal täglich über mindestens 21 Tage gilt [25]. Abweichend ist auch hier die Gabe von anderen Antibiotikaklassen, z. B. Makroliden (z. B. Erythromycin) oder Cephalosporinen (z. B. Ciprofloxacin) möglich [1].

1.2.1.3 Präventivmaßnahmen

Zur Vermeidung genitaler Chlamydieninfektionen ist ein wichtiger Schritt die allgemeine Aufklärung sowie Information über die Vermeidung von sexuell übertragbaren Krankheiten und die Expositionsprophylaxe [24]. Seit 1995 ist eine Screening-Untersuchung für Schwangere in den Mutterschaftsrichtlinien verankert und in Deutschland in die Schwangerenvorsorge integriert [26]. Eine rechtzeitige und adäquate Therapie der Schwangeren kann so Neugeboreneninfektionen verhindern [24]. Die Mitbehandlung der Sexualpartner innerhalb der letzten 60 Tage bei vorliegender Infektion ist immer empfehlenswert [24].

Besonders entscheidend sind präventive Maßnahmen bei Risikopatienten. Als Hauptrisikofaktor für eine Infektion mit *C. trachomatis* zählt das Alter [27]. So zeigte eine Beobachtung an jungen Mädchen in Berlin eine steigende Prävalenz mit zunehmendem Alter während der Pubertät [28]. Risikofaktoren für eine Chlamydieninfektion sind außerdem u. a. häufig wechselnde Sexualpartner und fehlender Gebrauch von Kondomen [27]. Eine Studie von Dunne und Mitarbeitern zeigte so z. B., dass eine signifikante Assoziation zwischen dem konsequenten

Gebrauch von Kondomen und einer 90 % igen Reduktion der Infektionsprävalenz mit *C. trachomatis* bei exponierten Patienten besteht [29]. Eine entscheidende Zielgruppe der Prävention sind HIV-positive Patienten (vgl. Kap.1.1) und MSM, welche einen höheren Anteil v. a. an einer Infektion mit dem Serovar L2 haben, was verschiedene epidemiologische Untersuchungen zeigten (vgl. Kap. 1.3).

1.2.1.4 Diagnostische Möglichkeiten einer Infektion mit Chlamydia trachomatis

Zur Diagnose einer Infektion mit *C. trachomatis* stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Der Organismus kann in klassischer Zellkultur vermehrt werden unter Infektion von z. B. HeLa-229- oder McCoy-Zellen [22, 30, 31], die nach zwei Tagen in der Immunofluoreszenz auf das Vorhandensein von Einschlusskörperchen untersucht werden.

Die serologische Diagnostik einer Chlamydieninfektion kann durch genus-spezifische Tests (z. B. Komplementfixation) erfolgen, welche eine Infektion mit einer *Chlamydiaceae*-Spezies nachweisen, aber nicht zwischen einer Infektion durch *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila psittaci* und *Chlamydophila pneumoniae* differenzieren können [22, 32].

In der *C. trachomatis* Diagnostik wurde in den 60er Jahren von Wang und Mitarbeitern der "mouse toxicity prevention test" (MTPT) etabliert [33, 34] und in den 70er Jahren folgten von der Arbeitsgruppe Wang Experimente mit Mikroimmunfluoreszenz-(MIF)-Untersuchungen [33, 35, 36]. Die polyklonalen Antikörper wurden im Verlauf durch spezifischere monoklonale Antikörper ersetzt [33, 37, 38]. Lange galt die spezies-spezifische MIF-Untersuchung als Goldstandard der Chlamydiendiagnostik [39-41]. Auch Enzym-gekoppelte Immunadsorptionstests kommen zum Einsatz [13, 39, 42].

Immunologische wie auch genetische Methoden basieren in vielen Fällen auf dem Nachweis des "major outer membrane proteins" (MOMP) bzw. des MOMP kodierenden *omp-1*-Gens [33, 43-45]. Zielsequenzen zur Sero- und Genotypisierung liegen in den variablen Regionen des *omp-1*-Gens [18, 22, 43, 46-49].

Die immunologische Differenzierung der verschiedenen Serovare von *C. trachomatis* wurde bis zur Etablierung der Sequenzierung genutzt [33]. In neuerer Zeit kommen zunehmend molekularbiologische Methoden zur Anwendung [33].

Eine wichtige Rolle spielt seit der Erfindung durch Mullis in den 80er Jahren in der molekularbiologischen medizinischen Diagnostik die Polymerasekettenreaktion (PCR) [50]. Die PCR ist ein sensitives molekulargenetisches Nachweisverfahren für die *in vitro* Vervielfältigung spezifischer Nukleinsäureabschnitte. Zyklisch wird die von den Primerpaaren eingerahmte Gensequenz unter Verwendung der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) bei Anwesenheit von Magnesium-Ionen mit Hilfe der thermostabilen Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* vervielfältigt. Im ersten Schritt werden die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Doppelstränge einer Probe bei 95 °C getrennt (Denaturierung). Nach Senkung der Temperatur unter die Schmelztemperatur der Primer können diese an die für sie spezifische Sequenz binden (Primerhybridisierung) und die Taq-DNA-Polymerase verlängert in 3'-Richtung den so begonnenen zweiten Strang (Elongation). Alle neu gebildeten Amplikons dienen in nachfolgenden Zyklen als Matrize, so dass die Zielsequenz exponentiell vervielfältigt wird.

Am hiesigen Institut wurde 2003 eine TaqMan-PCR zur Detektion urogenitaler Keime etabliert, die den Nachweis von *C. trachomatis* über Amplifikation eines *omp-1*-Genbereichs ermöglicht, jedoch keine Differenzierung der vorliegenden Serovare zuließ [51].

Das Prinzip der TaqMan-PCR (siehe Abb. 1) beruht auf dem Einsatz einer Sonde mit einer spezifischen Sequenz, welche in dem von den verwendeten Primern begrenzten DNA- Abschnitt bindet.



Abb. 1: Prinzip der TaqMan-PCR.

Schritt 1: Bindung der Sonde. Die Fluoreszenz des Reporters (R) wird vom Quencher (Q) unterdrückt; Schritt 2: Taq-Polymerase (5'-Nukleaseaktivität) spaltet während der Elongation den Reporter ab; Schritt 3: Mit zunehmendem Abstand zwischen Reporter und Quencher nimmt die Intensität des fluoreszierenden Signals zu und wird aufgezeichnet.

An der Sonde befindet sich an ihrem 5'-Ende ein Reporter und an ihrem 3'-Ende ein Quencher. Das fluoreszierende Signal entsteht erst, wenn bei der Amplifikation durch die Taq-DNA-Polymerase der Reporter der gebundenen Sonde vom Quencher abgespalten wird und somit die Fluoreszenz des Reporters durch räumliche Entfernung vom Quencher nicht mehr unterdrückt werden kann. Software-gestützt wird die Intensität des fluoreszierenden Signals in jedem Elongationsschritt der PCR aufgezeichnet. Ist die zu detektierende DNA nicht vorhanden, kommt es im Idealfall

zu keinem Signal. Es könnte aber auch ein sehr spätes Signal gemessen werden, das auf der Amplifikation unspezifischer Fragmente beruht.

Um den Zyklus zu bestimmen, ab dem eine logarithmische Fluoreszenzzunahme zu messen ist, wird Software-gesteuert in jeder Real-time PCR der Threshold-Cycle (Schwellenwert-Zyklus) festgelegt. Eine Probe gilt ab dem Zyklus als positiv, in welchem ihre Amplifikationskurve die Threshold-Gerade schneidet (CT-Wert der Probe).

Zur Bestimmung der in der eingesetzten Patientenprobe vorhandenen Bakterienzahl können Plasmide mit bekannter Kopienzahl als Quantifizierungsstandards eingesetzt werden, die das jeweilige PCR-Produkt als Insert enthalten.

Um eine ausreichende Qualität des Abstrichs und des damit vorliegenden Materials zu gewährleisten und außerdem die Inhibition der PCR-Reaktion auszuschließen, kann die Detektion des humanen *gap*-Gens dienen. Es ist ein in allen Zellen vorhandenes Gen, welches für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodiert, das als Enzym der Glykolyse lebenswichtig ist (vgl. auch Kap. 3.1).

Speziell Infektionen durch die LGV-Serovare wurden früher durch den Frei-Hauttest nachgewiesen, welcher vom Prinzip dem Tuberkulin-Hauttest ähnelt [22]. Heute ist dieses Verfahren nicht mehr üblich. Ersetzt wurde es u. a. durch Betrachtungen der untersuchten Antikörpertiter. So weist ein Antikörpertiter von über 1:128 in einer MIF-Analyse beispielsweise auf eine LGV-Infektion hin [22, 52, 53].

2005 berichtete die Arbeitsgruppe von Morré über die Etablierung einer TaqMan- und einer Rotorgene-PCR, die als Zielgen das *polymorphic protein H (pmpH)*-Gen nutzt, welches für das polymorphe Protein H kodiert [54]. Für *C. trachomatis* wurden bisher 9 *pmp*-Gene identifiziert [55, 56], welche 3,15 % seiner Kodierungskapazität ausmachen [57].

Betrachtet man den phylogenetischen Stammbaum des *pmpH*-Gens (siehe Abb. 2), zeigt dieser eine Aufteilung der Serovare in die entsprechenden Gruppen der Krankheitsbilder wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben [58, 59].





Abb. 2: Phylogenetischer Stammbaum der *C. trachomatis* Serovare basierend auf den Sequenzen des *pmpH*-Gens [58, 59].

Diese damit verbundene genetische Abtrennung der Lymphogranuloma venereum-Serovare stellte einen Ansatzpunkt für molekulargenetische Experimente von Morré und Mitarbeitern dar und erlaubte eine Abgrenzung der L-Serovare von den anderen *C. trachomatis* Serovaren durch die entwickelte Real-time PCR.

2007 entwickelten Chen und Mitarbeiter als weiteren Fortschritt eine Multiplex-Real-time PCR am *pmpH*-Gen, welche die LGV-Serovare detektiert und gleichzeitig von den Nicht-LGV-Serovaren differenziert [60]. Im August 2008 folgte eine weitere Veröffentlichung der Arbeitsgruppe Chen über eine Quadriplex-Real-time PCR, die LGV- und Nicht-LGV-Serovare sowie Mischinfektionen detektiert und in welcher eine menschliche DNA-Kontrolle zwecks Ausschluss einer PCR-Inhibierung und der Zuordnung des Probenmaterials integriert ist [61].

So zeigten sich in den vergangenen Jahren bedeutende Fortschritte in Bezug auf zeitliche und organisatorische Aspekte in der Diagnostik des LGV.

1.3 Epidemiologische Hintergründe

Die Bedeutung von *C. trachomatis* in der westlichen Welt wird deutlich durch die Tatsache, dass eine *C. trachomatis*-Infektion die häufigste Ursache für eine Geschlechtskrankheit in Europa und auch den United States of America (USA) ist [1]. Eine Infektion mit den L-Serovaren und das damit assoziierte Krankheitsbild des Lymphogranuloma venereum sind in Teilen von Südamerika, Afrika, Asien und der

Karibik endemisch vorzufinden, spielten aber in den Industrieländern weiterhin eine untergeordnete Rolle [22].

Interessant ist die Entwicklung der L2-Serovar Verbreitung in Europa in den letzten Jahren. 2003 erschien ein Fallbericht über den ersten in einer Rotterdamer Klinik diagnostizierten LGV-Fall durch das L2-Serovar bei einem bisexuell orientierten Mann, der außerdem eine HIV-positive Serologie aufwies [62]. Weiterführende Untersuchungen in den Niederlanden sicherten zwischen April und Dezember 2003 weitere LGV-Infektionen [63]. Durch diese Berichte alarmiert, konnten retrospektiv zusätzliche LGV-Fälle für das Jahr 2003 identifiziert werden [64]. Bis September 2004 waren schon 62 gesicherte LGV-Infektionen aktenkundig, wobei 23 von 30 MSM-Patienten, von denen eine HIV-Serologie vorlag, HIV-positiv waren [64].

Auch in Deutschland wurde 2003 über eine zunehmende Fallzahl an LGV in Hamburg berichtet [65] und in Ulm erweckte ein LGV-Fall ebenfalls das wissenschaftliche Interesse [66]. Dem Robert Koch-Institut wurden zwischen Mai 2004 und November 2005 insgesamt 78 LGV-Fälle gemeldet, von denen 61 durch eine Genotypisierung als LGV-Fälle zu bestätigen waren, welche alle dem Serotyp L2 zugeordnet werden konnten. 50 der gesicherten Fälle betrafen MSM, bei elf Fällen blieb die sexuelle Orientierung unbekannt. 42 gesicherte LGV-Patienten hatten einen HIV-positiven Serostatus [67]. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass LGV unter MSM im Beobachtungszeitraum endemisch geworden sein könnte [67].

Passend zu der Entwicklung in Deutschland wurden auch in Frankreich, England und Spanien LGV-Infektionen diagnostiziert [68-70].

Auch außerhalb Europas gewannen die LGV-Infektionen und speziell die Infektionen mit dem L2-Serovar an Bedeutung. So wurde im August 2004 in Melbourne (Australien) bei einem Patienten das L2-Serovar nachgewiesen [71]. Eine Untersuchung zwischen Oktober 2005 und Juli 2006 in Darlinghurst (Australien) konnte vier L2b-Infektionen bei HIV-positiven MSM nachweisen [72]. 22 LGV-Fälle weckten in Canada zwischen Februar und Mai 2005 das Interesse [73].

Auffällig waren die Dominanz des L2b-Serovars in vielen Berichten und die Häufung der LGV-Fälle in der Gruppe der MSM und unter HIV-infizierten Patienten [vgl. 68-70, 72]. Morré und Mitarbeiter konnten die immense Bedeutung der L2b-Variante sowohl bei den neueren LGV-Infektionen in Amsterdam als auch bei den retrospektiv

betrachteten Fällen von 2000 und sogar von 1980 in San Francisco in einer Studie zeigen [74]. Die in Kapitel 1.2.1.1 bereits erwähnte Studie aus Rotterdam beschrieb eine signifikante Assoziation einer Proktitis durch L(2b)-Serovare mit einer HIV-positiven Serologie und mit einer hohen Sexualpartnerzahl in den letzten sechs Monaten [23].

Insgesamt kann also davon ausgegangen werden, dass eine Infektion mit dem Serovar L2b in Europa zunehmend an Bedeutung gewinnt und vor allem in der Bevölkerungsgruppe der MSM und unter Patienten mit einem positiven HIV-Serostatus eine wichtige Rolle spielen wird.

1.4 Ziel dieser Arbeit

In Anbetracht der epidemiologischen Entwicklung (siehe Kap. 1.3) ist eine schnelle und zuverlässige Identifizierung und Differenzierung der LGV-Serovare von *C. trachomatis* wünschenswert, um Patienten adäquat therapieren zu können und so eine weitere Ausbreitung bestmöglich einzudämmen. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung einer TaqMan-PCR, die *C. trachomatis* zuverlässig detektiert und gleichzeitig eine Aussage über die Zuordnung zu den LGVassoziierten-Serovaren ermöglicht als auch die Etablierung von TaqMan-PCRs zur Identifizierung und Differenzierung der L-Serovare L1, L2 und L3.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

BAKTERIENART/ MIKROORGANISMUS	QUELLE/ REFERENZ
<i>E.coli</i> -Stamm DH5α	Gibco BRL Life Technololgies
Chlamydia trachomatis: Serovar L2b	Patientenisolat SP-234 (2004) des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Heinrich- Heine-Universität Düsseldorf
Chlamydia trachomatis:	T. Meyer, Labor Lademannbogen,
Serovar D, E, F, G, J	Hamburg
Chlamydia trachomatis: Serovar L1-, L2- und L3	Servaas A. Morré (Amsterdam, Niederlande)
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> (TW-183)	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
Chlamydophila pneumoniae, Chlamydia muridarum, Chlamydophila pecorum, Chlamydophila psittaci	Servaas A. Morré (Amsterdam, Niederlande)
Acinetobacter baumannii Campylobacter jejuni Candida albicans Enterococcus faecalis Escherichia coli Haemophilus influenza Klebsiella pneumoniae Lactobacillus casei Mycoplasma genitalium Mycoplasma genitalium Mycoplasma pneumoniae Neisseria meningitidis Pasteurella multocida Pseudomonas aeruginosa Salmonella enteritidis Shigella sonnei Staphylococcus aureus Streptococcus agalactiae Ureaplasma parvum Ureaplasma urealyticum	Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf

2.1.2 Klonierungsvektoren

PLASMID	GRÖSSE	RESISTENZ- GEN	CHARAKTERISTIKA	QUELLE/ REFERENZ
pGEM [®] -T	3003 bp	Amp	lacZ'Gen, T7- und SP6- Promotor, f1-ori	Promega, Madison, WI, USA
pGEM [®] -T Easy	3015 bp	Amp	lacZ'Gen, T7- und SP6- Promotor, f1-ori	Promega, Madison, WI, USA

2.1.3 Enzyme

ENZYM	FIRMA
Pvull (Restriktionsendonuklease)	Fermentas, Burlington, Ontario, Canada
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
T4-DNA-Ligase	Roche, Basel, Schweiz
EcoRI (Restriktionsendonuklease)	Roche, Basel, Schweiz
Proteinase K	Roche, Basel, Schweiz
RNAse A	Roche, Basel, Schweiz

2.1.4 DNA-Marker (Längenstandards)



C trachomatis	Akzessionsnummer	Akzessionsnummer
Serovar	MOMP-Gen	pmpH-Gen
A	DQ064279	AY184155
В	DQ064281	AY184156
Ва	DQ064282	AY184157
С	DQ064298	AY184158
D	AF414953	AY184159
Da	AF063209	
E	AF063211	AY184160
F	DQ064287	AY184161
G	AF063199	AY184162
Н	DQ064289	AY184163
	DQ063200	AY184164
la	DQ063201	
J	DQ064292	AY184165
Ja	AF202458	
К	DQ064293	AY184166
L1	DQ064294	AY184167
L2	DQ064295	AY184168
L2a	AF304858	
L2b	DQ217607	EF534758
L3	DQ064296	AY184169

2.1.5 Ausgewählte Sequenzen der Datenbank des "National Center of Biotechnology Information" (www.ncbi.nlm.nih.gov)

2.1.6 Mastermixe

Die Sybergreen- (RT-SN2X+NRFL) und Universal-Mastermixe (ohne ROX) (RT-QP2X-03NR) für Real-time PCR wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen.

2.1.7 **Primer und Sonden**

Die Primer und Sonden wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland) und Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen und mit dem vom Hersteller angegebenen Volumen Aqua dest. auf 100 pmol/µl (100 µM) verdünnt. Aus diesen Stocklösungen wurden durch Verdünnung mit 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) die Gebrauchslösungen der Primer auf 3 µM und die der Sonden auf 2 µM eingestellt.

Tab. 2: Primer und Sonden.

PCR	ZIEL- GEN	AKZESSION- NUMMER	GEN- REGION	NAME	SEQUENZ 5` \rightarrow 3`
CTra	MOMP	(AF063200)	124-193	CTra-F	GGT TTC GGC GGA GAT CCT
				CTra-R1	AGT AAC CAA CAC GCA TGC TGA T
				CTra-R2	AGT AAC CCA TAC GCA TGC TGA T
				CTra-S	FAM- CTT GCA CCA CTT GGT GTG ACG C-
					TAMRA
LGV1	ртрН	L1 AY184167	364-439	LGV-F1	TCT CCT TTA TCT ACT GTG CCA ACC T
		L2 AY184168		LGV-R1	TAG ACC CTT TCC GAG CAT CAC T
		L3 AY184169		LGV-S1	HEX- TCA TCA ACT CCG CCT GCT CCA ACA
		L2b EF534758			G-BHQI
LGV2	ртрН	L1 AY184167	377-438	LGV-F2	CTG TGC CAA CCT CAT CAT CAA
		L2 AY184168		LGV-R2	AGA CCC TTT CCG AGC ATC ACT
		L3 AY184169		LGV-S23	HEX- CCG CCT GCT CCA ACA GTT AGT GAT
		L2b EF534758			G-BHQI
LGV3	ртрН	L1 AY184167	378-436	LGV-F3	TGT GCC AAC CTC ATC ATC AAC
		L2 AY184168		LGV-R3	ACC CTT TCC GAG CAT CAC TAA C
		L3 AY184169		LGV-S23	HEX- CCG CCT GCT CCA ACA GTT AGT GAT
		L2b EF534758			G-BHQI
K+	gap	BT006893	152-221	Gap-F	CCA CCC ATG GCA AAT TCC
				Gap-R	ATG GGA TTT CCA TTG ATG ACA AG
				Gap-S	FAM-TGG CAC CGT CAA GGC TGA GAA CG-
					BHQI
L1	MOMP	DQ064294	449-532	L1-F	CAG CAT CTT TCA ACT TAG TTG GGT TA
				L1-R	AGC TCA TAT TTG GTA CAG CAT CCT T
				L1-S	HEX- TCG GAG ATA ATG AAA ATC AAA GCA
					CGG TCA-BHQI
L2	MOMP	DQ064295	449-542	L2-F	CAG CAT CTT TCA ACT TAG TTG GCT TAT
				L2-R	TGA TCT AAG CTC ATA TTT GGT ACA AGC TTA
				L2-S	FAM- CGG AGA TAA TGA GAA CCA TGC TAC
L3	MOMP	DQ064296	456-544	L3-F	CGC TTC CTT CAA CTT AGT TGG ATT
				L3-R	TCA AAG CAG TGT TAG GAA CAA GCT
				L3-S	TET- TTC GGA ACA AAA ACA CAA TCT ACT
					AAC TTT AAT ACA GCG-BHQI
L123	MOMP	DQ064295	387-542	L123-F	TTG GGA TCG TTT TGA TGT ATT CTG TA
		DQ217607	342-497	L2-R	TGA TCT AAG CTC ATA TTT GGT ACA AGC TTA
L1L2	MOMP	DQ064295	449-542	L1-F	CAG CAT CTT TCA ACT TAG TTG GGT TA
		DQ217607	404-497	L2-R	TGA TCT AAG CTC ATA TTT GGT ACA AGC TTA
				L2-S	FAM- CGG AGA TAA TGA GAA CCA TGC TAC
					AGT TTC AGA-BHQI

2.1.8 Kits

Kit	Bestellnummer	Firma
Rapid-DNA-Ligation Kit	11635379001	Roche, Basel, Schweiz
Nucleo-Spin Extract II	740609.50	Macherey-Nagel, Düren,
		Deutschland
High Pure Plasmid Isolation Kit	11754785001	Roche, Basel, Schweiz

2.1.9 Gebrauchsmaterialien, Geräte, Chemikalien

Gebrauchsmaterialien

MATERIAL	FIRMA
Eppendorf-Tubes	Eppendorf, Hamburg
(Safe-lock Tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	
Parafilm M	Pechiney Plastic Packagig, Chicago, USA
PCR-Platten mit Verschlüssen	Eurogentec, Seraing, Belgien
Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
Sterilpipetten (Costar Stripette)	Corning Incorporated, Schipol-Rijk, NL
Quarzküvetten	Hellma, Jena, Deutschland

<u>Geräte</u>

GERÄT	HERSTELLER
Bakterienschüttler:	Gesellschaft für Labortechnik,
GFL 3015 / GFL 3019	Burgwedel
Brutschrank (HERA cell)	Kendro (Heraeus), Langenselbold
Digitalkamera (Powershot G2)	Canon, Amsterdam, Niederlande
"Pipet-Boy"	Integra Bioscience
Real-time-PCR-Automat: iCycler/ iQ5	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
PCR-Automaten:	Biometra, Göttingen, Deutschland
- T-Gradient	
- T3-Thermocycler	
Photometer UV mini-1240	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
NanoDrop ND-1000	Kisker-biotech, Steinfurt, Deutschland
Kühlschrank	Bosch, Gerlingen, Deutschland
Mikrowelle	AEG, Nürnberg, Deutschland
Schwenker für Gele/Membranen	GFL, Deutschland

Elektrophoresekammern für DNA	Biozym, Hameln, Deutschland
Vortexer (MS2 Mini-Shaker)	IKA [®] , Staufen
Waage (Precisa 600)	Oehmen, Essen, Deutschland
Wasseranlage (Milli-Q-System)	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Wasserbad (thermed 5001 electr.)	GFL, Deutschland
Zentrifugen:	
Biofuge 13	Kendro (Heraeus), Langenselbold
Mini Spin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
(Rotana 46RC)	(Hettich, Bäch, Schweiz)
Universal 32R	Hettich, Bäch, Schweiz
Univapo 150H	Uniequip, Essen, Deutschland

<u>Chemikalien</u>

Alle gängigen Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Sigma, Serva und Invitrogen bezogen.

2.1.10 Puffer und Lösungen

<u>0, 5 x TBE-F</u>	<u>0, 5 x TBE-Puffer (pH 8.0):</u>		45 mM	Tris-B	ase	
			45 mM	Borsä	ure	
			1 mM	EDTA		
<u>6x-DNA-Pro</u>	benpuffer [75	<u>l:</u>	30 % (v/v)		Glycerin	
			0,25 % (w/v)	1	Bromphenolblau	
			0,25 % (w/v)	I	Xylencyanol	
Proteinase-ł	K-Lösung:		45 ml M-TE-	Puffer	+ 5 mg Proteinase K (Roch	e)
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM	Tris/H	CI (pH 8,0)			
	1 mM	EDTA				

Puffer G+ (green) (Fermentas):	10 mM	Tris/HCI (pH 7,5)
	10 mM	MgCl ₂
	50 mM	NaCl
	0,1 mg/ml	BSA
Puffer H (Roche):	50 mM	Tris/HCI (pH 7,5)
	10 mM	MgCl ₂

2.1.11 Medien

LB-Amp-Flüssigmedium und LB-Amp-Agar

LB-Amp-Flüssigmedium: 1 % Natriumchlorid

0,5 %Hefeextrakt

1 % Trypton

LB-Amp-Agar enthielt 20 g Agar/Liter LB-Amp-Flüssigmedium.

Zur Herstellung wurde LB-Flüssigmedium bzw. LB-Agar bei 121 °C und 2 bar für 15 Minuten autoklaviert und danach auf 48 °C abgekühlt. Ampicillin wurde dann in einer Konzentration von 100 μ g/ml zugegen.

SOC-Medium

2 %	Bacto-Trypton
0,5 %	Hefeextrakt
0,05 %	NaCl
2,5 mM	KCI
10 mM	Magnesiumchlorid
20 mM	Glucose
pH 7,0	

2.2 Methoden

2.2.1 Herkunft der Patientenproben

Das Patientenmaterial stammte von Patienten verschiedener Abteilungen des Universitätsklinikums Düsseldorf. Dazu zählten die Station MXI, die dermatologische, gynäkologische, urologische und gastroenterologische Klinik, die Abteilung für Infektiologie sowie die Augenklinik.

2.2.2 Probenaufschluss von Urethral- und Rektalabstriche

Tupfer urogenitaler und rektaler Abstriche wurden zur Diagnostik von der jeweiligen Abteilung des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in 3 ml Transportmedium (MicroTestTMM4[®], Remel) an das "Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene" der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geschickt. Nach Suspension des Tupfer-anhaftendes Materials (durch Schütteln der enthaltenden Glaskügelchen) wurde 1 ml der Suspension zentrifugiert (10 min, Raumtemperatur (RT), 13.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment anschließend in 25 µl PBS-Puffer (GIBCO Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) resuspendiert. Nach Zugabe des 2x Volumens Proteinase K-Puffer (Kap. 2.1.10) wurden die Zellen in 1h iger Inkubation bei 56 °C lysiert und die Proteinase K anschließend für 30 Minuten bei 95 °C inaktiviert. Die Probenlysate wurden bis zum Einsatz in der jeweiligen PCR bei - 20 °C gelagert.

2.2.3 **Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente als zuverlässige Methode zum Nachweis bekannter DNA-Sequenzen (vgl. Kap. 1.2.1.4). Als Positivkontrolle der Güte der Abstriche diente der Nachweis des *gap*-Gens (homo sapiens) (vgl. Kap. 1.2.1.4 und 3.1). Um die Reinheit des jeweiligen PCR-Ansatzes zu testen, wurde als Negativkontrolle Aqua dest. eingesetzt.

2.2.3.1 Konventionelle PCR

Konventionelle PCR-Läufe wurden mit den PCR-Geräten T-Gradient oder T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt und die entstandenen PCR-Produkte danach in einer gelelektrophoretischen Auftrennung analysiert (Kap. 2.2.8). Die PCR-Ansätze setzten sich wie in Tabelle 3 beschrieben zusammen und wurden nach verschiedenen Temperaturprogrammen amplifiziert (siehe Tab. 4).

BEZEICHNUNG	SUBSTANZ	MENGE [µl]
PCR Nr. 1	DNA-Template	1
	Forward-Primer (3 µM)	25
	Reverse-Primer (3 µM)	25
	Roche 2fach PCR-Mastermix	50
PCR Nr. 2	DNA-Template	10
	Forward-Primer (100 µM)	1,5
	Reverse-Primer (100 µM)	1,5
	Roche 2fach PCR-Mastermix	75
	Aqua dest.	62
PCR Nr. 3	DNA-Template	1
	Forward-Primer (3 µM)	37
	Reverse-Primer (3 µM)	37
	Roche 2fach PCR-Mastermix	75
PCR Nr. 4	DNA-Template	1
	Forward-Primer (100 µM)	0,5
	Reverse-Primer (100 µM)	0,5
	10fach-PCR-Puffer (Roche)	10
	D NTP-Mix (200 µM)	16
	Taq Polymerase (5 U/μ) (Invitrogen)	1
	Aqua dest.	71

Tab. 4: PCR-Temperaturprogramme.

PCR-Temperaturprogramm	Schritt	Temperatur	Zeit	
Nr. 1: "taqman1.2.tmo"	1	95 °C	10 Minuten	
	2	95 °C	15 Sekunden	-45 mal
	3	60 °C	1 Minuten	
Nr. 2	1	95 °C	5 Minuten	
	2	95 °C	15 Sekunden	45 mol
	3	0° 00	1 Minuten	-45 mai

2.2.3.2 Real-time PCR

Das Prinzip der Real-time PCR basiert auf einer proportional zu der Menge des Amplikons zunehmenden Intensität eines fluoreszierenden Signals (vgl. Kap. 1.2.1.4). Zur Aufzeichnung und Auswertung der Real-time PCR-Daten wurde mit dem Analyseprogramm "iCycler"/"IQ5" (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) gearbeitet.

Die Real-time PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	50 °C	10 Minuten	
2	95 °C	10 Minuten	
3	95 °C	15 Sekunden	15 mol
4	60 °C	1 Minute	-45 mai

Schritt 1 dient der Zerstörung von eventuell vorhandenen Amplifikaten einer vorherigen PCR. Da in der PCR Uridin statt Thymidin in die Amplikons eingebaut wird, kann zu Beginn jeder neuen PCR durch die im Ansatz vorhandene Amperase (Eurogentec, Seraing, Belgien) jedes eingeschleppte, Uridin-enthaltene Amplikon zerstört werden und die anschließende Amplifikation ausschließlich an die Patienten-DNA erfolgen.

<u>TaqMan-PCR</u>

Folgende Fluoreszenzfarbstoffe wurden eingesetzt (Quelle: Metabion, Planegg-Martinsried, Deutschland):

Fluoreszenzfarbstoff	Emission [nm]	verwendet in
6-FAM (6-Carboxy-Fluorescein)	520	<i>gap</i> -PCR CTra-PCR L2-PCR L1L2-PCR
HEX (Hexachloro-6-Carboxy-Fluorescein)	556	LGV-PCR L1-PCR
TET (Tetrachloro-6-Carboxy-Fluorescein)	536	L3-PCR

Die Ansätze für die *gap*-, CTra-A, CTra-B, CTra-AB-, LGV1/2/3-, L1/2/3- und L1L2-TaqMan-PCR (vgl. Tab. 2, Kap. 2.1.7) wurden wie in Tabelle 5 gezeigt im Mastermix-Raum in die Vertiefungen einer PCR-Platte pipettiert.

	gap (K ⁺)	CTra-A	CTra-B	CTra-AB	LGV1	LGV2	LGV3	CTra-LGV	L1	L2	L3	L1L2
Universal-Mastermix												
(ohne ROX)	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
(Eurogentec)					-				-			
Forward Primer (a)												
Gap-F	2,5 µl	/	/	/	1	/	/	/	/	/	/	/
CTra-F	/	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	1	/	/	1,25 µl	/	/	/	/
LGV-F1	/	/	/	/	2,5 µl		/	/	/	/	/	/
LGV-F2	1	/	/	/	/	2,5 µl	/	1,25 µl	/	/	/	/
LGV-F3	1	1	/	/	1	/	2,5 µl	/	/	/	/	/
L1-F	1	1	/	/	1	/	/	/	2,5 µl	/	/	2,5 µl
L2-F	1	1	/	/	1	/	/	/	/	2,5 µl	/	1
L3-F	1	1	/	/	1	/	/	1	/	/	2,5 µl	/
L123-F	1	1	/	/	1	/	/	1	/	/	/	/
Reverse Primer (a)								-				
Gap-R	2,5 µl	1	/		1	/	/	1	/	/	/	/
CTra-R1	1	2,5 µl	/	1,9 µl	1	/	/	0,95 µl	/	/	/	/
CTra-R2	1	1	2,5 µl	1,9 µl	1	/	/	0,95 µl	/	/	/	/
LGV-R1	1	1	/	/	2,5 µl	/	/	1	/	/	/	/
LGV-R2	1	/	/	/	/	2,5 µl	/	1,3 µl	/	/	/	/
LGV-R3	1	1	/	/	1	/	2,5 µl	1	/	/	/	/
L1-R	/	/	/	/	/	/	/	/	2,5 µl	/	/	/
L2-R	/	/	/	/	/	/	/	1	/	2,5 µl	/	2,5 µl
L3-R	/	/	/	/	/		/	/	/	/	2,5 µl	/
Sonde (b)												
Gap-S	2,5 µl	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
CTra-S	/	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	/	/	/	1,25 µl	/	/	/	/
LGV-S1	/	/	/	/	2,5 µl	/	/	/	/	/	/	/
LGV-S23	/	/	/	/	1	2,5 µl	2,5 µl	1,25 µl	/	/	/	/
L1-S	/	/	/	/	/	/	/	1	2,5 µl	/	/	/
L2-S	1	1	1	1	/	/	/	/	/	2,5 µl	/	2,5 µl
L3-S	1	1	1	1	/	/	/	/	/	/	2,5 µl	/
Aqua dest.	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	1,25 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	1,8 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl

Tab. 5: Ansätze zur Durchführung der *gap*-, CTra-A/B, LGV1/2/3-, L1/2/3- und L1L2-Real-time PCR.

(a) Die Primer wurden in einer Konzentration von 3 μM eingesetzt. (b) Die Sonden wurden in einer Konzentration von 2 μM eingesetzt.

Das Pipettierschema einer 96 Well-PCR-Platte sieht z. B. für die Durchführung der *gap*-, CTra-AB-, LGV2- und CTra-LGV-PCR an 20 Patientenproben (1-20) und unter Einsatz zweier Quantifizierungplasmide (QP 1 und 2) und der Negativkontrolle (K⁻) wie folgt aus:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	QP1	1	3	5	7	9	(11)	(13)	15	17	19	K ⁻	gap
В	QP1	1	3	5	7	9	(11)	(13)	15	17	19	K -	CTra-LGV
С	QP1)		3	5	7	9	11	(13)	15	17	19	K ⁻	CTra-AB
D	QP1	1	3	5	7	9	(11)	13	15	17	19	K ⁻	LGV2
Е	QP2	2	4	6	8	10	12	(14)	16	18	20	K ⁻	gap
F	QP2	2	4	6	8	10	12	(14)	16	18	20	K -	CTra-LGV
G	QP2	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	K -	CTra-AB
Н	QP2	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	<u>(к</u> .)	LGV2

Dem jeweiligen Ansatz wurden jeweils 2,5 µl des zu untersuchenden Probenmaterials, der Quantifizierungsplasmide oder Aqua dest. als Negativkontrolle hinzugefügt, so dass ein Gesamtansatz von 25 µl vorlag. Bei idealem Versuchsablauf blieb die Fluoreszenz der Negativkontrolle bis zum letzten Zyklus unterhalb der Threshold-Geraden.

Real-time PCR ohne Sonde

Durchführung einer Real-time PCR ohne TagManTM-Probe (LGV1-/ Bei Sybergreen-enthaltenden LGV2-/LGV3-PCR) wurde mit einem Mastermix (Eurogentec, Belgien) gearbeitet. Sybergreen interkaliert Seraing, seguenzunabhängig in doppelsträngige DNA-Stränge und entsendet ein fluoreszierendes Signal, dessen Intensität mit der Anzahl der vorhandenen DNA zunimmt. In einem Sybergreen-PCR-Ansatz wurde das sonst eingesetzte Volumen einer Sonde durch Aqua dest. ersetzt (vgl. Tab. 5).

2.2.4 Nukleinsäureaufreinigung

2.2.4.1 Plasmid-DNA-Präparation aus E.coli

Die Plasmid-DNA-Aufreinigung aus Flüssigkulturen Plasmid-tragender *E.coli* Stämme erfolgte unter Verwendung des "High Pure Plasmid Isolation Kits" (Roche, Basel, Schweiz) (vgl. Kap. 2.1.8). Dazu wurden 1,5 ml einer über Nacht-Kultur des jeweiligen *E. coli* Klons (vgl. Kap. 2.2.6.1 und 2.2.7) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann in 250 µl Suspensionspuffer des Kits resuspendiert und nach der Herstelleranleitung der Firma Roche aufgearbeitet.

2.2.4.2 Alkalische Miniplasmid-DNA-Präparation aus E.coli

Sollte die Plasmid-DNA mittels Restriktion charakterisiert werden, wurde sie mittels alkalischer Lyse wie folgt "zu Fuß" präpariert:

SCHRITT	VORGANG
1	1,5 ml einer <i>E. coli</i> Flüssigkultur (Kap. 2.2.6.1 und 2.2.7), 5 Minuten bei 8000-10000 rpm zentrifugieren
2	Überstand verwerfen
3	Pellet in 300 µl Lösung 1 (50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA) aufnehmen und 12 µl RNAse A (10 mg/ml) zugeben
4	Nach Zugabe von 300 µl Lösung 2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS) sanft mischen
5	Kräftig schütteln nachdem 300 µl kalte Lösung 3 (2,55 M Kaliumacetat (pH 4,8)) zugegeben wurden
6	10-15 Minuten bei 13000 rpm zentrifugieren
7	800 µl des Überstandes in ein neues Eppendorf Tube überführen und 640 µl Isopropanol hinzufügen und dann leicht mischen
8	20-30 Minuten bei 4 °C und bei 13000 rpm zentrifugieren
9	Überstand verwerfen
10	Pellets mit 500 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol waschen
11	15 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugieren
12	Überstand verwerfen
13	Pellet trocknen lassen
14	Pellet in 25 µl 10 mM Tris/HCI (pH 7,5) aufnehmen
15	Bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C lagern

2.2.4.3 PCR-Produkt-Aufreinigung

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach den Herstellerangeben verwendet.

2.2.5 Ligation

Die Ligation diente der Einbringung der zu klonierenden DNA-Fragmente (Inserts) in Vektoren. Die Vektoren pGEM-T Easy (Abb. 3) und pGEM-T eigneten sich zur Klonierung von PCR-Produkten besonders, da sie überhängende Thymidinreste aufweisen, welche die durch die Taq-Polymerase am 3'-Ende angehängten Adenosin-Reste binden.



Abb. 3: p-GEM[®]-T Easy-Vektorkarte (Quelle: Promega, Madison, WI, USA).

Die Menge des DNA-Materials im Ligationsansatz (Tab. 6) variierte in Abhängigkeit von der errechneten DNA-Konzentration der aufgereinigten Inserts. Ziel war ein molares Verhältnis des Inserts zum verwendeten Vektor von 3:1 zur Ligation einzusetzen. Es wurde mit dem Rapid-DNA-Ligations-Kit von Roche (siehe Kap. 2.1.8) und nach folgendem Ligationsansatz gearbeitet:

Tab. 6: Ligationsansatz

MATERIAL	MENGE [µl]
pGEM [®] -T Easy bzw. pGEM [®] -T (je 25 ng/ml)	0,5
5fach DNA-Dilutionspuffer	1
2fach T4-DNA-Ligationspuffer	5
T4-Ligase (5 U/μl)	0,5
Aqua dest.	3,5-X1
PCR-Produkt	X1

Als Negativkontrolle wurde ein Ligationsansatz mit der gleichen Menge Vektor und Aqua dest. statt Insert-haltiger Lösung hergestellt. Die Ligationsdauer betrug 30-60 Minuten bei Raumtemperatur.

2.2.6 Klonierung

2.2.6.1 Transformation kompetenter E.coli-Bakterien

Dem Ligationsansatz wurden jeweils 100 µl kompetente Zellen (*E.coli* DH5α; siehe Kap. 2.1.1) zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubationszeit auf Eis folgten 90 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden die Ansätze in 400-600 µl SOC-Medium (Kap. 2.1.11) überführt und 60-90 Minuten bei 37 °C geschüttelt.

Die Gesamtmenge bzw. 9/10 (450-630 μ l) und 1/10 (50-70 μ l) des Transformationsansatzes wurden anschließend auf LB-Amp-Platten (Kap. 2.1.11) ausplattiert und über Nacht (bei 37 °C) inkubiert. Einzelne Klone wurden dann von den Platten gepickt und erneut in einer Real-time PCR auf das Vorhandensein des Inserts überprüft und außerdem in LB-Amp-Flüssigkulturmedium (Kap. 2.1.11) kultiviert (Kap. 2.2.7).

2.2.6.2 Restriktion

Durch hydrolytische Spaltung des Plasmids an einer für die jeweils eingesetzte Restriktionsendonuklease spezifischen Signalsequenz entstanden während der Inkubationszeit von 1 bis 1 ½ Stunden bei 37 °C Restriktionsfragmente, die dann bei gelungenem Ablauf durch Gelelektrophorese dargestellt werden konnten.

Die Erkennungssequenzen und die Schnittstelle der verwendeten Restriktionsendonukleasen Pvull und EcoRI zeigt Abbildung 4.



Abb. 4: Erkennungssequenz und Schnittstelle der Restriktionsendonuklease Pvull ("blunt end") (a) bzw. EcoRI (5'-überhängende Enden) (b).

1-2 µg Plasmid-DNA wurden mit 3 U (Units) der Restriktionsendonuklease Pvull mit hundertprozentiger Aktivität im Puffer G+ (Kap. 2.1.10) bzw. mit 2 U der Restriktionsendonuklease EcoRI mit hundertprozentiger Aktivität im Puffer H (Kap. 2.1.10) eingesetzt.

2.2.7 Kultivierung und Lagerung der Bakterien

Kultivierung in Flüssigmedium

Nachdem einzelne Klone mit Holzpickern von den Platten in einzelne PCR-Ansätze getaucht wurden, wurde die Picker anschließend in 5 ml LB-Amp-Flüssigmedium (Kap. 2.1.11) gegeben und die Klone über Nacht unter Schütteln bei 37 °C kultiviert.

Anfertigung von Gylcerinstöcken zur Lagerung der Bakterien

Zur Herstellung von Glycerinstocks zur Lagerung der *E.coli* Klone bei -70 °C wurden 500 µl der *E.coli*-über Nacht-Kultur zu 500 µl 100 %igem Glycerin gegeben und sanft gemischt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden sie bei -70 °C eingefroren. So wurde eine Lagerungsfähigkeit von mehreren Monaten erreicht.

Sollten die Glycerinstocks bei –20 °C gelagert werden, wurden 400 µl *E.coli*-Kultur und 100 µl 100 %iges Glycerin sanft gemischt und dann ohne Zwischenschritt bei -20 °C tiefgekühlt. Die Lebensdauer der Bakterien war hierbei jedoch deutlich reduzierter (Wochen bis wenige Monate).

2.2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

In der Agarose-Gelelektrophorese können restringierte bzw. amplifizierte DNA-Fragmente basierend auf unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten getrennt werden. Nukleinsäuren wandern wegen ihres konstanten Masse-Ladungs-Verhältnisses aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats im elektrischen Feld zur Anode. Die Laufgeschwindigkeit ist abhängig vom Molekulargewicht und der Konformation der DNA-Moleküle, der Konzentration des Agarosegels und der Stärke des elektrischen Feldes. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurde die Agarose in Konzentrationen zwischen 1 % und 3 % in 0,5 x TBE-Puffer (Kap. 2.1.10) verwendet.

Den DNA-Proben wurde 1/6 vol. (v/v) 6x-DNA-Probenpuffer (Kap. 2.1.10) zugesetzt und das Gemisch in die Taschen eines horizontalen Agarosegels pipettiert. Es wurde eine Spannung von 50 mA angelegt. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE-Puffer (Kap. 2.1.10) und als Längenstandard der DNA-Marker der Firma Fermentas (Kap. 2.1.4).

Nachdem die im Probenpuffer enthaltenen Farbstoffe (Xylencyanol und Bromphenolblau) das Gel zu 1/3 bzw. 2/3 durchlaufen hatten, folgte die Färbung der Gele in Ethidiumbromid-Lösung (0,1-0,5 µg Ethidiumbromid/ml) für 15 Minuten. In Aqua dest. wurden die DNA-freien Bereiche des Gels anschließend für 30 Minuten entfärbt. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht. Die Dokumentation der so visualisierten DNA-Fragmente folgte mit einer Digitalkamera (Kap. 2.1.9).

2.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

DNA-Mengenabschätzung im Agarosegel

Bei Verwendung eines DNA-Markers (siehe Kap. 2.1.4), bei welchem die in den einzelnen Banden vorhandenen Konzentrationen vom Hersteller angegeben wurden, konnte durch optischen Vergleich der Bandenintensität zu einer Bande einer unbekannten Probe auf den DNA-Gehalt der Probe geschlossen werden. Zu berücksichtigen war dabei die eingesetzte Menge sowohl des Markers als auch der Probe.

Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

In 100 µl Quarzküvetten (Kap. 2.1.9) wurde photometrisch die optische Dichte (OD) von Nukleinsäurelösungen bei 260 nm und 280 nm gemessen. Der Nullwert wurde unter Einsatz von 100 µl des verwendeten DNA-Puffers ermittelt.

Danach wurden 5 μ l Puffer entnommen und durch 5 μ l der zu vermessenden DNA-Lösung ersetzt. Da das Absorptionsmaximum von DNA bei 260 nm und das von Proteinen bei 280 nm liegt, sagte das Verhältnis der gemessenen OD₂₆₀ und OD₂₈₀ etwas über die Reinheit der Lösung aus. Ideal waren Werte zwischen 1,7 und 2,1.

Aus der um den Nullwert korrigierten optischen Dichte (OD₂₆₀^{KORR}) ließ sich die Konzentration der gelösten Nukleinsäure nach folgender Formel berechnen:

c [ng/µl] = OD260^{KORR} x F x V

V = Verdünnung (hier 20)

F = 50 ng/µl für doppelsträngige DNA

Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration mit dem Gerät "NanoDrop ND[®]-1000"

Alternativ wurden die aufgereinigten Nukleinsäurelösungen mittels des NanoDrop ND-1000-Gerätes (Kap. 2.1.9) im Zentrallabor des Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vermessen, wobei die Konzentrations- und Reinheitswerte von der dazugehörigen Software automatisch berechnet wurden.

2.2.10 Sequenzierung

Das Zentrallabor des Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf führte die Sequenzierungen nach der Sangermethode auf dem Gerät "3130xl Genetic Analyser" der Firma Applied Biosystems durch. Die Sequenzierung diente der Überprüfung der klonierten Genregionen.

2.2.11 Herstellung von Quantifizierungsstandards

Die Kopienanzahl pro Mikroliter der jeweiligen, zur Quantifizierung eingesetzten Plasmide (vgl. Kap. 1.2.1.4, 3.1 und 3.4.2.1) wurde nach folgender Formel berechnet:

Kopien/ μ l = DNA-Konzentration [ng/ μ l] x (9,133 x 10⁸/kbp (Vektor + Insert))

Im nächsten Schritt wurde die Konzentration der Plasmidlösung mit 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) auf eine Kopienzahl von 1 x 10^{10} Kopien/µl verdünnt sowie logarithmische Verdünnungen von 10^9 bis 10^0 Kopien/µl mit 10 mM Tris/HCl hergestellt.

2.2.12 Computergestützte Analysemethoden

- Laser Gene-Programmpaket (DNASTAR, Madison, WI, USA)
- Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- iCycler/IQ5-Auswertungssoftware (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
3 Ergebnisse

3.1 Ausgangssituation

Zu Beginn der experimentellen Arbeiten war im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene bereits eine TaqMan-PCR zur Detektion von *Chlamydia trachomatis* etabliert, in der eine spezies-spezifische Region des *omp-1*-Gens amplifiziert wird [51]. Um alle Serovare detektieren zu können, wurde diese CTra-TaqMan-PCR unter Verwendung zweier unterschiedlicher Reverse-Primer, CTra-R1 und -R2, durchgeführt (siehe Tab. 2, Kap. 2.1.7).

Um die Güte von Abstrichproben beurteilen zu können, konnte ebenfalls auf eine bestehende TaqMan-PCR als interne Positivkontrolle zurückgegriffen werden, die Sequenzen im humanen *gap*-Gen detektiert (siehe Tab. 2, Kap. 2.1.7).

Abbildung 5 zeigt die Amplifikationskurve des *gap*-Nachweises einer Patientenprobe (Beispielprobe 1507) zu den Quantifizierungsstandards mit 2,5 x 10^5 und 2,5 x 10^2 Kopien/PCR-Ansatz und die Negativkontrolle. Die dazugehörigen CT-Werte und die errechneten Kopienzahlen zeigt Tabelle 7.



Abb. 5: Amplifikationskurven der Patientenprobe 1507 (K⁺), der Negativkontrolle (K⁻) und zweier Standardplasmide (1 = 10^5 Kopien/µl; 2 = 10^2 Kopien/µl) in der *gap*-TaqMan-PCR.

gap ^{FAM}	Kopienzahl/ PCR-Ansatz	CT-Wert					
Standard 1	2,5 x 10 ⁵	21					
Standard 2	2,5 x 10 ²	29					
Probe 1507	2,4 x 10 ⁴	24					
K ⁻ (H ₂ O, Negativkontrolle)	0	- (a)					

Tab. 7: Ergebnisse des gap-TaqMan-PCR-Beispiels (siehe Abb. 5).

(a) "-": kein Schnittpunkt mit der Threshold-Geraden.

Die Daten von Morré und Mitarbeitern aus 2005 [54] stellten unseren Ausgangspunkt zur Etablierung einer TaqMan-PCR zur schnellen und zuverlässigen Diagnostik der Lymphogranuloma venereum (LGV)-Serovare dar (vgl. Kap. 1.2.1.4).

3.2 Verwendung der CTra-AB-TaqMan-PCR zur Charakterisierung der L-Serovare

Wie eingangs bereits erläutert liegt die Zielsequenz der CTra-TaqMan-PCR im *omp-1*-Gen, welches das oberflächen-lokalisierte MOMP-Protein (major outer membrane protein) kodiert. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, bestehen zwischen den *C. trachomatis* Serovaren A-L Sequenzunterschiede in der detektierten Genregion.



Abb. 6: Alignment der in der CTra-TaqMan-PCR amplifizierten MOMP-Genregionen der *Chlamydia trachomatis* Serovare A-L (MegAlign, DNASTAR).

Akzessionsnummern der entsprechenden Sequenzen siehe Kapitel 2.1.5. Divergente Nukleotide sind umrahmt und Basen, in welchen sich die Reverse-Primer CTra-R1 und –R2 unterscheiden, sind markiert (*).

Auffällig war bei Betrachtung der Serovare L1-L3 eine abweichende Base im Serovar L3 in Bezug zu den anderen LGV-Serovaren (L1-L2b).

Um herauszufinden, welcher Reverse-Primer am zuverlässigsten zur Detektion der L-Serovare in der CTra-TaqMan-PCR beitrugen, wurde die Amplifikationseffizienz der Serovare L2b (stellvertretend für L1, L2a und L2b) und L3 in einer CTra-A- (mit Reverse-Primer CTra-R1), CTra-B- (mit Reverse-Primer CTra-R2) sowie CTra-AB-TaqMan-PCR (mit beiden Reverse-Primern) getestet (siehe Tab. 2, Kap. 2.1.7 und Abb. 6).

Wie aufgrund der höheren Sequenzhomologie des CTra-R2-Primers zu den Serovarsequenzen von L1, L2a und L2b schon zu vermuten war, amplifiziert das CTra-B-Primerpaar (CTra-F + CTra-R2) diese L-Serovare wesentlich besser als CTra-(F+R1) (siehe Abb. 7).



Abb. 7: Amplifikationskurven des LGV-Serovars L2b in der CTra-A-, der CTra-B- und der CTra-AB-TaqMan-PCR mit Darstellung der Negativkontrollen (K^{-} , H_2O).

DNA des L3-Serovars zeigte fast identische Ergebnisse in der CTra-A- bzw. der CTra-B-TaqMan-PCR.

Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, passt die Sequenz des CTra-R1-Primers etwas besser zum entsprechenden MOMP-Genabschnitts des L3-Serovars, wohingegen die Sequenz des CTra-R2-Primers besser zur Bindung an die entsprechenden MOMP-Genregionen in den Serotypen L1, L2 und L2b geeignet ist.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden folglich zur optimalen Detektion aller LGV-Serovare, wie auch der Serovare A-K, beide Reverse-Primer verwendet, wobei diese TaqMan-PCR in den folgenden Kapiteln als CTra-TaqMan-PCR bezeichnet ist.

3.3 Entwicklung einer TaqMan-PCR zur Identifikation der Serovare L1-L3

3.3.1 Design der LGV1-, LGV2- und LGV3-TaqMan-PCR am polymorphicprotein H (pmpH)-Gen

Wie in Kapitel 1.2.1.4 erläutert, eignete sich das *pmpH*-Gen zur Differenzierung der LGV-Serovare L1-L3 von den für andere Krankheitsbilder verantwortlichen *C. trachomatis* Serovaren A-K (vgl. Abb. 2, Kap. 1.2.1.4) [58, 59]. Insbesondere eine 36 bp Deletion im *pmpH-Gen* der L-Serovare bot eine optimale Zielsequenz für die jeweilige Sonde, um gezielt die Serovare L1-L3 zu detektieren (vgl. Abb. 8).



Abb. 8: Schematische Darstellung des *Polymorphic Protein-H* (*pmpH*)-Gens mit Hervorhebung der amplifizierten Region in den LGV-PCRs (dunkelgrün markiert).

Die Primer und Sonden der LGV1-, LGV2- und LGV3-PCR sind schematisch eingezeichnet unter Angabe der Start- und Endbasenposition im *pmpH*-Gen bei den verschiedenen Serovaren. Der Sequenzabschnitt zur Selektion der LGV-Serovare ist hellgrün hervorgehoben. Die bindenden Regionen der Sonden LGV-S1 (hellblau) und –S23 (rot) sind schematisch eingezeichnet.

Die Vorgaben Softwareprogramms "Primer Express" 2.2.12) des (Kap. gewährleisteten, dass die vorgeschlagenen Primer und Sonden arm an Sekundärstrukturen wie intra- und intermolekulare Haarnadelstrukturen waren. Außerdem gab es in den 21-24 bp langen Primerseguenzen keine vier aufeinander folgenden gleichen Basen, um Leserahmenverschiebungen zu vermeiden. Die Homologie der ausgewählten Primer- und Sondensequenzen lag für die Serovare L1, L2 und L3 bei 100 %. Der Serotyp L2b zeigte eine Basenabweichung im Bereich der Sondenbindungsregion (vgl. Abb. 8 und 10C). Als Fluorophor wurde für beide Sonden (LGV-S1 und LGV-S23) HEX gewählt (siehe Kap. 2.2.3.2).

3.3.2 Spezifität und Sensitivität der LGV1-, der LGV2- und der LGV3-TaqMan-PCR

Um die Spezifität der jeweiligen LGV-PCR zu testen, wurde neben *C. trachomatis* DNA als Positivkontrolle auch DNA von *Chlamydophila pneumoniae* eingesetzt. Die Familie der polymorphic membrane Proteine ist auch im Genom von *Chlamydophila pneumoniae* verschlüsselt [76+77]. Wie in Abbildung 9 deutlich an fehlender Amplifikation zu sehen ist, konnte eine Kreuzreaktivität von *Chlamydophila pneumoniae*-DNA in den *pmpH*-detektierenden LGV1/LGV2/LGV3-TaqMan-PCRs ausgeschlossen werden (schwarze Kurven). Als Positivkontrollen dienten die jeweils zugehörigen LGV-PCR-Plasmide.





Als Positivkontrollen (K⁺) dienten die jeweils zugehörigen LGV-PCR-Plasmide.

Zur Überprüfung der Sensitivität wurde stellvertretend für die Serotypen L1, L2 und L3 das Serovar L3 getestet und ergänzend das Serovars L2b, welches sich durch eine Base im Bereich der Sondenbindungsregion von den anderen L-Serovaren unterscheidet (vgl. Abb. 8).



Abb. 10: Sensitivität der LGV-PCRs.

A) Amplifikationskurven der L3-DNA in der LGV1-, der LGV2- und der LGV3-TaqMan-PCR mit Darstellung der Negativkontrollen (K-). B) Gelelektrophoretische Auftrennung der aufgereinigten PCR-Produkte des L2b-Serovars nach Amplifikation in der LGV1-, bzw. LGV2- bzw. LGV3-PCR (siehe Kap. 2.2.3 und 2.2.8). C) Ergebnisse der Sequenzierung der L2b-Amplifikons aus der LGV1-, LGV2- und LGV3-TaqMan-PCR (siehe Kap. 2.2.3-2.2.10). Die Primer- und Sondenbindungsregionen sind hervorgehoben. Abweichende Basen im L2b-Serovar zu den Sondensequenzen sind markiert (*). Die Start- und Endbasenpositionen der dargestellten Genregionen im *pmpH*-Gen sind angegeben.

Zunächst wurden die Serovare L2b und L3 in der LGV1-/LGV2-/LGV3-TaqMan-PCR eingesetzt. Es zeigten sich signifikante Fluoreszenzstärkenanstiege in allen drei PCR-Ansätzen. Beispielhaft sind in Abbildung 10A die Amplifikationskurven für die

L3-DNA dargestellt, die eine effizientere Amplifikation in der LGV1- und LGV2-PCR gegenüber der LGV3-PCR anzeigen.

Zur Generierung von Amplikon-tragenden Plasmiden, die für eine spätere Quantifizierung der TaqMan-PCRs benötigt wurden, erfolgte parallel die Amplifikation der DNAs in einer konventionellen PCR (Ansatz 1 und Temperaturprogramm 2) (siehe Kap. 2.2.3.1). Die gelelektrophoretische Auftrennung der aufgereinigten PCR-Produkte (siehe Kap. 2.2.4.3 und 2.2.8) des Serovars L2b zeigt Abbildung 10B. Die zu erwartenden Längen des PCR-Produktes von 76 bp (LGV1), 62 bp (LGV2) bzw. 59 bp (LGV3) waren gut voneinander abzugrenzen.

Daraufhin wurden die gewonnenen Amplikons in den Vektor pGEM-T kloniert und in *E. coli* DH5α propagiert (siehe Kap. 2.2.5 und 2.2.6). Nach Kultivierung und Aufreinigung wurde die Plasmid-DNA inserttragender Klone zur Sequenzierung gegeben (siehe Kap. 2.2.4, 2.2.7, 2.2.9 und 2.2.10), wobei die jeweiligen DNAs ideale OD-260/280-Quotienten zwischen 1,88 und 1,94 aufwiesen (siehe Kap. 2.2.9). Abbildung 10C zeigt die Sequenzierung der erfolgreich in den Vektor pGEM-T eingebrachten Amplikons des L2b-Serovars aus der LGV1- bzw. LGV2- bzw. LGV3-PCR. Durch ein Sternchen hervorgehoben sind die zur jeweiligen LGV-PCR-Sonden-Sequenz abweichenden Basen im Serovar L2b.

Nach Testung der Spezifität und Sensitivität konnten die LGV-PCRs in folgenden Experimenten verwendet werden.

3.4 Entwicklung der CTra-LGV-Duplex-PCR

3.4.1 Entscheidung zur Verwendung der LGV2-TaqMan-PCR in der CTra-LGV-Duplex-PCR

Im nächsten Schritt sollte nun bestimmt werden, welche der drei LGV-TaqMan-PCRs sich am effizientesten in einem Duplex-Ansatz mit der CTra-TaqMan-PCR kombinieren ließ (siehe auch Tab. 2, Kap. 2.1.7 und Kap. 2.2.3.2). Aufgrund der Sondenmarkierung erfolgte die Detektion der CTra-TaqMan-PCR im FAM-Kanal, die der LGV-TaqMan-PCRs im HEX-Kanal (siehe Kap. 2.2.3.2). Es wurden das Serovar L2b stellvertretend für die L1-L2b Serovare und das Serovar L3 getestet (Beispiel siehe Abb. 11).



Abb. 11: Amplifikationskurven des L3-Serovars und der Negativkontrolle (K⁻, H_2O) in der jeweiligen CTra-LGV-Duplex-TaqMan-PCR.

Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse der beiden getesteten Serovare in verschiedenen PCR-Läufen. Alle drei CTra-LGV-TaqMan-PCRs zeigten die Amplifikation der DNAs in beiden Reaktionen. Betrachtet man jedoch die jeweilige Differenz zwischen dem CT-Wert der CTra- und der LGV-TaqMan-PCR, zeigte sich ein Vorteil für die CTra-LGV2-Duplex-PCR (Mittelwerte der Differenzen: CTra-LGV1: 1,6; CTra-LGV2: 1,3; CTra-LGV3: 2,1).

		CTra FAM	LGV1 HEX	CTra FAM	LGV2 HEX	CTra FAM	LGV3 HEX
L2b	1	28,4	27,6	28,9	29,9	28,5	29,2
	2	30,7	32,8	31,0	33,9	31,0	32,9
Ø L2b (a)		29,6	30,2	29,9	31,9	29,8	31,1
L3	1	29,5	32,0	29,6	29,9	28,5	32,8
	2	32,0	33,0	31,2	32,2	31,9	33,4
Ø L3 (b)		30,8	32,5	30,4	31,0	30,2	33,1
Ø G (c)		30,2	31,4	30,2	31,5	30,0	32,1

Tab. 8: CT-Werte der L2b- und L3-DNA nach Einsatz in verschiedenen CTra-LGV1/2/3-Duplex-PCR-Läufen.

(a) "Ø L2b": Mittelwert für die L2b-DNA-Läufe;
(b) "Ø L3": Mittelwert für die L3-DNA-Läufe;
(c) "Ø G": Mittelwert für alle CT-Werte einer Spalte.

Aufgrund dieser Daten verwendeten wir in den folgenden Experimenten die CTra-LGV2-Duplex-PCR, die im Weiteren CTra-LGV-TaqMan-PCR genannt wird.

3.4.2 Validierung der CTra-LGV-TaqMan-PCR

3.4.2.1 Linearität und Sensitivität

Die CTra-LGV-TaqMan-PCR wurde zunächst auf Linearität und Sensitivität bezüglich der unteren Nachweisgrenze überprüft (vgl. Abb. 12).



Abb. 12: Linearität der CTra-LGV-TaqMan-PCR.

a) Amplifikationskurven eines *Chlamydia trachomatis*-CTra-Plasmids (FAM) und eines *Chlamydia trachomatis*-LGV-Plasmids (HEX) in den Konzentrationen 10^7 -, 10^5 -, 10^3 und $10^1/\mu$ l in Doppelansätzen. b) Mit Hilfe der "IQ5"-Auswertungssoftware wurden die CT-Werte dieser unterschiedlich konzentrierten Proben in einen statistischen Zusammenhang gebracht und als Effektivität (E), Bestimmtheitsmaß (R², steht für die Qualität der linearen Regression), Steigung (slope) und Regressionskorrelation angegeben.

Dazu wurden pGEM-T (Easy)-klonierte Amplikons verwendet, die zuvor durch Sequenzierung in Ihrer Basenabfolge bestätigt wurden (siehe Abb. 10C, Kap. 3.3.2). Nach Anfertigung von Verdünnungsreihen (siehe Kap. 2.2.11) wurden diese Plasmide in Konzentrationen von 10¹ bis 10⁷ Kopien/µl in Doppelansätzen eingesetzt und in einem folgenden PCR-Lauf erneut einfach getestet. Es wurden jeweils 1,25 µl des CTra- und des LGV-Amplikons pro 25 µl Duplexansatz eingesetzt. Mit Hilfe der IQ5-Auswertungssoftware (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Kap. 2.2.12) konnten die CT-Werte der verschieden konzentrierten Proben in einen statistischen Zusammenhang in Form einer Regressionsgeraden gebracht werden.

Es zeigte sich für die CTra-PCR in dieser Auswertung eine hohe Qualität der linearen Regression bei einem Bestimmtheitsmaß (= R^2) von 0,998 an Tag 1 und von 0,977 an Tag 2. Für den HEX-Kanal der LGV-PCR war das Bestimmtheitsmaß als Wert für die Qualität der linearen Regression mit 0,995 bzw. 0,988 minimal geringer. Bei einem idealen Wert des Bestimmtheitsmaßes von 1 konnte eine fast perfekte lineare Regression zwischen der eingesetzten Kopienzahl und dem erhaltenen CT-Wert gezeigt werden. Eine lineare Amplifikation war vor allem im Bereich zwischen 10^3 und 10^7 Kopien/µl möglich. Die Nachweisgrenze lag bei beiden Reaktionen bei 50 Kopien/µl.

3.4.2.2 Spezifität

Zur Sicherstellung der analytischen Spezifität der Primer- und Sondenkombinationen, wurden 16 verschiedene *C. trachomatis* Serovare, vier Spezies der Familie der *Chlamydiaceae* und 20 weitere Mikroorganismen auf Kreuzreaktivität getestet. In den PCRs wurden zur Testung der Kreuzreaktivität für alle Spezies außer *C. trachomatis* jeweils mindestens 1 Millionen Genome eingesetzt. Wie aus Tabelle 9 ersichtlich zeigten beide PCRs keine Kreuzreaktivität mit den getesteten anderen *Chlamydiaceae*-Mitgliedern und den 20 analysierten Mikroorganismen (Kap. 2.1.1), die den perianalen und urogentialen Raum besiedeln [78]. Alle *C. trachomatis* Serovare wurden sicher in der CTra-TaqMan-PCR detektiert.

Spezies/Serovare	CTra FAM	LGV HEX
Chlamydophila pneumoniae	- (a)	-
Chlamydophila psittaci	-	-
Chlamydophila pecorum	-	-
Chlamydia muridarum	-	-
Chlamydia trachomatis		
В	31	37
D	25	-
D-	23	-
Da	24	-
E	31	-
F	36	-
G	30	-
Ga	21	-
Н	29	-
	21	-
la	24	-
J	25	-
К	24	-
L1	26	28
L2	27	27
L3	18	19
К-	-	-

Tab. 9: Testung der CTra-LGV-TaqMan-PCR Kreuzreaktivität [78].

(a) "-": kein Schnittpunkt mit der Threshold-Geraden.

Positive CT-Werte in der LGV-TaqMan-PCR zeigten die L-Serovare, wobei sich die Werte um maximal +2 von den CTra-Werten unterschieden. Obwohl in der LGV-PCR bei Serovar B ein CT-Wert von 37 im HEX-Kanal gemessen wurde, ist dieser in Anbetracht eines CT-Wertes von 31 in der CTra-PCR vernachlässigbar. Es verdeutlichte, dass die Ergebnisse der LGV-PCR immer in Bezug zu den CT-Werten der CTra-PCR betrachtet werden mussten und Differenzen von mehr als fünf Zyklen auf eine Kreuzreaktion hinwiesen, die im Einzelfall überprüft werden sollte.

3.4.2.3 Präzision

Ein weiterer Schritt in der Evaluation der Duplex-TaqMan-PCR war die Testung der Präzision. Dazu erfolgte die Analyse, inwieweit die gemessenen CT-Werte einer Probe sowohl innerhalb eines PCR-Laufes als auch in verschiedenen PCR-Läufen reproduzierbar waren. In Abbildung 13 sind die Amplifikationskurven dreier Patientenproben beispielhaft bei dreifachem Einsatz in einer CTra-LGV-TaqMan-PCR dargestellt, welche jeweils nur minimal abweichende CT-Werte sowie einen fast identischen Kurvenverlauf zeigten (vgl. auch Tab. 10).



Abb. 13: Testung der Präzision der CTra-LGV-TaqMan-PCR.

Tabelle 10 zeigt alle gemessenen CT-Werte zur Präszisionstestung und deren auf die einzelnen Patientenproben bezogenen Mittelwert (Ø) und die Standardabweichung (σ). Ein CT-Wert von 46 wurde hierbei als negatives Testergebnis gewertet und damit als Wert 0 in die Berechnungen einbezogen.

Amplifikationskurven im FAM- und im HEX-Kanal der Patientenproben 1507, 1865 und 219 nach jeweils dreifachem Einsatz in der CTra-LGV-TaqMan-PCR.

		Tag 1	Tag 1	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Ø (a)	σ (b)
		Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3				
	5414		r	r	r]		
697	CTra ^{⊦am}	25	26	26	25	24	25,2	0,84
	LGV ^{HEX}	29	29	29	29	28	28,8	0,45
1507	CTra ^{FAM}	27	27	28	27	28	27,4	0,55
	LGVHEX	31	31	31	31	32	31,2	0,45
1865	CTraFAM	19	20	20	20	20	19,8	0,45
	LGVHEX	43	46	46	46	29	42	7,38
1092	CTraFAM	/ (c)	/	/	28	28	28	0
	LGV ^{HEX}	/	/	/	46	46	46	0
2929	CTra ^{FAM}	30	29	28	29	23	27,8	2,77
	LGV ^{HEX}	40	39	26	46	23	34,8	9,83
			1]	,,	
706	CTra ^{FAM}	30	30,5	30	31	29	30,1	0,74
	LGV ^{HEX}	46	46	39	46	40	43,4	3,58
			1				·	
219	CTra ^{FAM}	46	46	37	46	43	43,6	3,91
	LGV ^{HEX}	40	46	46	46	43	44,2	2,68
K⁻ (d)	CTra ^{FAM}	46	/	/	46	46	46	0
	LGV ^{HEX}	46	/	/	46	46	46	0

Tab. 10: Präzisionstestung der CTra-LGV-TaqMan-PCR.

(a) "Ø": Mittelwert; (b) "σ": Standardabweichung; (c) "/": nicht durchgeführt; (d) "K⁻": Negativkontrolle.

Es zeigte sich bei denen im FAM- bzw. HEX-Kanal signifikant positiv getesteten Proben mit einer Ausnahme eine Standardabweichung unter eins. Standardwerte über eins entstanden durch stark um den Mittelwert verteilte CT-Werte, welche sich aber bei genauerer Betrachtung außerhalb des signifikanten Bereiches befanden.

Somit zeigte die CTra-LGV-TaqMan-PCR eine hohe Präzision in beiden Reaktionen.

3.4.2.4 Isolatetestung

Nach positiver Evaluation der CTra-LGV-PCR wurde diese nun zur Re-Analyse von *Chlamydia trachomatis*-positiven Patientenproben herangezogen (siehe Tab. 11), die über einen Zeitraum von drei Jahren gesammelt und bei -20 °C gelagert worden waren. Von den 17 reanalysierten Proben zeigten lediglich 14 Patientenproben noch einen positiven *C. trachomatis*-Nachweis, was auf einen Abbau der DNA über den Lagerungszeitraum hinwies. Neun dieser 14 Proben wurden LGV-positiv getestet.

Probe	CTra FAM	LGV HEX	gap FAM				
	CT-Wert	CT-Wert	CT-Wert				
227	31	34	27				
234	27	31	22				
697	25	27	20				
706	30	- (a)	30				
764	33	-	32				
1044	35	34	26				
1049	31	-	23				
1180	31	-	25				
567	34	34	24				
1507	28	31	26				
1156	-	33	23				
1194	-	37	30				
1392	-	38	24				
1865	24	-	-				
1866	27	36	24				
2284	43	37	35				
2886	29	38	29				

Tab. 11: Re-Analyse C. trachomatis-positiver Patientenproben

(a): "-" = kein Schnittpunkt mit der Threshold-Geraden.

Verglich man jedoch die CT-Werte beider PCR-Reaktionen, so ließ sich nur für sechs Proben eine Differenz von < 5 Zyklen feststellen. In Sequenzierungen der CTra- und LGV-Amplikons einzelner Proben bestätigte sich, dass zu einem positiven Nachweis eines L-Serovars immer eine signifikante und vergleichbare Amplifikation in beiden Reaktionen zählte.

Mittels unserer Tests wurden insgesamt fünf Patientenproben (227, 234, 697, 567, 1507) als zweifelsfrei LGV-positiv identifiziert, da die sechste Probe, 1044 erst mit der Negativkontrolle positiv wurde. Tabelle 12 zeigt eine Zusammenfassung der LGV-positiven Patienten:

Jahr- Probe	Geschlecht	Alter [Jahre]	Klinische Diagnose	HIV- Serostatus	Abstrichort		
04-227	m (a)	47	Proktitis	+ (b)	Rektum		
04-234	m	34	Proktitis	+	Rektum		
05-697	m	39	Proktitis	+	Rektum		
06-567	m	57	Ulcus	- (b)	Urethra		
06-1507	m	41	Proktitis	+	Rektum		

Tab. 12: LGV-positiv getestete Patienten des Universitätsklinikums Düsseldorf von 2004-2006.

(a): "m" = männlich; (b): "+"=positiv; "-"=negativ.

Alle Patienten waren männlichen Geschlechts und zwischen 34 und 57 Jahre alt. Klinisch präsentierte sich die Infektion bei allen Patienten mit einem HIV-positiven Serostatus als Proktitis. Der einzige HIV-negative Patient (06-567) mit LGV-Nachweis zeigte klinisch ein urethrales Ulcus. Diese Ergebnisse passen zu den europaweit erhobenen Zahlen (vgl. Kap. 1.3).

3.5 Entwicklung eines TaqMan-PCR-Sets zur Differenzierung der Serotypen L1, L2 und L3: erste Ergebnisse

3.5.1 Design L1-, L2- und L3-spezifischer TaqMan-PCR

Da die identifizierten LGV-positiven Proben ausschließlich von Männern stammten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Gruppe der MSM (men who have sex with men) zählten und in Europa bislang nur das L2b-Serovar gefunden wurde, war das nächste Ziel die Differenzierungsmöglichkeit von L1, L2 und L3.

Betrachtet man den phylogenetischen Stammbaum des MOMP-Gens aller *C. trachomatis* Serovare, kann man eine Aufteilung in drei Gruppen beobachten (siehe Abb. 14).



Abb. 14: Phylogenetischer Stammbaum der Zielregionen der L1-, L2- und L3-PCR im MOMP-Gen verschiedener *Chlamydia trachomatis* Serovare (a) und Zuteilung zu den L-Clustern nach Alignment (J-Hein-Methode; MegAlign, DNASTAR) (b).

Die verwendeten Akzessionsnummern zeigt Kapitel 2.1.5. Die Boxen markieren identische Nukleotide. Die jeweiligen Primer und Sonden (siehe Tab. 2, Kap. 2.1.7) der entsprechenden TaqMan-PCR sind darunter schematisch dargestellt.

Aufgrund des jeweils zugehörigen L-Serovars wurden die Gruppen als L1-, L2- und L3-Cluster bezeichnet. Das L1-Cluster beinhaltet die Serovare L1, D, Da, E, F und G, das L2-Cluster die Serovare L2, L2a, L2b, B und Ba. Im L3-Cluster sind die Serovare L3, A, C, H, I, Ia, J, Ja und K enthalten.

Erneut wurde mit dem Programm "Primer Express" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (siehe Kap. 2.2.12 und Kap. 3.3.1) gearbeitet, um entsprechende Primer und Sonden zu designen, die jeweils die Serovare des L1-, L2- oder L3-Clusters detektieren. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich wird, betrug die resultierende Länge des L1-Amplikons 84 bp, des L2-Amplikons 94 bp und des L3-Amplikons 89 bp (siehe Tab. 2, Kap. 2.1.7).

3.5.2 Die Sensitivität der L1/L2/L3-TaqMan-PCR

Zur Überprüfung der Sensitivität der L-PCRs wurden die Serovare L1-L3 und verschiedene Patientenproben zunächst in der entsprechenden konventionellen L-PCR eingesetzt (PCR-Ansatz 3 und Temperaturprogramm 1, siehe Kap. 2.2.3). Die gewonnenen PCR-Produkte wurden aufgereinigt (vgl. 2.2.4.3) und im nächsten Schritt gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kap. 2.2.8). Nach Ligation mit dem Vektor pGEM-T (697, 227, 234 und L3-DNA) bzw. pGEM-T Easy (L1-, L2-DNA und 1507) wurde eine Transformation von *E. coli* durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.5 und 2.2.6). Nach Kultivierung auf LB-Amp Platten wurden einzelne Klone in der jeweiligen TaqMan-PCR getestet. Daraufhin wurden die Plasmide PCR-positiver Klone aufgereinigt und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzierungen zeigt Abbildung 15 in einem Alignment mit der entsprechenden Datenbank-Sequenz.



Abb. 15: Alignments der amplifizierten MOMP-Genregionen der L-Serovare und Isolate in der L1-, L2- und L3-PCR (MegAlign, DNASTAR).

Die Primer- und Sondenbindungsstellen sind schematisch dargestellt, die Unterschiede in der Sequenzabfolge zwischen Serovar L2 und L2b markiert (*) und identische Nukleotide umrahmt.

Es zeigte sich eine nahezu 100 %ige Homologie im amplifizierten Genabschnitt.

Bei der Gruppe der L2-Serovare wurde deutlich, dass abweichende Basen in dem amplifizierten Genabschnitt zwischen Serovar L2 und L2b vorliegen (siehe Abb. 15 und 16). Aufgrund der überwiegenden Präsenz des L2b-Serovars in Europa widmeten wir uns diesem Aspekt im Verlauf genauer (siehe Kap. 3.6).

Nach der dreimaligen Testung der jeweiligen L-DNA an einem Tag und der Wiederholung an zwei weiteren Tagen in der entsprechenden L-PCR, wurden nahezu identische CT-Werte in der jeweiligen Versuchsreihe gemessen (vgl. Tab. 13).

		Tag 1		Tag 2		
	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3		Ø (a)	σ (b)
L1 HEX						
L1-DNA (c)	30	30	30	31	30,0	0,41
L2 FAM						
L2-DNA (d)	37	37	37	38	37,0	0,43
L2b-DNA (e)	33	34	33	33	33,3	0,54
L3 TET						
L3-DNA	32	31	32	33	32,0	0,52

Tab. 13: Präzision der L-PCRs.

(a) Ø:Mittelwert; (b) σ : Standardabweichung; (c) in einer 1/10-Verdünnung mit TrisHCl; (d) Konzentration 10²/µl; (e) in einer 1/5-Verdünnung mit TrisHCl.

Somit zeichnete sich als erste Orientierung eine zufrieden stellende Reproduzierbarkeit von Ergebnissen in der L1/2/3-PCR ab.

Bei hohen CT-Werten, d. h. gering konzentrierten Proben, sollte zur sicheren Zuordnung zu einem L-Serovar immer eine Sequenzierung folgen.

TET als Fluoreszenzfarbstoff der L3-PCR ist abgeschwächt auch im HEX- und im FAM-Kanal detektierbar. Sollte diese Reaktion in einen Multiplex-Ansatz einfließen, wäre dieser Aspekt zu berücksichtigen, indem man als weiteres Fluorophor z. B. TexasRed wählt, welches weder im HEX- noch im FAM-Kanal zu Kreuzreaktionen führt.

3.5.3 Isolatetestung in der L1- der L2- und der L3-TaqMan-PCR

Es folgte die Testung von Patientenproben sowie von L1/L2/L3-DNA. Vier Patientenproben wurden als L2- bzw. L2a, bzw. L2b-Serovar identifiziert. Die entsprechende DNA wurde zuverlässig in der L2-TaqMan-PCR amplifiziert. Der Vergleich der Threshold-Werte der CTra- bzw. LGV-PCR mit der L-PCR, zeigte eine Differenz von \leq 5 Zyklen. Per Definition LGV-negative Proben (vgl. Kap. 3.4.2.4) wurden nicht detektiert. Die CT-Werte der Isolatetestung in den entsprechenden TaqMan-PCRs zeigt Tabelle 14.

	CTra FAM	LGV HEX	L1 HEX	L2 FAM	L3 TET
L1-DNA	/ (a)	1	27	/	/
L2-DNA	/	/	/	23	/
L3-DNA	1	1	/	/	35
227	31	33	- (b)	36	-
234	27	30	-	29	(4)
697	25	27	-	28	-
1507	33	34	-	34	-
2929	29	39	_	_	-
2886	29	38	-	-	-

Tab. 14: CT-Werte von L1/L2/L3-DNA und Patientenproben nach Einsatz in der L1, L2- und L3-TaqMan-PCR.

(a) "/": nicht durchgeführt; (b) "-": kein Schnittpunkt mit der Threshold-Geraden.

Für eine Zuordnung zum L1-, L2-, oder L3-Serovar war demnach eine positive CTraund LGV-PCR sowie eine vergleichbare Amplifikation in der entsprechenden L-PCR entscheidend. Bei grenzwertigen Ergebnissen war auch hier eine Sequenzierung der Amplikons anzuraten.

3.6 Besonderheiten des L2b-Serovars

Die MOMP-Genregionen, an die der L1-F- bzw. der L2-F-Primer binden, zeigen, wie in Kapitel 3.5.2 bereits beschrieben, eine unterschiedliche Basenpaarfolge in den Serotypen L2 und L2b (vgl. Abb. 15 und 16).

449- CAG CAT CTT TCA ACT TAG TTG GCT TAT - 475	L2
404 -CAG CAT CTT TCA ACT TAG TTG GGT TAT - 430	L2b
5'- CAG CAT CTT TCA ACT TAG TTG GGT TA - 3'	L1-F
5'- CAG CAT CTT TCA ACT TAG TTG G C T TAT - 3'	L2-F

Abb. 16: Sequenzunterschiede der Primer L1-F und L2-F bezüglich der entsprechenden MOMP-Genregion im Serovar L2 (449-475) (Akzessionsnummer DQ064295) und L2b (404-430) (Akzessionsnummer DQ217607).

Die Sequenz des Primers L1-F passt hundertprozentig zu dem entsprechenden Genabschnitt im Serovar L2b, wohingegen der L2-F Primer in einer Base abweicht, was in Abbildung 16 blau markiert ist.

Da das Serovar L2b der Vertreter der LGV-Serovare ist, welcher hauptsächlich in Europa anzutreffen ist (vgl. Kap. 1.3), ist die Differenzierungsmöglichkeit zwischen L2 und L2b ein interessanter Aspekt, der mit Hilfe der L123- und der L1L2-TaqMan-PCR weiter untersucht werden sollte (siehe Kap. 2.1.7, 3.6.1 und 3.6.2).

3.6.1 L123-TaqMan-PCR

Um die Bindungsstellen der Primer L1- bzw. L2- bzw. L3-F innerhalb des *omp-1*-Gens untersuchen zu können, wurde die L123-PCR entwickelt (Tab. 2, Kap. 2.1.7). Hierzu wurde der Primer L123-F mit Hilfe des Programms "Primer Express" (siehe Kap. 2.2.12 und 3.3.1) so designt, dass er stromaufwärts der L1-, L2- und L3-F an das *omp-1*-Gen bindet. Er wies eine 100 %ige Homologie zu der Bindungsstelle in den Serovaren L1, L2 und L2b auf, nur im Serovar L3 waren zwei Punktmutationen zu verzeichnen. Da lediglich die Serovare L2 und L2b analysiert werden sollten, war diese Variabilität nicht von Bedeutung. Anschließend wurden die Patientenproben 1507, 234 und L2-DNA in der L123-PCR amplifiziert (vgl. Tab. 3 (Nr. 2+3) und Tab. 4 (Nr. 1), Kap. 2.2.3.1) und die PCR-Produkte geleektrophoretisch aufgetrennt (Amplikonlänge 156 bp) (vgl. Kap. 2.2.8). Nach Aufreinigung der PCR-Produkte und Abschätzung der Nukleinsäurekonzentration wurden diese in den Vektor pGEM-T Easy ligiert und in *E. coli* propagiert. Jeweils ein Insert-tragender Klon wurde für die Sequenzierung ausgewählt (vgl. Kap. 2.2.10).

Wie das Alignment in Abbildung 17 zeigt, lag eine hundertprozentige Übereinstimmung der Patientenproben 1507 und 234 mit dem korrespondierenden *omp-1*-Genabschnittes des Serovars L2b vor. So konnte die Zugehörigkeit dieser Patientenproben zum Serovar L2b bewiesen werden.



A	G		А	А	G	C		- I	G		А	C	C	А	А	А		А		G	А	G	U			А	G	А		U	А	A	I .	
А	G	Т	А	А	G	С	Т	Т	G	Т	А	С	С	А	А	А	Т	А	Т	G	А	G	С	Т	Т	А	G	А	Т	С	А	Α̈́	A	1507
A	G	Т	А	А	G	С	Т	Т	G	Т	А	С	С	А	А	А	Т	А	Т	G	А	G	С	Т	Т	А	G	А	Т	С	А	A	A	234

Abb. 17: Alignment der MOMP-Genregion der Patientenproben 1507 und 234 sowie des L2b-Serovars (Akzessionsnr. DQ217607) nach Amplifikation in der L123-PCR (MegAlign, DNASTAR).

Die Bindungsregionen verschiedener L-Primer und der Sonde L2-S sind markiert. Identische Nukleinsäureabschnitte sind durch Boxen gekennzeichnet.

Die weitere Analyse aller von uns auf LGV positiv getesteten Patientenproben zeigte auch deren Zugehörigkeit zum L2b Serovar.

3.6.2 L1L2-TaqMan-PCR

Aufgrund der oben genannten Punktmutation des L2-F Primers zur Bindungsstelle im L2b Serovar und der Tatsache, dass hier der L1-F Primer 100 %ige Homologie zur erkannten *omp-1*-Region im L2b-Serovar aufwies, stellte sich die Frage, ob der Einsatz des L1-F-Primers aufgrund dieser höheren Homologie zu einem verbesserten Nachweis von L2b-Serovaren führen würde.

Wir führten parallel TaqMan-PCR-Läufe durch, die entweder das Primerpaar L1-Fund L2-R (L1L2-PCR) oder L2-F- und L2-R (L2-PCR) enthielten. Als Sonde wurde jeweils die Sonde L2-S eingesetzt (Tab. 2, Kap. 2.1.7). Um eine möglichst störungsfreie Amplifikation zu erhalten, setzten wir für die Untersuchung statt L2b Serovar-positive Patientenproben aufgereinigte, in pGEM-T Easy-klonierte L123-PCR-Amplikons ein. Wie in Kapitel 3.6.1 erläutert, entsprach so die Sequenz, an die

der L1-F bzw. L2-F Primer bindet, der Sequenz des Isolates. Für den L2-Serotypen wurde das klonierte L2-PCR-Amplikon eingesetzt (Sequenzierung siehe Abb. 15). Um von einer bestmöglichen Vergleichbarkeit ausgehen zu können, wurden gleiche Plasmid-Mengen von 10² und 10⁷ Kopien/µl eingesetzt (siehe Tab. 15).

	Тад	1	Tag 2						
	L1L2	L2	L1L2	L2					
L2 (a)	18,7	18,2	19,0	18,6					
L2 (b)	36,1	37,2	36,4	35,9					
L2b (a)	19,7	19,3	19,8	20,3					
L2b (b)	38,1	41,6	38,9	40,7					
K⁻ (c)	- (d)	-	-	40,5					

Tab. 15: Amplifikationseffizienz der L2- und L2b-DNA in der L1L2- und L2-PCR.

(a) $2,5 \times 10^7$ Kopien; (b) $2,5 \times 10^2$ Kopien; (c) "K-": Aqua dest./ Negativkontrolle; (d) "-": kein Schnittpunkt mit der Threshold-Gerade.

Wie die in Tabelle 15 aufgeführten CT-Werte der PCR-Läufe verdeutlichen, zeigte sich zwar bei hoher Konzentration der Proben kein Unterschied in der Amplifikationseffizienz. Im unteren Konzentrationsbereich der Proben $(2,5 \times 10^2 \text{ Kopien pro PCR Ansatz})$ war jedoch je nach Wahl des Vorwärts-Primers ein deutlicher Unterschied zu erkennen.

Wie aufgrund der Homologien zu erwarten war, zeigte sich ein früherer Anstieg der Amplifikationskurve für das Serovar L2b bei Verwendung des Primerpaares L1-F und L2-R und eine schnellere Amplifikation für das Serovar L2 in der L2-PCR.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass im Rahmen dieser Doktorarbeit Multiplex-fähige TaqMan-PCRs zur Detektion und Differenzierung der Lymphogranuloma venereumassoziierten *Chlamydia trachomatis* L-Serovare etabliert werden konnten. Die ersten retrospektiven Analysen von Patientenmaterial konnten dazu genutzt werden, ein detektiertes LGV-Serovar einem L-Typen zuzuordnen und werden damit zukünftig auch zur Erhebung von epidemiologischen Daten beitragen können.

4 Diskussion

In den vergangenen Jahren wurde zunehmend über Infektionen mit den L-Serovaren von *Chlamydia trachomatis* in der westlichen Welt berichtet [79]. Die Ausbreitung und Verteilung von LGV-Infektionen war interessant zu beobachten. So wurde z. B. in 2008 über die ersten Fälle einer anorektalen Lymphogranuloma venereum-Infektion in Neuseeland berichtet [80]. Auch bei Heterosexuellen wurden LGV-Infektionen diagnostiziert, wie u. a. ein Bericht aus Spanien aus 2008 beschreibt [81, 82].

Eine führende Rolle spielte weiterhin die Gruppe der MSM (vgl. Kap. 1.3) [79]. Bis Anfang 2009 wurden weltweit unter MSM über 1.000 Fälle einer LGV-Infektion durch das L2-Serovar beschrieben [83]. In England diagnostizierten Forscher 2006 unter 327 LGV-Fällen (davon 282 MSM) bei 76 % Koinfektionen mit HIV und bei 19 % mit Hepatits C. Die Wissenschaftler vermuteten, dass eine LGV-Infektion zur Ausbreitung von HIV durch erleichterte Übertragung beiträgt [84]. Passend dazu beschrieben Untersuchungen in Zürich seit 2003 die Mehrzahl der Patienten mit einer LGV-Infektion ebenfalls als HIV-positiv [85].

Die europäischen Leitlinien von 2007 für Proktitis durch sexuell übertragbare Keime, empfehlen so bei LGV-positiv getesteten Patienten auch Tests auf Syphilis, Hepatitis C und HIV durchzuführen. Insgesamt raten diese Leitlinien u. a. ein Screening auf Chlamydien und *Neisseria gonorrhoeae* an [86]. Als wichtige Zielgruppe von Screening-Maßnahmen sind die MSM zu sehen, da z. B. Erhebungen des "European Surveillance of Sexually Transmitted Infections" (ESSTI)-Netzwerks andeuten, dass v. a. in der Gruppe der MSM ein hohes Risiko für sexuell übertragbare Infektionen in Westeuropa besteht [87].

Ein adäquates Screening für *C. trachomatis* Infektionen gewinnt unter dem Aspekt an Bedeutung, dass diese häufig unbemerkt verlaufen. Damit verbunden ist die Gefahr der unbemerkten Weitergabe an Sexualpartner sowie eine erschwerte Bekämpfung der Erkrankung und deren Ausbreitung. So berichteten Annan und Mitarbeiter 2009 aus Großbritannien über eine hohe Anzahl an rektalen *C. trachomatis* Infektionen bei MSM und beschrieben die Mehrzahl der Fälle als asymptomatisch [88]. Wood und Mitarbeiter untersuchten in Canada 253 MSM ohne Symptome einer Proktitis und

diagnostizierten bei 8 % der rektalen Abstriche eine LGV-positive Serologie [89]. Insgesamt allerdings präsentieren sich laut einer Veröffentlichung der Arbeitsgruppe Ward die meisten LGV-Infektionen symptomatisch, wohingegen rektale Infektionen mit anderen *C. trachomatis* Serovaren häufig asymptomatisch verlaufen [90]. Insbesondere in rektalen Abstrichen in der Gruppe der MSM ist prozentual häufiger von einer LGV-Infektion auszugehen als z. B. in urethralen Abstrichen [90].

2009 machte eine Veröffentlichung der Arbeitsgruppe Alves nochmals darauf aufmerksam, wie wichtig ein von Symptomen unabhängiges Screening auf Infektionen mit *C. trachomatis* und *Neisseria gonorrhoeae* unter jungen Erwachsenen ist [91]. Auch in den Niederlanden setzten sich van de Laar und Mitarbeiter mit der Frage nach einem adäquaten Routine-Überwachungssystem für eine LGV-Infektion auseinander [92]. In Australien kam eine Studie zu dem Ergebnis, dass Screening-Tests auf *C. trachomatis* vor allem in der Gruppe der 20-24 jährigen effektiv sein könnten [93]. Von 2003 bis 2008 vom ESSTI-Netzwerk in einigen europäischen Ländern erhobene Daten zeigten allerdings, dass eine LGV-Infektion in MSM v. a. bei Patienten über 25 Jahre mit Ausnahme der Fälle in Katalonien (Spanien) (25 von 28 Fällen unter 25 Jahre) diagnostiziert wurde [82].

Zu einem validen Screening gehört ein adäquates diagnostisches Verfahren. Klinische Relevanz hat es, da unterschiedliche antibiotische Therapien zum Einsatz kommen (siehe Kap. 1.2.1.2) [25, 94]. So bestätigte 2009 eine Untersuchung von Morré und Mitarbeitern die Notwendigkeit einer 21 tägigen Therapie mit Doxycyclin zur Behandlung einer LGV-Infektion [94].

Die seit den 80er Jahren in der molekularbiologischen medizinischen Diagnostik vertretene Polymerasekettenreaktion (PCR) stellt eine zuverlässige Methode zum Nachweis bekannter DNA-Sequenzen dar (vgl. Kap. 1.2.1.4). In den 90er Jahren erfolgte durch die Entwicklung der TaqMan-PCR ein wichtiger Schritt in der Weiterentwicklung der konventionellen PCR durch Bloch und Mitarbeiter. Den Forschern gelang so erstmals die Amplifikation und der Nachweis einer DNA-Sequenz in einem Versuchsansatz (vgl. Kap. 1.2.1.4) [95]. Der Vorteil dieser Methode liegt in einer Zeitersparnis, u. a. liegen die Ergebnisse schon innerhalb eines Tages vor. Nachanalytik und erneute Pipettierschritte entfallen, was u. a. die Gefahr der Probenkontamination reduziert. Wie in Kapitel 1.2.1.4 beschrieben, kann

auch die Kopienzahl des zu detektierendes DNA-Abschnittes in der eingesetzten Probe berechnet werden (vgl. Kap. 2.2.11 und 3.1).

Auch in der Diagnostik einer Chlamydieninfektion spielt die PCR eine wichtige Rolle. In den vergangenen Jahren wurde von vielen Forschungsgruppen aufgrund der epidemiologischen Entwicklungen vor allem an einer Methode zur Identifikation der LGV-Serovare mittels PCR gearbeitet.

Grundsätzlich ist in diagnostischen Verfahren mittels PCR zu beachten, dass die Ergebnisse u. a. abhängig von der Sensitivität und Spezifität der eingesetzten PCR sind und außerdem Primer-Sonden-Interaktionen die Ergebnisse beeinflussen könnten [33]. Fortschritte in Bezug auf das Detektionslimit erzielten D'Agate und Mitarbeiter [96].

Als Zielgen zur *C. trachomatis* Diagnostik dient häufig das MOMP-Protein-kodierende *omp-1*-Gen [48, 49, 51] und zum Nachweis einer LGV-Infektion das *pmpH*-Gen mit der L-Serovar-spezifischen 36 bp-Deletion (vgl. Kap. 1.2.1.4). Ebenfalls speziesspezifische Zielsequenzen zur Detektion einer *C. trachomatis* Infektion liegen im kryptischen Plasmid [97-99].

Das kryptische Plasmid als Zielgen nutzten z. B. Schweizer Wissenschaftler 2006 in einer Real-time PCR zur Detektion von *C. trachomatis* und erzielten eine Sensitivität von 95,7 % und eine Spezifität von 100 % [98]. Auch die Arbeitsgruppe Limberger nutzte eine *C. trachomatis*-spezifische Zielregion im kryptischen Plasmid und zusätzlich eine Region im *omp-1*-Gen zur Detektion des L2-Serovars im Rahmen einer Multiplex-Real-time PCR [99]. Aufgrund von bis zu zehn Kopien des kryptischen Plasmids in *C. trachomatis* war von einer steigenden Sensitivität gegenüber einer PCR auszugehen, welche das nur einmal vorhandene MOMP-Gen als Zielgen nutzt [98].

Neue *C. trachomatis* Varianten erschweren eine zuverlässige Diagnostik, wie z. B. die in Schweden beschriebene Deletionen im kryptischen Plasmid [100]. So wurde von Morré und Mitarbeitern eine TaqMan-PCR zur Detektion dieser neuen Variante aus Schweden entwickelt [101]. Eine weitere Veröffentlichung aus dem Jahre 2006 zeigte, dass *C. trachomatis* zu Rekombination neigt. Dies führt zwar zu keiner veränderten Pathogenität, könnte jedoch Regionen betreffen, die potentiell Zielsequenz eines molekularbiologischen Nachweises sind [102].

Um falsch-negative Ergebnisse in der molekulargenetischen Diagnostik mittels PCR zu vermeiden, könnte es also ratsam sein, mehr als ein Zielgen zu nutzen um Mutationen oder Rekombinationen in den Zielsequenzen als Fehlerquelle zu minimieren. Zusätzlich ist es von Bedeutung sich regelmäßig über Mutationen in den verwendeten Zielgenen mittels aktueller Datenlage zu informieren. Zur Detektion neuer Varianten wird eventuell weiterhin die klassische Zellkultur eine Rolle spielen [33].

Über die Jahre wurden verschiedene Methoden im Rahmen der *C. trachomatis*- und speziell der LGV-Diagnostik entwickelt.

Diskutiert wurde u. a. die valide Unterstützung der Chlamydiendiagnostik durch immunologische Methoden. So wiesen Forscher um Essig auf den potentiellen Nutzen von immunologischen Tests zum Nachweis verschiedener Chlamydien-Antigene hin [103]. Thio und Mitarbeiter sahen eine eventuelle Korrelation zwischen einem erhöhten IgA-Titer gekoppelt mit dem Alter des Betroffenen und einer LGV-Proktitis-Diagnose [104].

Die Forschungsgruppen um Molano [48] und Xiong [105] entwickelten eine PCRbasierte "Reverse Line blot"-Hybridisierung um verschiedene C. trachomatis Serovare zu detektieren und zu genotypisieren. Andere Wissenschaftler beschäftigten sich mit der Amplifikation von C. trachomatis mittels PCR, folgender Detektion durch DNA-Enzymimmuntests und letztlich einer Genotypisierung durch einen reversen Hybridisierungstest ("Reverse hybridisation assay") [106]. Durch diese Methoden erzielten die Forscher eine hohe Spezifität und konnten so Mischinfektionen mit verschieden Serovaren identifizieren. 2007 präsentierten Wissenschaftler um Sonnex eine Nested-PCR zur C. trachomatis Identifikation gefolgt von einer zweiten Nested-PCR zur Genotypisierung der Serovare D-K und L1, L2 und L3. Mit einer 95 %igen Wahrscheinlichkeit konnte bei vier Genen pro PCR eine Detektion erzielt werden [107]. Kritisch zu betrachten ist bei den beschriebenen Methoden die jeweilige Weiterverarbeitung der PCR-Produkte, was Zeit kostet und außerdem immer die Gefahr einer Kontamination birgt. Eine Weiterentwicklung in Richtung einer Nested-PCR zur Detektion und Genotypisierung in einem Schritt könnte diese Faktoren optimieren [78].

2007 wurde über eine Real-time PCR mit Scorpion-Primern zur Detektion von *C. trachomatis* berichtet, welche vor allem Vorteile in der Sondensynthetisierung und leichteren Aufreinigung gegenüber einer TaqMan-PCR aufwies [108]. Skorpion-Primer vereinen Sonde und Primer in einem Oligonukleotid. Während der Amplifikation wird die Sonde direkt mit dem komplementären Zielbereich des zu detektierenden Gens verbunden und dadurch eine schnelle, zuverlässige und stabile Detektion des jeweiligen Amplikons garantiert [109].

2006 berichteten Forscher um Goldberger über zwei Real-time PCRs am *omp-1*-Gen zur Detektion von L2 und L2b und über eine konventionelle, ebenfalls *omp-1*-Gen detektierende PCR, welche mit nachfolgender Agarosegelelektrophorese den spezifischen Nachweis des L2b-Serovars ermöglichte [110]. Cai und Mitarbeiter sahen in einer Multiplex-Allel-spezifischen-PCR und in einer hochauflösenden Schmelzanalyse eine schnelle, günstige und einfache Methode zur Differenzierung der L-Serovar von den anderen *C. trachomatis* Serovaren [111]. Die Arbeitsgruppe von Morré verwendete zum Nachweis der LGV-Serovare eine Zielregion im *pmpH*-Gen und etablierte bereits 2005 eine TaqMan- und eine Rotorgene-PCR [54], welche einen wichtigen Ausgangspunkt für unsere Entwicklungen darstellte.

Wir nutzten die Methode der TaqMan-PCR mit all ihren oben beschriebenen Vorteilen zum Nachweis einer *C. trachomatis* Infektion durch Amplifikation des *omp-1*-Gens am MOMP-Gen und simultaner Amplifikation eines LGV-Serovar spezifischen Abschnittes auf dem *pmpH*-Gen. Die Konzeption der Duplex-TaqMan-PCR ersparte Zeit beim Pipettieren und senkte außerdem die Materialkosten. Es gelang so ein speziesspezifischer Erregernachweis innerhalb eines Tages. Dadurch könnte bei routinemäßigem Einsatz dieser PCR bei betroffenen Patienten zeitnah und adäquat eine Therapie eingeleitet werden mit dem Ziel die weitere Ausbreitung einzudämmen und Spätfolgen zu vermieden.

Die von Chen und Mitarbeitern entwickelte Multiplex-Real-time PCR wies im Vergleich zu der CTra-LGV-TaqMan-PCR eine noch überzeugendere Effektivität von 124 % für die Detektion der LGV- und der Nicht-LGV-Serovare auf [60]. In Bezug auf die Genotypisierung erzielten die Arbeitsgruppen Klint und Pedersen Fortschritte [33, 112, 113]. Der Nachteil des von Pedersen und Mitarbeitern entwickelten Verfahrens ist darin zu sehen, dass genauso wenig wie in der CTra-LGV-TaqMan-

PCR keine Mischinfektionen erfasst werden können [33, 113]. Die von Chen und Mitarbeitern entwickelte Quadriplex-Real-time PCR (vgl. Kap. 1.2.1.4) kann dahingegen auch Mischinfektionen detektieren [61]. Diese Methode ist somit als weiterer Fortschritt zu werten, bringt aber keinen direkten epidemiologischen Nutzen, da sie keine Differenzierung der verschiedenen L-Serovare leistet.

Aus epidemiologischem Interesse heraus wurde im Rahmen dieser Arbeit die L1-, L2- und L3-PCR entwickelt, welche genau diese Zuordnung zu den drei führenden L-Serovaren L1, L2 und L3 erlaubt (vgl. Kap. 2.1.7). In unseren ersten Untersuchungen wurden fünf Proben als L-Serovar in der CTra-LGV-TaqMan-PCR identifiziert. In der L1-, L2- und L3- PCR konnten alle fünf Proben im zweiten Schritt passend zu den Zahlen in Europa dem L2-Serovar zugeordnet werden, wobei die Sequenzierung die Zugehörigkeit zum L2b-Typ sicherstellte. In weiterführenden Untersuchungen wurden unter insgesamt 50 getesteten *C. trachomatis*-positiven Patientenproben zwei weitere LGV-Infektionen diagnostiziert, die ebenfalls dem L2-Serovar zugeordnet werden konnten. Eine Probe stellte sich als L2/L3-Doppelinfektion heraus [78].

Über neue L2-Serotyp-Varianten wurde von Forschern in Wien berichtet. Hier wurden drei L2-Serotypen mit abweichenden Nukleotiden in der VS1-, VS2- und VS4-Region des *omp-A*-Gens gefunden, welche als L2c-L2e bezeichnet wurden [114]. Schon 2007 waren in Portugal LGV-Infektionen bei Patienten, die nicht eindeutig Kontakte zur Gruppe der MSM hatten aufgefallen, welche durch L-Typen mit abweichenden Sequenzen im *omp-A*-Gen verursacht waren [115]. Neben dem in Europa vorherrschenden Auftretens des L2(b)-Serovars wurde interessanter Weise 1995 von Bauwens und Mitarbeitern über eine L1-Infektion bei einem MSM mit Proktitis berichtet [116].

Genotypisierungen von *C. trachomatis* zeigten, dass Rekombination zu Mosaik-Varianten von zwei Serotypen geführt hat [19-21]. So wurden L1/L2-Variaten beschrieben, welche durch Mosaik-Konstellationen in einer variablen Region (VS2) des *omp-1*-Gens entstanden sind [21]. Diese Rekombination im *omp-1*-Gen liegt gerade einmal 2 bp entfernt vom L1-Amplikon in der L1-PCR (vgl. Abb. 14 und 15). Die L1-PCR ist dementsprechend nicht in der Lage, einen reinen L1-Serotypen von einem L1/L2-Mosaiktypen zu unterscheiden. Bei positiver Amplifikation in der

L1-PCR, müsste zur Detektion der Mosaiktypen demnach eine Sequenzierung stromabwärts erfolgen, um eine klare Zuordnung treffen zu können. Dies wäre wiederum von epidemiologischem Interesse, da u. a. bei zunehmender Variation eine Abnahme in der Sensitivität der PCRs zu befürchten bleibt.

Um alle LGV-positiven Spezies exakt einem L-Sero(sub)typen zuzuordnen und mögliche genetische Veränderungen identifizieren zu können, ist die Sequenzierung größerer *omp-1* Genbereiche ein notwendiger Schritt, der nach einer Detektion in der TaqMan-PCR erfolgen sollte.

Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Chlamydia trachomatis ist die häufigste Ursache für eine Geschlechtskrankheit in Europa und auch den United States of America (USA) [1]. Als Zielgen in der *C. trachomatis* Diagnostik hat sich das MOMP-Protein wie auch das das MOMP-kodierende *omp-1*-Gen bewährt [33, 43-45]. Insgesamt können die durch *C. trachomatis* verursachten Krankheitsbilder in drei Gruppen unterteilt werden, welche z. B. in einem phylogenetischen Stammbaum abgebildet sind, der auf den Variationen des *polymorphic protein H (pmpH)*-Gens basiert. Entscheidend ist hierfür eine 36 bp Deletion der L-Serovare im *pmpH*-Gen.

Aufbauend auf einer bereits am hiesigen Institut etablierten TagMan-PCR zum Nachweis von C. trachomatis [51] und anlehnend an Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Morré [54], wurde im Rahmen dieser Arbeit eine CTra-LGV-Duplex-TaqMan-PCR entwickelt und validiert, welche eine schnelle und sichere Methode zur Detektion einer C. trachomatis Infektion (über Nachweis des omp1-Gens) und speziell der LGV-Serovare (über Nachweis des pmpH-Gens) darstellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Effektivität von 102 % für die CTra-PCR und von 97,4 % für die LGV-PCR ermittelt bei einem Detektionslimit von 50 Genomkopien pro Reaktion. Duplex-TagMan-PCR Diese ermöglicht nun eine züqiqe und adäguate Therapieeinleitung für die betroffenen Patienten, was auch unter dem Aspekt eines gegebenenfalls erhöhten HIV-Infektionsrisikos bei vorliegender LGV-Infektion und einem Schutz vor Spätfolgen der Erkrankung sowie vor Übertragung auf Sexualpartner entscheidend ist [4, 5, 7, 83].

Für epidemiologische Fragestellungen wurden darüber hinaus drei weitere TaqMan-PCRs entwickelt, welche die Identifizierung von L1-, L2- und L3-Serovaren ermöglichten. Aufgrund einer abweichenden Basenabfolge des L2-Amplikons zur entsprechenden Genregion im hauptsächlich in Europa unter MSM vertretenen L2b-Serovar, wurde im Rahmen dieser Arbeit die L123-PCR, deren Forward-Primer stromabwärts des L1- bzw. L2 bzw. L3-Forwardprimers ansetzt, entwickelt. So konnte die Zugehörigkeit der in den Patientenmaterialien detektierten L2-Serotypen zum L2b-Serovar bestätigt werden. Weitere Tests mit der L1L2-PCR, deren L1-Forwardprimer eine größere Homologie mit dem L2b-Serovar aufweist, zeigten, dass

Zusammenfassung

sich durch Einsatz des L1F-Primers die Sensitivität im L2b-Nachweis bei niedrigen Konzentrationen erhöhen lässt.

6 Literaturverzeichnis

- Haag P, Hanhart N, Müller M: Gynäkologie und Urologie 2005/2006,
 Auflage, S. 386 und S. 392-393, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisbach, 2005
- Hof H, Dörries R: Medizinische Mikrobiologie, 3. Auflage, S. 447-451 und
 S. 645, Duale Reihe, MLP, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005
- Robert Koch-Institut (Hrsg): Personen mit häufig wechselnden
 Sexualpartnern sollten spezielle Angebote der Untersuchung auf STD erhalten. Epidemiologisches Bulletin, 2003 (36): 289
- Van de Perre P, Segondy M, Foulongne V, Ouedraogo A, Konate I, Huraux JM, Mayaud P, Nagot N: Herpes simplex virus and HIV-1: deciphering viral synergy. Lancet Infect Dis (2008); 8 (8): 490-497
- Sheffield JS, Wendel GD Jr, McIntire DD, Norgard MV: Effect of genital ulcer disease on HIV-1 coreceptor expression in the female genital tract. J Infect Dis (2007); 196: 1509-1516
- 6 Nagot N, Ouedraogo A, Konate I, Weiss HA, Foulongne V, Defer MC, Sanon A, Becquart P, Segondy M, Sawadogo A, Van de Perre P, Mayaud P: Roles of clinical and subclinical reactivated herpes simplex virus type 2 and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-induced immunosuppression on genital and plasma HIV-1 levels. J Infect Dis. 2008 Jul 15; 198 (2): 241-9.

- 7 Fleming DT, Wasserheit JN: From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. Sex Transm Infect (1999); **75**: 3-17
- Robert Koch-Institut (Hrsg.): Zur Situation bei wichtigen
 Infektionskrankheiten: Gonorrhoe und genitale Chlamydiose in
 Deutschland nach Daten des STD-Sentinels des RKI. Epidemiologisches
 Bulletin, 2004 (39): 331-335
- Robert Koch-Institut (Hrsg.): Zur Situation bei wichtigen
 Infektionskrankheiten: Sexuell übertragbare Krankheiten (STDs) Sentineldaten des RKI von Januar 2003 bis Juni 2005. Epidemiologisches
 Bulletin, 2005 (43): 396-399
- Bush RM, Everett KDE: Molecular Evolution of the Chlamydiaceae. Int. J.
 Syst. Evol. Microbiol. (2001); 51: 203-220
- 11 Herold G (Autor und Hrsg): Innere Medizin, S. 346-347 und S. 577-578, Köln, 2008
- 12 Grehn F: Augenheilkunde, 29. Auflage, S. 99-102, Springer, Heidelberg, 2006
- Black CM: Current methods of laboratory Diagnosis of Chlaymdia trachomatis infections. Clinical Microbioligy Reviews (1997); 10: 160-184
- Tang FF, Chang HL, Huang YT, Wang KC: Studies on the etiology of trachoma with special reference to isolation of the virus in chick embryo.
 Chin Med J (1957); 75: 429-447

- 15 Wang SP, Graystone JT: Three new serovars of *Chlamydia trachomatis*: Da, la and L2a. J Infect Dis (1991); 163: 403-405
- Dean D, Suchland RJ, Stamm WE: Evidence for long-term cervical persistence of Chlamydia trachomatis by omp-1 genotyping. J Infect Dis (2000); 182: 909-916
- Spaargaren J, Fennema HAS, Morré SA, de Vries HJC, Coutinho RA: New
 lymphogranuloma venereum *Chlamydia trachomatis* variant, Amsterdam.
 Emerg Infect Dis (2005); 11: 1674-1676
- 18 Rodriguez P, Vekris A, de Barbeyrac B, Dutilh B, Bonnet J, Bebear C: Typing of Chlamydia trachomatis by restriction endonuclease analysis of the amplified major outer membrane protein gene. J Clin Microbiol (1991); 29: 1132-1136
- 19 Dean D, Schachter J, Dawson CR, Stephens RS: Comparison of the major outer membrane protein variant sequence regions of B/Ba isolates: a molecular epidemiologic approach to Chlamydia trachomatis infections. J Infect Dis (1992); 166: 383-392
- 20 Millman K, Black CM, Johnson RE, Stamm WE, Jones RB, Hook EW, Martin DH, Bolan G, Tavare S, Dean D: Population-based genetic and evolutionary analysis of *Chlamydia trachomatis* urogenital strain variation in the United States. J Bacteriol (2004); 186: 2457-2465
- Hayes LJ, Yearsley P, Treharne JD, Ballard RA, Fehler GH, Ward ME:
 Evidence for naturally occurring recombination in the gene encoding the
 major outer membrane protein of lymphogranuloma venereum isolates of

Chlamydia trachomatis. Infect Immun (1994); 62: 5659-5663

- 22 Mabey D, Peeling RW: Lymphogranuloma venereum. Sex Transm Infect 2002; **78**: 90-92
- Waalboer R, van der Snoek EM, van der Meijden WI, Mulder PGH,
 Ossewaarde JM: Analysis of rectal *Chlamydia trachomatis* serovar
 distribution including L2 (lymphogranuloma venereum) at Erasmus MC
 STI clinic, Rotterdam. Sex transm Infect (2006); 82 (3): 207-211
- Robert Koch-Institut (Hrsg.): Ratgeber Infektionskrankheiten, 22. Folge:
 Chlamydiosen (Teil 1): Erkrankungen durch Chlamydia trachomatis.
 Epidemiologisches Bulletin, 2001 (12): 83-86
- Mc Lean CA, Stoner BP, Workowski KA: Treatment of lymphogranuloma
 venereum. Clin Infect Dis (2007); 44: 147-152
- Hoyme U: Chlamydia trachomatis- Infektion in der Schwangerschaft.
 Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V., Leitlinien,
 Empfehlungen, Stellungnahmen. Stand August 2008.
 http://www.dggg.de/fileadmin/public_docs/Leitlinien/g_03_06_04_chlamydiatrac
 homatisinfektion_schwangerschaft.pdf
- Kucinskiene V, Sutaite I, Valiukeviciene S, Milasauskiene Z, Domeika M:
 Prevalence and risk factors of genital *Chlamydia trachomatis* infection.
 Medicina (Kaunas) (2006); 42 (11): 885-894
- Gille G, Klapp C, Diedrich K, Schäfer A, Moter A, Griesinger G, Kirschner R:
 Chlamydien- eine heimliche Epidemie unter Jugendlichen.
Prävalenzbeobachtung bei jungen Mädchen in Berlin. Dtsch Arztebl. (2005); **102** (28-29): A 2021-A 2025

- Niccolai LM, Rowhani-Rahbar A, Jenkins H, Green S, Dunne DW: Condome effectiveness for prevention of *Chlamydia trachomatis* infection. Sex Transm Infect (2005); 81: 323-325
- 30 Evans RT, Taylor-Robinson D: Detection of *Chlamydia trachomatis* in rapidly produced McCoy cell monolayers. J Clin Pathol (1980); **33**: 591-594
- Thewessen EAPM, Freundt I, van Rijsoort-Vos JH, Stolz E, Michel MF,
 Wagenvoort JHT: Comparison of HeLa 229 and McCoy Cell Cultures for
 Detection of Chlamydia trachomatis in Clinical Specimens. J Clin Microbiol;
 June (1989): 1399-1400
- Wong KH, Skelton SK, Daugharty H: Utility of Complement Fixation an Microimmunofluorescence Assays For Detecting Serologic Responses in Patients with Clinically Diagnosed Psittacosis. J Clin Microbiol. 1994 October; 32 (10): 2417-2421
- Pedersen LN, Herrmann B, Moller JK: Typing Chlamydia trachomatis: from egg yolk to nanotechnology. FEMS Immunol Med Microbiol (2009); 55:
 120-130
- Wang SP, Grayston JT: Classification of Trachoma Virus Strains by
 Protection of Mice from Toxic Death. J Immunol. 1963 Jun; 90: 849-856

- Wang SP, Grayston JT, Gale JL: Three New Immunological Types of Trachoma-Inclusion Conjunctivities Organisms. J Immunol. 1973 Mar; 110 (3): 873-879
- Wang SP, Grayston JT, Alexander ER, Holmes KK: Simplified
 Microimmunfluorescence Test with Trachoma-Lymphogranuloma
 Venereum (*Chlamydia trachomatis*) Antigens for Use as a Screening Test
 for Antibody. J Clin Microbiol. 1975 Mar; 1 (3): 250-255
- Wang SP, Kuo CC, Barnes RC, Stephens RS, Grayston JT: Immunotyping of Chlamydia trachomatis with monoclonal antibodies. J Infect Dis. 1985 Oct;
 152 (4): 791-800
- Stephens RS, Tam MR, Kuo CC, Nowinski RC: Monoclonal antibodies to
 Chlamydia trachomatis: antibody specificities and antigen
 characterization. J Immunol. 1982 Mar; 128 (3): 1083-1089
- Clad A, Freidank HM, Kunze M, Schnoeckel U, Hofmeier S, Flecken U,
 Petersen EE: Detection of seroconversion and persistence of *Chlamydia trachomatis* antibodies in five different serological tests. Eur J Clin
 Microbiol Infect Dis (2000); 19: 932-937
- 40 Wang SP, Grayston JT: Human serology in *Chlamydia trachomatis* infection with microimmunofluorescence. J Infect Dis (1974); **130**: 388-397
- 41 Tuuminen T, Palomäki P, Paavonen J: The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections. J Microbiol Methods (2000); **42**: 265-279

- Land JA, Gijsen AP, Kessels AGH, Slobbe MEP, Bruggemann CA:
 Performance of five serological chlamydia antibody tests in subfertile women. Human Reproduction (2003); 18 (12): 2621-2627
- 43 Morré SA, Ossewaarde JM, Lan J, van Doornum GJJ, Walboomers JMM, MacLaren DM, Meijer CJLM, van den Brule AJC: Serotyping and genotyping of genital *Chlamydia trachomatis* isolates reveal variants of serovars Ba, G, and J as confirmed by omp1 nucleotide sequence analysis. J Clin Microbiol (1998); 36 (2): 345-351
- Lan J, Walboomers JMM, Roosendaal R, van Doornum GJJ, MacLaren DM, Meijer CJLM, van den Brule AJC: Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol (1993); **31** (5): 1060-1065
- 45 Molano M, Meijer CJLM, Morré SA, Pol R, van den Brule AJC: Combination of PCR targeting the VD2 of omp1 and Reverse line blot analysis for typing of urogenital Chlamydia trachomatis serovars in cervical scrape specimens. J Clin Microbiol (2004); 42 (7): 2935-2939
- Dean D, Stephens RS: Identification of individual genotypes of Chlamydia trachomatis from experimentally mixed serovars and mixed infections among trachoma patients. J Clin Microbiol (1994); 32: 1506-1510
- 47 Dean D, Millman K: Molecular and mutation trends analyses of *omp-I* alleles for serovar E of *Chlamydia trachomatis*. Implications for the immunopathogenesis of disease. J Clin Invest (1997); **99**: 475-483

- 48 Molano M, Meijer CJLM, Morré SA, Pol R, van den Brule AJC: Combination of PCR targeting the VD2 of omp-I and Reverse line blot analysis for typing of urogenital Chlamydia trachomatis serovars in cervical scrape specimens. J Clin Microbiol (2004); 42: 2935-2939
- 49 Lan J, Ossewaarde JM, Walboomers JMM, Meijer CJLM, van den Brule AJC:
 Improved PCR sensitivity for direct genotyping of *Chlamydia trachomatis* serovars by using a nested PCR. J Clin Microbiol (1994); 32 (2): 528-530
- 50 Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. Meth Enymol (1987); **155**: 335-350
- 51 Geisel R, Geisel S, Schmitz FJ, Henrich B: Modern diagnostics for urological infections. Urologe A (2003); **42**: 634-640
- Bauwens JE, Orlander H, Gomez MP, Lampe M, Morse S, Stamm WE, Cone R, Ashley R, Swenson P, Holmes KK: Epidemic lymphogranuloma venereum during epidemics of crack cocaine use and HIV infection in the Bahamas. Sex Trans Dis (2002); 29 (5): 253-258
- 53 Schachter J, Osoba AO: Lymphogranuloma venereum. Br Med Bull (1983);39: 151-154
- Morré SA, Spaargaren J, Fennema JS, de Vries HJ, Coutinho RA, Pena AS:
 Real-time polymerase chain reaction to diagnose lymphogranuloma
 venereum. Emerg Infect Dis (2005); 11:1311-1312
- 55 Read TD, Brunham RC, Shen C, Gill SR, Heidelberg JF, White O, Hickey EK, Peterson J, Utterback T, Berry K, Bass S, Linher K, Weidman J, Khouri H,

Craven B, Bowman C, Dodson R, Gwinn M, Nelson W, DeBoy R, Kolonay J, McClarty G, Salzberg SL, Eisen J, Fraser CM: **Genome sequences of** *Chlamydia trachomatis* **MoPn and** *Chlamydia pneumoniae* **AR39.** Nucleic Acids Res. 2000 Mar 15; **28** (6): 1397-406.

- Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, Mitchell W,
 Olinger L: Genome sequence of an obligate intracellular pathogens of
 humans: Chlamydia trachomatis. Science (1998); 282: 754-759
- 57 Grimwood J, Stephens RS: Computational analysis of the *polymorphic membrane protein* superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumonia.* Microb. Comp. Genomics (1999); **4**: 187-201
- 58 Stothard DR, Toth GA, Batteiger BE: *Polymorphic membrane protein H* has envolved in parallel with the three disease-causing groups of *Chlamydia trachomatis.* Infect Immun (2003); **71**: 1200-1208
- 59 Tanzer RJ, Longbottom D, Hatch TP: Identification of Polymorphic Outer
 Membrane Proteins of Chlamydia psittaci 6BC. Infect. Immun. (2001); 69:
 2428-2434
- 60 Chen C-Y, Chi K-H, Alexander S, Martin IMC, Liu H, Ison CA, Ballard RC: The Molecular Diagnosis of Lymphogranuloma Venereum: Evaluation of a Real-Time Multiplex Polymerase Chain Reaction Test Using Rectal and Urethral Specimens. Sex Transm Dis Juli 2007; 34 (7): 451-455
- 61 Chen CY, CHI KH, Alexander S, Ison CA, Ballard RC: A real-time quadriplex PCR assay for the diagnosis of rectal lymphogranuloma venereum and non-lymphogranuloma venereum Chlamydia trachomatis infections. Sex Transm Infect. 2008 Aug; 84 (4): 252-253

- 62 Nieuwenhuis RF, Ossewaarde JM, van der Meijden WI, Neumann HAM: Unusual presentation of early lymphogranuloma venereum in an HIV-1 infected patient: effective treatment with 1 g azithromycin. Sex transm infect (2003); 79: 453-455
- Götz H, Nieuwenhuis R, Ossewaarde T, Bing Thio H, van der Meijden W, Dees J, de Zwart O: Preliminary report of an outbreak of lymphogranuloma venereum in homosexual men in the Netherlands, with implications for other countries in western Europe. Eurosurveill 2004; 8 (4): 22/01/2004
- 64 Centers for Disease Control and Prevention: Lymphogranuloma venereum among men who have sex with men-Netherlands, 2003-2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep (2004); 53: 985-988
- v Krosigk A, Meyer T, Jordan S, Graefe K, Plettenberg A, Stoehr A: Dramatic increase in lymphogranuloma venereum among homosexual men in Hamburg. J Dtsch Dermatol Ges. (2004); 2 (8): 676-680
- Rampf J, Essig A, Hinrichs R, Merkel M, Scharffetter-Kochanek K, Sunderkotter
 C: Lymphogranuloma venereum-a rare cause of genital ulcers in central
 Europe. Dermatology (2004); 209 (3): 230-232
- Bremer V, Meyer T, Marcus U, Hamouda O: Lymphogranuloma venereum emerging in men who has sex with men in Germany. Euro Surveill (2006);
 11 (9): 152-154
- 68 Herida M, de Barbeyrac B, Sednauoui P, Scieux C, Lemarchand N, Kreplak G, Clerc M, Timsit J, Goulet V, Desenclos JC, Semaille C: **Rectal**

lymphogranuloma venereum surveillance in France 2004-2005. Euro Surveill 2006; **11** (9): 155-156

- Jebbari H, Alexander S, Ward H, Evans B, Solomou M, Thornton A, Dean G,
 White J, French P, Ison C: Update on lymphogranuloma venereum in the
 United Kingdom. Sex Transm Infect (2007); 83 (4): 324-326
- Vall Mayans M, Sanz Colomo B, Ossewaarde JM: First case of LGV
 confirmed in Barcelona. Eurosurveill (2005); 10 (5): 03/02/2005
- 71 Eisen DP: Locally acquired lymphogranuloma venereum in a bisexual man. Med JA (2005); **183** (4): 218-219
- 72 Stark D, van Hal S, Hillman R, Harkness J, Marriott D: Lymphogranuloma venereum in Australia: anorectal *Chlamydia trachomatis* serovar L2b in men who have sex with men. J Clin Microbiol (2007); **45** (3): 1029-1031.
- Kropp RY, Wong T. On behalf of the Canadian LGV Working Group:
 Emergence of lymphogranuloma venereum in Canada. CMAJ (2005); 172: 1674-1676
- Spaaragen J, Schachter J, Moncada J, de Vries HJC, Fennema HS, Pena AS,
 Coutinho RA, Morré SA: Slow epidemic of lymphogranuloma venereum L2b
 strain. Emerg Inf Dis (2005); 11: 1787-1788
- 75 Sambrook J, Russell DW: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Volume
 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2001

- Kalman S, Mitchell W, Marathe R, Lammel C, Fan J, Hyman RW, Olinger L,
 Grimwood J, Davis W, Stephens RS: Comparative genoms of Chlamydia
 pneumoniae and C. trachomatis. Nat. Genet. (1999); 21: 385-389
- Grimwood J, Olinger L, Stephens RS: Expression of Chlamydia pneumonia
 Polymorphic Membrane Protein Family Genes. Infect. Immun. (2001); 69
 (4): 2383-2389
- Schaeffer A, Henrich B: Rapid detection of *Chlamydia trachomatis* and typing oft he Lymphogranuloma venereum associated L-Serovars by TaqMan PCR. BMC Infectious diseases (2008); 8: 56
- 79 Martin-Iguacel R, Llibre JM, Nielsen H, Heras E, Matas L, Lugo R, Clotet B, Sirera G: Lymphogranuloma venereum proctocolitis: a silent endemic disease in men who have sex with men in industrial countries. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010 May 28
- Robertson A, Azariah S, Bromhead C, Tabrizi S, Blackmore T: Case report:
 lymphogranuloma venereum in New Zealand. Sex Health. (2008); 5 (4): 369-370
- De Munain JL, Ezpeleta G, Imaz M, Del Mar Camara M, Esteban V,
 Santamaria JM, Cisterna R: Two lymphogranuloma venereum cases in a
 heterosexual couple in Bilbao (Spain). Sex Transm Dis (2008); 35 (11): 918 919
- 82 Savage EJ, van de Laar MJ, Gallay A, van der Sande M, Hamouda O, Sasse A, Hoffmann S, Diez M, Borrego MJ, Lowndes CM, Ison C; European Surveillance of Sexually Transmitted Infections (ESSTI) network. Lymphogranuloma venereum in Europe, 2003-2008. Euro Surveill. (2009); 14 (48). pii: 19428.

- 83 White JA: Manifestations and management of lymphogranuloma venereum. Curr Opin Infect Dis. (2009); **22** (1): 57-66
- Ward H, Martin I, Macdonald N, Alexander S, Simms I, Fenton K, French P,
 Dean G, Ison C: Lymphogranuloma Venereum in the United Kingdom. Clin
 Infect Dis. (2007); 44 (1): 26-32.
- Kamarashev J, Riess CE, Mosimann J, Läuchli S: Lymphogranuloma
 venereum in Zurich Switzerland: *Chlamydia trachomatis* serovar L2
 proctitis among men who have sex with men. Swiss Med Wkly. (2010)
- McMillan A, van Voorst Vader PC, de Vries HJ: The 2007 European Guideline (International Union against Sexually Transmitted Infections/World Health Organization) on the management of proctitis, proctocolitis and enteritis caused by sexually transmissible pathogens. Int J STD AIDS. (2007); 18 (8): 514-520
- Savage EJ, Hughes G, Ison C, Lowndes CM, the European Surveillance of Sexually Transmitted Infections (ESSTI) network: Syphilis and gonorrhea in men who have sex with men: a European overview. Euro Surveill (2009); 14 (47): pii=19417
- 88 Annan NT, Sullivan AK, Nori A, Naydenova P, Alexander S, McKenna A, Azadian B, Mandalia S, Rossi M, Ward H, Nwokolo N: Rectal Chlamydia- a reservoir of undiagnosed infection in men who have sex with men. Sex Transm Infect. 2009 Jun; 85 (3): 176-179. Epub 2009 Jan 28.

- 89 Tinmouth J, Gilmour MW, Kovacs C, Kropp R, Mitterni L, Rachlis A, Richards S, Salit I, Sikri R, Valencia GR, Wesson T, Wong T, Wood H: Is there a reservoir of sub-clinical lymphogranuloma venereum and non-LGV *Chlamydia trachomatis* infection in men who have sex with men? Int J STD AIDS. (2008); **19** (12): 805-809.
- 90 Ward H, Alexander S, Carder C, Dean G, French P, Ivens D, Ling C, Paul J, Tong W, White J, Ison CA: The prevalence of Lymphogranuloma venereum infection in men who have sex in men: results of a multicentre case finding study. Sex Transm Inf (2009); 85: 173-175
- 91 Guimarães EM, Guimarães MD, Vieira MA, Bontempo NM, Seixas MS, Garcia MS, Daud LE, Côrtes RL, Alves Mde F: Lack of utility of risk score and gynecological examination for screening for sexually transmitted infections in sexually active adolescents. BMC Med. (2009); 7: 8.
- Kivi M, Koedijk FD, van der Sande M, van de Laar MJ: Evaluation prompting transition from enhanced to routine surveillance of lymphogranuloma venereum (LGV) in the Netherlands. Euro Surveill. 2008 Apr 3; 13 (14). pii: 8087.
- 93 Regan DG, Wilson DP, Hocking JS: Coverage is the key for effective screening of *Chlamydia trachomatis* in Australia. J Infect Dis. 2008 Aug 1;
 198 (3): 349-358
- 94 de Vries HJ, Smelov V, Middelburg JG, Pleijster J, Speksnijder AG, Morré SA:
 Delayed microbial cure of lymphogranuloma venereum proctitis with doxycycline treatment. Clin Infect Dis. 2009 Mar 1; 48 (5): e53-6.

- Lee LG, Connell CR, Bloch W: Allelic discrimination by nick-translation
 PCR with fluorogenic probes. Nucleic Acids Res. 1993 Aug 11; 21 (16):
 3761-3766
- D´Agata R, Corradini R, Grasso G, Marchelli R, Spoto G: Ultrasensitive detection of DNA by PNA and nanoparticle-enhanced surface Plasmon resonance imaging. Chemobiochem. 2008 Sep 1; 9 (13): 2067-2670
- Jalal H, Stephen H, Al-Suwaine A, Sonnex C, Carne C: The superiority of polymerase chain reaction over an amplified enzyme immunoassay for the detection of genital chlamydial infections. Sex Transm Infect (2006); 82: 37-40
- Jaton K, Bille J, Greub G: A novel real-time PCR to detect Chlamydia trachomatis in first-void urine or genital swabs. Med Microbiol (2006),
 55: 1667-1674
- 99 Halse TA, Musser KA, Limberger RJ: A multiplexed real-time PCR assay for rapid detection of *Chlamydia trachomatis* and identification of serovar L-2, the major cause of Lymphogranuloma venereum in New York. Mol Cell Probes. 2006 Oct; 20 (5): 290-7. Epub 2006 Mar 6
- Ripa T, Nilsson P: A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. Euro Surveill.
 2006 Nov 9; 11 (11): E061109.2.
- 101 Catsburg A, van Dommelen L, Smelov V, de Vries HJ, Savitcheva A, Domeika M, Herrmann B, Ouburg S, Hoebe CJ, Nilsson A, Savelkoul PH, Morré SA:
 TaqMan assay for Swedish Chlamydia trachomatis variant. Emerg Infect Dis. 2007 Sep; 13 (9): 1432-1434

- Gomes JP, Bruno WJ, Nunes A, Santos N, Florindo C, Borrego MJ, Dean D:
 Evolution of *Chlamydia trachomatis* diversity occurs by widespread interstrain recombination involving hotspots. Genome Res (2007); 45: 1410-1414
- 103 Forsbach-Birk V, Simnacher U, Pfrepper KI, Soutschek E, Kiselev AO, Lampe MF, Meyer T, Straube E, Essig A: Identification and Evaluation of a Combination of Chlamydial Antigens to Support the Diagnosis of Severe and Invasive Chlamydia trachomatis Infections. Clin Microbiol Infect 2009 Sept 1
- 104 Van der Snoek EM, Ossewaarde JM, van der Meijden WI, Mulder PG, Thio HB: The use of serological titres of IgA and IgG in (early) discrimination between rectal infection with non-lymphogranuloma venereum and lymphogranuloma venereum serovars of *Chlamydia trachomatis*. Sex Transm Infect 2008 Feb; 84 (1): 77-78
- Xiong L, Kong F, Zhou H, Gilbert GL: Use of PCR and reverse line blot hybridization assay for rapid simultaneous detection and serovar identification of *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol (2006); 44: 1413-1418
- 106 Quint K, Porras C, Safaeian M, González P, Hildesheim A, Quint W, van Doorn LJ, Silva S, Melchers W, Schiffman M, Rodríguez AC, Wacholder S, Freer E, Cortes B, Herrero R: Evaluation of a novel PCR-based assay for detection and identification of *Chlamydia trachomatis* serovars in cervical specimens. J Clin Microbiol (2007); 45: 3986-3991

- 107 Jalal H, Stephen H, Alexander S, Carne C, Sonnex C: Developement of realtime PCR assay for genotyping of *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol (2007); 45: 2649-2653
- 108 Xia QF, Xu SX, Wang DS, Wen YA, Qin X, Qian SY, Zhan ZL, Wang HM, Lin YZ, Tu ZG: Development of a novel quantitative real-time assay using duplex scorpion primer for detection of *Chlamydia trachomatis*. Exp Mol Pathol 2007 Aug; 83 (1): 119-124. Epub 2007 Jan 12
- Carters R, Ferguson J, Gaut R, Ravetto P, Thelwell N, whitcombe D: Design and use of scorpion fluorescent signalling molecules. Methods Mol Biol. (2008); 429: 99-115
- Goldenberger D, Gebhardt M, Dutly F: Developement of PCR tests to detect
 Lymphogranuloma venereum serotype L2 and variant L2b. Int J Med
 Microbiol (2006); 11: E0610184
- 111 Cai L, Kong F, Toi C, van Hal S, Gilbert GL: Differentiation of Chlaymdia trachomatis lymphogranuloma venereum-related serovars from other serovars using multiplex allele-specific polymerase chain reaction and high-resolution melting analysis. Int J STD AIDS 2010 Feb; 21 (2): 101-104
- 112 Klint M, Fuxelius HH, Goldkuhl RR, Skarin H, Rutemark C, Andersson SG,
 Persson K, Herrmann B: High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis. J Clin Microbiol 2007 May; 45 (5): 1410-1414
- 113 Pedersen LN, Pødenphant L, Møller JK: Highly discriminative genotyping of Chlamydia trachomatis using omp1 and a set of variable number tandem repeats. Clin Microbiol Infect. 2008 Jul; 14 (7): 644-652

- Stary G, Meyer T, Bangert C, Kohrgruber N, Gmeinhart B, Kirnbauer R, Jantschitsch C, Rieger A, Stary A, Geusau A: New Chlamydia trachomatis L2 strains identified in a recent outbreak of lymphogranuloma venereum in Vienna, Austria. Sex Transm Dis (2008); 35 (4): 377-382
- 115 Gomes JP, Nunes A, Florindo C, Ferreira MA, Santo I, Azevedo J, Borrego MJ:
 Lymphogranuloma venereum in Portugal: unusual events and new
 variants during 2007. Sex Transm Dis (2009); 36 (2): 88-91
- 116 Bauwens JE, Lampe MF, Suchland RJ, Wong K, Stamm WE: Infection with Chlamydia trachomatis lymphogranuloma venereum serovar L1 in homosexual men with proctitis: molecular analysis of an unusual case cluster. Clin Infect Dis (1995); 20: 576-581

Abkürzungsverzeichnis

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Aqua des.	destilliertes H ₂ O
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
C. trachomatis	Chlamydia trachomatis
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Ethylendiamintetraessigsäure)
g	Gramm
gap	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Gen)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Protein)
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
Кар.	Kapitel
Kb	Kilobasen
KZ	Kopienzahl

Abkürzungsverzeichnis

l	Liter	
LB	Luria-Bertani (Medium)	
LGV	Lymphogranuloma venereum	
m	milli	
M	Molar	
μ	micro	
min	Minute	
MIF	Mikroimmunfluoreszenz	
MOMP	major outer membrane protein	
MSM	Men who have sex with men	
MTPT	mouse toxicity prevention test	
nm	Nanometer	
OD	Optische Dichte	
PBS	Phosphate buffered Saline	
PCR	Polymerase chain reaction	
pmol	Pikomol	
PmpH	polymorphic/probable protein H	
рН	"potentia Hydrogenii"	
p.o.	per os	
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus	
RKI	Robert Koch-Institut	
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)	
RT	Raumtemperatur	
S.	Seite	
STD(s)	Sexuell transmitted disease(s)	
	(sexuell übertragbare Erkrankung(en))	

Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-Puffer
ТН	Threshold-Wert
U	Units, Einheiten
u. a.	unter anderem
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtprozent
z. B.	zum Beispiel
%	Prozent