

Journal für Kardiologie

Austrian Journal of Cardiology

Österreichische Zeitschrift für Herz-Kreislauserkrankungen

**Anzucht von Chlamydia pneumoniae
aus atherosklerotischen Gefäßen und
kontinuierliches Wachstum in vitro**

Apfalter P, Nehr M

Journal für Kardiologie - Austrian

Journal of Cardiology 2001; 8 (4)

104-108

Homepage:

www.kup.at/kardiologie

Online-Datenbank
mit Autoren-
und Stichwortsuche



Offizielles
Partnerjournal der ÖKG



Member of the ESC-Editor's Club



Offizielles Organ des
Österreichischen Herzfonds



ACVC
Association for
Acute CardioVascular Care

In Kooperation
mit der ACVC

Indexed in ESCI
part of Web of Science

Indexed in EMBASE

Krause & Pachernegg GmbH • Verlag für Medizin und Wirtschaft • A-3003 Gablitz

P.b.b. 02Z031105M,

Verlagsort: 3003 Gablitz, Linzerstraße 177A/21

Preis: EUR 10,-

Veranstaltungskalender

Hybrid-Veranstaltungen der Herausgeber des **Journals für Kardiologie**

Finden Sie alle laufend aktualisierten Termine
auf einem Blick unter

www.kup.at/images/ads/kongress.pdf

Anzucht von *Chlamydia pneumoniae* aus atherosklerotischen Gefäßen und kontinuierliches Wachstum in vitro

P. Apfalter, M. Nehr

Ob und in welcher Form *Chlamydia (C.) pneumoniae* an der Atherogenese beteiligt ist, wird zur Zeit intensiv und teils kontroversiell wissenschaftlich diskutiert. Während die mittels molekularbiologischer Tests erzielten Nachweisraten zwischen 0 und 100 % schwanken, gelang die im Hinblick auf die Klärung kausaler Zusammenhänge wesentlich bedeutsamere Anzucht des Erregers aus Gefäßen, sowie deren Überleben über längere Zeit unter in-vitro Bedingungen, nur in sehr wenigen Fällen. Mit dem Ziel, eine derartige Stammsammlung „vaskulärer Isolate“ aufzubauen, wurde ein Zellkultursystem etabliert. Der Erreger konnte aus 38 Gefäßen unterschiedlicher Lokalisation in drei Fällen (7,9 %) angezüchtet werden. Die Bestätigung des Erregers als *C. pneumoniae* erfolgte mittels indirekter, speziesspezifischer Immunfluoreszenz sowie mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zweier für *C. pneumoniae* spezifischer Genregionen: durch Amplifikation von Fragmenten des 16S rRNA- und des 3-Deoxy-Alpha-D-Mannose-Octulosäuretransferase (KDO-Transferase) Gens. Die drei Isolate stammen aus der Arteria carotis, der Arteria femoralis sowie einem infrarenalen Bauchaortenaneurysma dreier männlicher Atherosklerosepatienten und zeigen, daß sich lebensfähige *C. pneumoniae*-Stämme auch aus anderen als den bisher vereinzelt beschriebenen Gefäßregionen (Herzkranzgefäße, Arteria carotis) isolieren und kontinuierlich in vitro züchten lassen.

The question of whether and how *Chlamydia (C.) pneumoniae* is involved in atherogenesis is currently subject to intensive and partly controversial scientific discussion. While positivity rates obtained from endarterectomy specimens – reported for molecular biological tests – range from 0 to 100 %, attempts to isolate the pathogen from vascular specimens – being of much higher relevance for the clarification of a possible causal relationship – have only been successful in very few cases. For the purpose of collecting such strains of vascular origin, a cell culture system has been established. Using specimens obtained from 38 vascular sites of different location, the organism could be isolated in three of these cases (7.9 %) and identity as *C. pneumoniae* was confirmed by means of indirect, species-specific immunofluorescence as well as polymerase chain reaction of the 16S rRNA gene and the 3-deoxy-alpha-D-manno-octulosonic acid transferase (KDO-transferase) gene. The isolates were obtained from specimens of the carotid artery, the femoral artery and the infrarenal aneurysm of the abdominal aorta of three male atherosclerosis patients and show that viable *C. pneumoniae* strains may also be isolated from other vascular regions than those hitherto described. Furthermore all three strains allow for continuous in vitro propagation. *J Kardiologie* 2001; 8: 104–8

Chlamydia (C.) pneumoniae ist ein häufiger Erreger von Infektionen des oberen und unteren Respirationstrakts und verursacht 10–15 % der Fälle von ambulant erworbenen Pneumonien sowie Bronchitiden und Pharyngitiden [1, 2]. Seroepidemiologischen Studien zufolge infiziert sich beinahe jeder Mensch im Laufe des Lebens mit diesem Erreger, wobei Reinfektionen häufig sind [1]. Durch *C. pneumoniae* verursachte Atemwegsinfektionen entwickeln sich oft asymptomatisch, können chronisch persistieren [3, 4] und wurden kürzlich mit der Entstehung von Atherosklerose in Zusammenhang gebracht [5]. Erste derartige Daten stammten von seroepidemiologischen Studien, wobei sich sowohl die abgelaufene als auch die chronische *C. pneumoniae*-Infektion als unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose errechnen ließen [5].

Mittlerweile liegt eine Reihe von molekularbiologischen Untersuchungen vor, in denen Erregerbestandteile in atheromatös veränderten Gefäßen in bis zu 100 % der Fälle nachgewiesen werden konnten [6–12]. Im Gegensatz dazu gelang die Anzucht des Erregers bisher nur in wenigen Fällen. Weltweit berichteten lediglich drei Arbeitsgruppen über die erfolgreiche Isolation von *C. pneumoniae* aus Gefäßen, wobei diese Isolate entweder aus Herzkranzgefäßen, restenotierten Bypassgefäßen oder der Arteria carotis stammten [10–12].

Neben den Schwierigkeiten bei der Anzucht des Erregers mittels Zellkultur bereitet das kontinuierliche *In-vitro*-Wachstum einmal isolierter Stämme weitere Probleme. Aus noch nicht geklärten Gründen dürften die Isolate mit der Zeit unter Laborbedingungen an Infektiosität verlieren [12] und somit für weitere, detailliertere Analysen verlorengelassen. Gerade Stammsammlungen mit Isolaten unter-

schiedlicher Herkunft, sowohl bezüglich ihrer anatomischen Lokalisation als auch dem Vorkommen bei verschiedenen Krankheitsbildern, stellen aber die Basis für eine genauere Charakterisierung solcher Stämme dar. Darüber hinaus könnte der Vergleich derartiger Isolate Einblick in pathogenetische Zusammenhänge verschiedener Krankheitsbilder gewähren und somit auch bei der Beantwortung der weiterhin ungeklärten Frage nach dem kausalen Zusammenhang der *C. pneumoniae*-Infektion und der Atherosklerose weiterhelfen. Mit dem Ziel, eine derartige „vaskuläre“ Stammsammlung aufzubauen und in weiterer Folge diese Stämme dann näher zu charakterisieren, wurde ein Zellkultursystem zur Anzucht von *C. pneumoniae* aus atheromatös verändertem Gefäßmaterial an unserer Abteilung etabliert.

Material und Methoden

Patienten und Untersuchungsmaterial

Von Juni 1998 bis April 1999 konnte im Rahmen einer prospektiven Studie atherosklerotisch verändertes Gefäßmaterial von 38 Patienten (30 männlich, 8 weiblich, 51–87 Jahre, Durchschnittsalter 69 Jahre) untersucht werden. Sechszunddreißig Patienten mußten sich wegen hochgradig stenotischer Veränderungen einer Endarterektomie unterziehen, bei zwei Patienten wurde ein Aortenklappenersatz bei zugrundeliegender schwerer, generalisierter Atherosklerose durchgeführt. Insgesamt standen Operationspräparate folgender Lokalisationen zur Verfügung: Arteria carotis (n = 21), Arteria femoralis (n = 2), Arteria iliaca (n = 1), Ramus circumflexus der linken Koronararterie (n = 1), Aorta abdominalis bzw. Bauchaortenaneurysmen (n = 11) sowie Aortenklappe (n = 2). Das Untersuchungsmaterial wurde unmittelbar nach der Entnahme in ein spezielles, mit 0,03 mg/ml Gentamycin (Gibco BRL), 0,15 mg/ml Vancomycin (Abbott, Austria) und 0,006 mg/ml Amphotericin B

Eingelangt am 18. 5. 2000, revidierte Fassung eingelangt am 15. 9. 2000, angenommen am 12. 12. 2000.

Aus der Abteilung für Klinische Mikrobiologie der Universität Wien am AKH Wien

Korrespondenzadresse: Dr. Petra Apfalter, Abteilung für Klinische Mikrobiologie, Universität Wien, A-1090 Wien, Währinger Gürtel 18–20, E-Mail: petra.apfalter@akh-wien.ac.at

(Bristol-Myers Squibb, Austria) supplementiertes Transportmedium [12] eingebracht und sofort in das mikrobiologische Labor gebracht, wo es unter sterilen Bedingungen zu 20 mg/ml homogenisiert wurde. Da zweimal wöchentlich frische HEp-2 Zellmonolayer verfügbar sind, konnten – je nach Eingang der Materialien – 12 Gefäßproben sofort auf Zellen aufgebracht werden. 26 Gefäßhomogenisate wurden zwischenzeitlich bei -80°C gelagert, wobei die maximale Lagerzeit bei -80°C drei Tage betrug.

Zellkultur

20 mg Gefäßhomogenisat wurden in Anlehnung an die von Maass et al. [13] publizierte Methode auf eine zu 80 % mit HEp-2 Zellen (CCL-23, ATCC) bewachsene Vertiefung einer Sechs-Loch-Gewebekulturplatte (Fläche $9,4\text{ cm}^2$) aufzentrifugiert (45 min, $1700\times g$, Raumtemperatur). Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde der Kontrollstamm (MUL-1, Prof. M. Maass, Universität Lübeck, Deutschland) strikt auf einer eigenen Platte gezogen und Negativkontrollen, bestehend aus nicht infizierten HEp-2-Zellen, auf jeder Patientenplatte mitgeführt. Die Bebrütung erfolgte bei 37°C und 5 % CO_2 für die Dauer von mindestens 72 und maximal 92 Stunden pro Passage. Es wurden mindestens 10 Passagen in serumfreiem Infektionsmedium (die Zusammensetzung entsprach dem Transportmedium) durchgeführt. Der Erfolg der einzelnen Zellkulturpassagen wurde vorerst mit einer direkten, genusspezifischen Immunfluoreszenzfärbung (DIF) (IMAGENTM-Chlamydia, DAKO Ltd, England) der infizierten, bebrüteten Deckgläschen jeweils nach der 3., 5. und 8. Zellkulturpassage überprüft. Wenn die DIF aufgrund unspezifischer Anfärbungen des klinischen Materials schlecht zu beurteilen war, wurde die Probe bei der folgenden Passage auf einen flächenmäßig größeren Zellmonolayer aufgebracht, wobei durch die hiermit erzielte „Probenverdünnung“ die nachfolgende Immunfluoreszenzfärbung leichter zu bewerten war. Negativkontrollen und auf „*C. pneumoniae*-Einschlußkörperchen“ verdächtige Proben wurden nach jeder Passage in der DIF beurteilt. Generell wurde das gesamte Material einer Vertiefung einer 6-Loch-Gewebekulturplatte wiederum auf einen flächenmäßig gleich großen Zellmonolayer aufgebracht. Da aber bei allen klinischen Isolat nach den ersten 5 Passagen *post isolationem* nur maximal 3–5 Einschlußkörperchen/Gesichtsfeld (bei 600facher Vergrößerung) zu sehen waren, wurden diese Proben, eben aufgrund anfänglicher Wachstumsschwierigkeiten, auf kleineren HEp-2-Zellmonolayern (Fläche einer Vertiefung einer 12-Loch-Gewebekulturplatte) weiterpropagiert. Mit Zunahme der Passagenanzahl konnten die Stämme dann – nach Kontrolle in der DIF – immer stärker verdünnt werden. Zuletzt erfolgte eine Verdünnung im Verhältnis 1:48, wobei eine 100%ige Infektion des HEp-2-Zellmonolayers nach 72 Stunden (alle Zellen im Gesichtsfeld enthielten *C. pneumoniae*-typische Einschüsse) erzielt werden konnte. Aliquote der einzelnen Stämme wurden nach verschiedenen Passagen bei -80°C aufbewahrt, wobei in regelmäßigen Abständen Zellmonolayer mit den verschiedenen klinischen Isolat infiziert wurden, um sicherzustellen, daß diese nicht an Infektiosität verloren hatten.

Bestätigung der Isolate als *C. pneumoniae* mittels indirekter Immunfluoreszenz

Isolate, die in der DIF für Chlamydien typische Zelleinschlüsse zeigten, wurden mit Fluoreszein-Isothiocyanat-konjugierten, *C. pneumoniae*-spezifischen Maus-monoklonalen Antikörpern (FITC-AK) – wie vom Hersteller empfohlen – gefärbt (Chlamydia-Antigen TWAR-IFT, Cellabs, Sydney, Australien).

Bestätigung der Isolate als *C. pneumoniae* mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die isolierten Stämme wurden mittels zweier PCR-Reaktionen untersucht, die zwei verschiedene, jedoch jeweils für *C. pneumoniae* spezifische Genregionen amplifizieren: nämlich Teile des 16S-rRNA-Gens sowie des 3-Deoxy-Alpha-D-Mannose-Octulosäuretransferase (KDO-Transferase)-Gens [14, 15]. Gereinigte Elementarkörperchen der klinischen Chlamydienisolate dienten hierfür als Ausgangsmaterial. DNA-Extraktion und Fällung wurden nach einem Standardprotokoll [16] durchgeführt. In bezug auf die 16S-rRNA-PCR entsprachen Primersequenzen und die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes, ebenso wie die Parameter für Denaturierung, Annealing und Extension exakt der beschriebenen Methode [14].

Für die seminested KDO-Transferase PCR wurden folgende Bedingungen für eine 50 μl PCR-Reaktion gewählt: 200 μM von jeder Base (dATP, dGTP, dCTP und dTTP), 5 μl 10 $\times$ PCR-Puffer [10 mM Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl_2]; 0,5 μM Vorwärts-Primer KDO-O1; 0,5 μM Rückwärts-Primer KDO-O2; 1,3 U Taq-PCR Polymerase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) und 1 μl gereinigte Chlamydien-DNA. Je 1 μl der Amplicons wurden mit Ausnahme des Rückwärtsprimers, der durch 0,5 μM Primer KDO-I3 ersetzt wurde, ein zweites Mal unter den gleichen Bedingungen amplifiziert. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 94°C einmaliges Denaturieren für 5 min, gefolgt von 30 Zyklen jeweils Denaturieren bei $94^{\circ}\text{C}/1\text{ min}$ – Primer-Annealing bei 59°C (bzw. 64°C in seminested PCR)/1 min – Extension bei $72^{\circ}\text{C}/1\text{ min}$, anschließende Extension bei 72°C für 10 min. PCR Amplifikationsprodukte mit einer Größe von 304 bp im Falle der 16S-rRNA PCR sowie 439 bp im Falle der KDO-Transferase PCR im 1,5 % Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel, wurden als spezifisch für den Nachweis von *C. pneumoniae* betrachtet.

Serologie

Der Nachweis *C. pneumoniae* spezifischer AK der Klassen IgG, IgA und IgM erfolgte mittels Mikroimmunfluoreszenztest (Labsystems, Helsinki, Finnland) nach den Angaben des Herstellers.

Ergebnisse

In drei von 38 Fällen (7,9 %) konnte *C. pneumoniae* aus atherosklerotisch veränderten Gefäßen isoliert werden. Eine Bestätigung des Erregers als *C. pneumoniae* er-

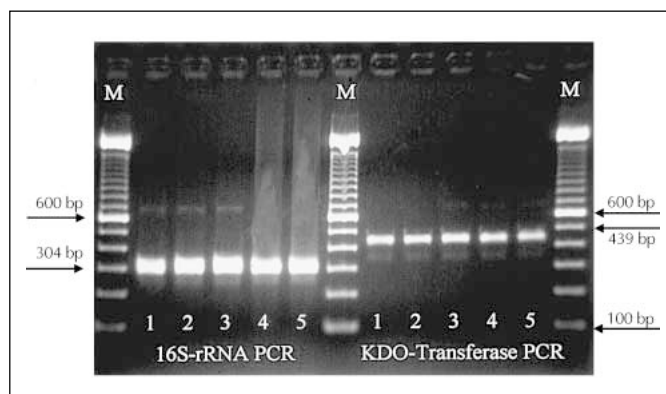


Abbildung 1: Amplifikationsprodukte der vaskulären *Chlamydia pneumoniae*-Isolate Wien I, II, und III (1, 2, 3) sowie von Typstämmen aus dem Respirationstrakt (4, 5). Die linke Bildhälfte zeigt das mittels 16S-rRNA Primern amplifizierte Genfragment (PCR Produkt = 304 bp), die rechte Bildhälfte die mittels KDO-Transferase-Primern erzielten Amplicons (PCR Produkt = 439 bp). M = 100 bp Molekulargewichtsmarker.

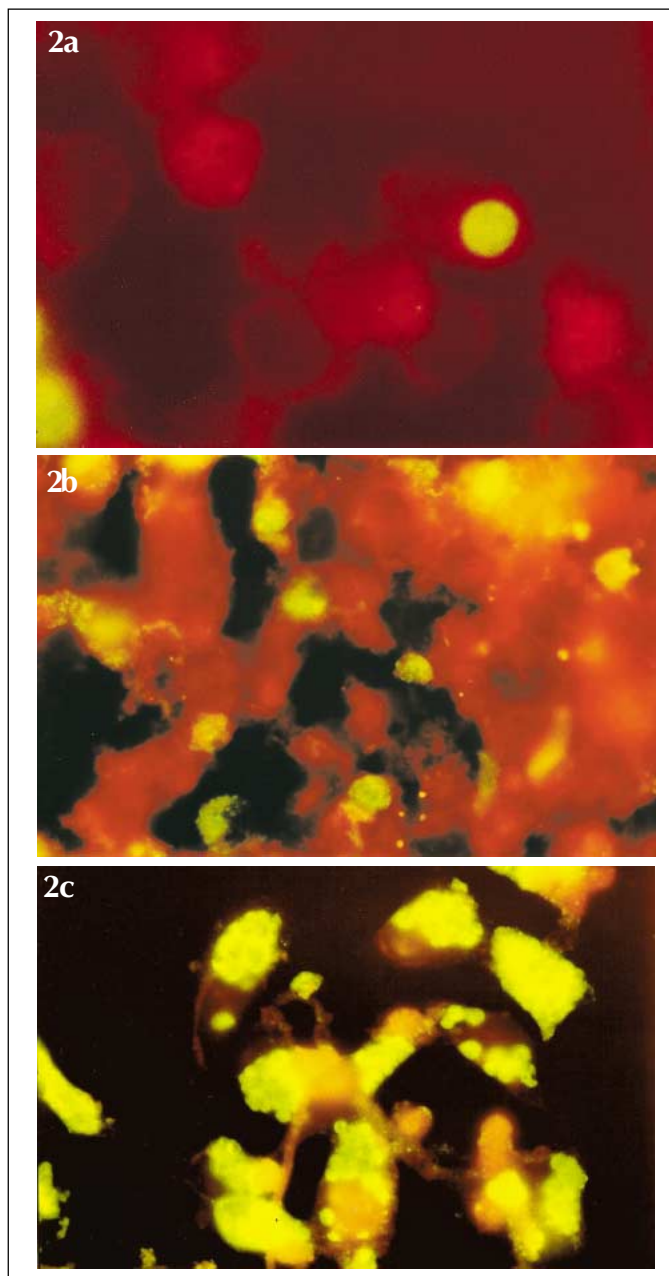


Abbildung 2: Karotisisolat WIEN I bei 600facher Vergrößerung in der direkten Immunfluoreszenzfärbung, erkennbar als apfelgrüngefärbte Einschlusskörperchen in rot gegengefärbten HEp-2-Zellen 72 h *post infectionem*. Abbildung 2a und 2b zeigen die 5. und 8. Passage, mit nur vereinzelt, teils noch von massiven Unspezifitäten überlagerten Einschlusskörperchen. Abbildung 2c zeigt den bereits an Laborbedingungen adaptierten Stamm mit multiplen intrazellulären und teilweise konfluenten Zelleinschlüssen (12. Passage).

Tabelle 1: Anamnestische und klinische Daten der drei Patienten, bei denen *Chlamydia pneumoniae* aus Gefäßmaterial angezüchtet werden konnte. Abkürzungen: m, männlich; a, Alter in Jahren; PRIND, prolongiertes, reversibles, ischämisches, neurologisches Defizit; OE, obere Extremität; re, rechts; mot, motorisch; ACI, Arteria carotis interna; Zig, Zigaretten; komb, kombiniert; MIF, Mikroimmunfluoreszenztest; IgG, IgA, *C. pneumoniae*-spezifische Antikörper der Klassen Immunglobulin G, A; PAVK, periphere arterielle Verschlusskrankheit; PTA, perkutane, transluminale Angioplastie; A. fem. comm. re, Arteria femoralis communis rechts; NIDDM, nicht insulinpflichtiger Diabetes mellitus.

Isolat	Patient	Klinische Diagnose	Morphologisches Korrelat	Etablierte Risikofaktoren für Atherosklerose	MIF-IgG-Titer	MIF-IgA-Titer
WIEN I	m (63 a)	PRIND mit passagerer Plegie OE re + Mot. Teilaphasie	80 %-ACI-Stenose links	Nikotinabusus (30–40 Zig./Tag) Komb. Hyperlipidämie	1:64	1:8
WIEN II	m (70 a)	PAVK II b Status post 2x erfolgloser PTA	Restenose A. fem. comm. re	Nikotinabusus (20 Zig./Tag, bis 1996), NIDDM Arterielle Hypertonie Hypercholesterinämie	1:128	≥ 1:64
WIEN III	m (73 a)	Zufallsbefund	Infrarenales Bauchaaorten-Aneurysma 4,6 cm Ø + Thrombus	NIDDM, Arterielle Hypertonie Komb. Hyperlipidämie	1:512	≥ 1:64

folgte mittels speziesspezifischer Immunfluoreszenz sowie PCR zweier unterschiedlicher, jeweils für *C. pneumoniae* spezifischer Genregionen (Abbildung 1).

In allen drei Fällen waren mehrere Subpassagen erforderlich, bevor *C. pneumoniae*-typische Einschlusskörperchen in der DIF erkennbar wurden. Die Stämme WIEN I und WIEN II wurden jeweils nach der fünften Passage, einer Gesamtbebrütungsdauer von 17 Tagen entsprechend, isoliert. Der Stamm WIEN III konnte erst nach der achten Passage (Gesamtbebrütungsdauer 21 Tage) isoliert werden. Die Abbildungen 2a–c zeigen das Isolat WIEN I zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach primärer Detektion in der DIF (jeweils nach 72 Stunden Bebrütungsdauer der entsprechenden Passage).

Alle drei Chlamydienisolate, die nun bereits ein Jahr auf HEp-2-Zellen unter Laborbedingungen kontinuierlich weitergezüchtet werden (trotz zwischenzeitlicher Lagerung bei –80 °C), haben nicht an Infektiosität verloren.

Alle drei Isolate stammen von männlichen Patienten (Durchschnittsalter 68,6 Jahre) mit unterschiedlichen Manifestationen an Atherosklerose. Bei zwei Patienten konnten erhöhte *C. pneumoniae*-spezifische AK der Klassen IgG und IgA, bei einem Patienten ausschließlich solche der Klasse IgG nachgewiesen werden. Tabelle 1 zeigt Antikörpertiter sowie anamnestisch und klinisch erhobene Patientendaten.

Tabelle 2 zeigt die Gefäßregionen, von denen die Stämme WIEN I, II und III isoliert werden konnten und faßt alle anderen bisher publizierten „Gefäßstämme“ zusammen.

Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß *C. pneumoniae* in replikationsfähiger Form in atheromatös veränderten, sonst jedoch sterilen Gefäßwänden vorkommt. Von 38 Gefäßen unterschiedlicher anatomischer Lokalisation konnte der Erreger in drei Fällen (7,9 %) erfolgreich angezüchtet und unter Laborbedingungen lebensfähig erhalten werden.

Die erfolgreiche Isolation von *C. pneumoniae* aus atherosklerotisch veränderten Gefäßen wurde bisher erst von drei Arbeitsgruppen berichtet, wobei die Isolate aus Koronararterien, der A. carotis sowie restenotisierten Bypassgefäßen stammten [10–12].

Wir konnten zwei unserer drei Stämme aus anderen als den bisher berichteten Gefäßregionen isolieren, nämlich der Arteria femoralis und einem infrarenalen Aortenaneurysma. Ob die Erreger tatsächlich aus Gefäßwandanteilen oder aus Teilen der angelagerten, und zum Teil bereits fest in der Gefäßwand organisierten Thromben, stammten, bleibt dahingestellt. *In vitro* ist die Infektion aller atherogenetisch relevanter Zelltypen, wie Endothelzellen, Fibroblasten, glatter Muskelzellen und Makrophagen ebenso möglich wie die Übertragung des Erregers von Makrophagen auf vaskuläre Endothelzellen [17–21]; eine Anzucht aus in Thromben enthaltenen Blutmonozyten wäre daher durchaus auch denkbar, ist aber unter *In-vivo*-Bedingungen bisher noch nicht gelungen.

Unsere mittels Zellkultur erhobene Nachweisrate ist mit 7,9 % mit der anderer Arbeitsgruppen vergleichbar und liegt somit weit unter den mittels molekularbiologischen Tests und hier vor allem mit der PCR und der Immunhistochemie erhobenen Positivitätsraten.

Trotz ständiger methodischer Verbesserungen bleibt es aufwendig und schwierig, das anspruchsvolle, ausschließlich intrazellulär sich vermehrende Bakterium *C. pneumoniae* anzuzüchten. In dieser Arbeit wurden immortalisierte Larynxkarzinomzellen (HEp-2-Zellen) verwendet, da in mehreren Publikationen gezeigt werden konnte, daß diese Zelllinie die höchste Ausbeute an Chlamydien bringt [13]. Darüber hinaus wurden HEp-2-Zellen in einem von der CDC und der IDSA (Infectious Diseases Society of America) im April 2000 organisierten Workshop, sowie den daraus resultierenden Empfehlungen, als erste Wahl zur Anzucht von *C. pneumoniae* vorgeschlagen.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen einer prospektiven Studie versucht, tatsächlich frisch entnommenes Gewebe zu kultivieren, um eventuell vorhandene Erreger nicht aufgrund einer zu langen Transportzeit oder ungünstigen Temperaturen – alles Faktoren die erheblichen Einfluß auf den Zellkulturerfolg haben [22] – zu verlieren. Sämtliche Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme im Operationssaal in einem speziellen Transportmedium ins Labor gebracht, wo ein Drittel der Proben sofort nach der Homogenisation auf frische Zellen aufgebracht werden konnte. Die verbleibenden Materialien wurden nach dem Homogenisieren maximal 3 Tage bei –80 °C gelagert, ein Vorgehen, bei dem – wie experimentell gezeigt werden konnte – das Absterben von *C. pneumoniae* auf ein Mindestmaß beschränkt wird [22]. Zwei unserer drei Stämme (WIEN II und WIEN III) stammten aus Proben, die zwischenzeitlich bei –80 °C gelagert waren. Im Vergleich zur sofort angelegten Zellkultur scheint dieses Vorgehen für die Isolierung des Erregers aus klinischem Material nicht nachteilig zu sein. Da die Operationspräparate homogenisiert wurden, erscheint eine innerhalb der Probe inhomogene Verteilung der Erreger auch wenig plausibel. Da die Ergebnisse der ersten Passagen aber aufgrund massiver Unspezifitäten schwierig zu beurteilen waren, könnten für Chlamydien typische Einschlußkörperchen oder gar nur winzige Elementarkörperchen übersehen worden sein.

Die Nachweisrate der Zellkultur ist – verglichen mit der PCR und der Immunhistochemie – jedenfalls deutlich niedriger. Dies könnte auf allgemein bekannte Probleme mit den genannten Methoden, wie Kontaminationen im Fall der PCR oder Unspezifitäten im Rahmen der Immunhistochemie, zurückzuführen sein. Gerade in bezug auf die PCR findet man in der Literatur stark schwankende Positivitätsraten (0–100 %).

Tabelle 2: Auflistung aller bis jetzt publizierten *Chlamydia pneumoniae*-Isolate vaskulären Ursprungs

Zeitpunkt der Isolation	Arbeitsgruppe	Gesamtanzahl Gefäße	Isolat	Anatomische Lokalisation
1996	Ramirez et al.	12	A-03	Koronararterie eines explantierten Herzens
1997	Jackson et al.	26	Unbenannt	Arteria carotis-Endarterektomiepräparat
1998	Maass et al.	70	CV 1–11 (CV 7–11*)	CV 6, 10, 11 Bypassgefäße CV1–5, 7–9 Koronarien-Endarterektomiepräparate
1999	Apfalter et al.	38	WIEN I WIEN II WIEN III	Arteria carotis-Endarterektomiepräparat Arteria femoralis communis, gesamtes OP-Präparat Infrarenales Aortenaneurysma, gesamtes OP-Präparat

*) Unter *In-vitro*-Bedingungen nicht lebensfähig

In einem kürzlich von uns organisierten, multizentrischen Ringversuch schwankten die von den Teilnehmern berichteten Positivitätsraten von 0 bis 60 %, obwohl identes Probenmaterial analysiert wurde! Darüber hinaus zeigte sich eine weitgehend fehlende Korrelation zwischen Nachweisrate und Sensitivität des jeweils angewandten PCR-Protokolls [23]. Eine Standardisierung der molekularbiologischen Tests ist daher dringend notwendig. Es ist aber auch festzuhalten, daß einige Arbeitsgruppen mittels PCR nur geringe Positivitätsraten, wie eben mit der Zellkultur erzielt, berichtet haben [6, 7].

Eine weitere mögliche Begründung für eine zu geringe, die tatsächliche Häufigkeit des Vorkommens unterschätzende, Isolierungsrate könnte darauf zurückzuführen sein, daß *C. pneumoniae* unter *In-vitro*-Bedingungen an Infektiosität verliert [12, 22]. Das soll auch der Grund dafür sein, daß weltweit so wenige Isolate kontinuierlich passagiert werden konnten. Diese Vermutung wird durch die von Maass et al. berichteten Ergebnisse unterstützt. Von insgesamt 11 in Lübeck isolierten vaskulären Stämmen überlebten nur 6 unter *In-vitro*-Bedingungen [12]. Im Gegensatz dazu haben wir die Erfahrung gemacht, daß sich unsere Stämme nach einer „Anpassungszeit“ von etwa drei Wochen kontinuierlich züchten ließen – und nach nunmehr bereits über einem Jahr unter Laborbedingungen gehalten – keinesfalls an Infektiosität verloren haben. Dennoch – eine weiteren Optimierung der Zellkulturmethodik unter anderem mit systematischer Evaluierung weiterer, möglicherweise dem natürlichen Zellsubstrat des Erregers besser entsprechenden Zelllinien – ist dringend erforderlich.

Obwohl selbst der Nachweis lebender Chlamydien in atheromatös veränderten, sonst aber sterilen Gefäßwänden keinen endgültigen, kausalen Zusammenhang zwischen der *C. pneumoniae*-Infektion und der Atherosklerose beweist, war er doch zumindest Voraussetzung zur Durchführung von Interventionsstudien und bietet jedenfalls die Möglichkeit, Antibiogramme zu erstellen. Obwohl erst wenige Isolate aus Gefäßen gezüchtet werden konnten, liegen bereits Daten erster Interventionsstudien vor [24–27]. Ob der derzeitige Wissensstand die Durchführung solcher Studien rechtfertigt, ist Gegenstand kontroversieller wissenschaftlicher Diskussionen; denn trotz sämtlicher bisher durchgeführter Untersuchungen bleibt die Frage offen, ob die *C. pneumoniae*-Infektion ursächlich an der Entstehung oder am Fortschreiten der Atherosklerose beteiligt ist („response to injury“-Hypothese) oder ob es erst zu einem späteren Stadium der Erkrankung zu einer sekundären „Besiedelung“ atherosklerotischer Läsionen („innocent bystander“-Theorie) durch den Erreger kommt.

Wir wollen in nun laufenden Studien mittels genetischer Analysen den Einfluß einer Infektion primärer, humaner, koronarer Endothelzellen durch unsere vaskulären

Isolate auf Transkriptionsebene untersuchen. Sollte sich herausstellen, daß zwischen infizierten und nichtinfizierten Koronarendothelzellen qualitative und/oder quantitative Unterschiede in der Expression von Genen, die im Rahmen der Entstehung der Atherosklerose von Bedeutung sind (z. B. Apoptoseinduktion, Bildung von Entzündungsmediatoren etc.), bestehen, wäre ein ursächlicher Zusammenhang zwischen *C. pneumoniae* und der Atherogenese sehr wahrscheinlich.

Ein funktionierendes Zellkultursystem sowie die Verfügbarkeit vaskulärer Isolate – wie eben in dieser Studie beschrieben – sind dafür unabdingbare Voraussetzungen.

Literatur:

1. Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). Clin Microbiol Rev 1995; 8: 451–61.
2. Grayston JT, Aldous MB, Easton A, et al. Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. J Infect Dis 1993; 168: 1231–5.
3. Hyman CL, Roblin PM, Gaydos CA, Quinn TC, Schachter J, Hammerschlag MR. Prevalence of asymptomatic nasopharyngeal carriage of *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults: assessment by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay and culture. Clin Infect Dis 1995; 20: 1174–8.
4. Hammerschlag MR, Chirgwin K, Roblin M, et al. Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. Clin Infect Dis 1992; 14: 178–82.
5. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, et al. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki heart study. Ann Intern Med 1992; 116: 273–8.
6. Weiss SM, Roblin PM, Gaydos CA, et al. Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in coronary atheromas of patients undergoing atherectomy. J Infect Dis 1996; 173: 957–62.
7. Jantos CA, Nessler A, Waas W, Baumgärtner W, Tillmanns H, Haberbusch W. Low prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in atherectomy specimens from patients with coronary heart disease. Clin Infect Dis 1999; 28: 988–92.
8. Blasi F, Denti F, Erba M, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques of aortic aneurysms. J Clin Microbiol 1996; 34: 2766–9.
9. Juvonen J, Juvonen T, Laurila A, et al. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in the walls of abdominal aortic aneurysms. J Vasc Surg 1997; 25: 499–505.
10. Jackson LA, Campbell LA, Kou CC, Rodriguez DI, Lee A, Grayston JT. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from a carotid endarterectomy specimen. J Infect Dis 1997; 176: 292–5.
11. Ramirez JA, for the *Chlamydia pneumoniae*/Atherosclerosis Study Group. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. Ann Intern Med 1996; 125: 979–82.
12. Maass M, Bartels C, Engel PM, Mamat U, Sievers HH. Endovascular presence of viable *Chlamydia pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease. J Am Coll Cardiol 1998; 31: 827–32.
13. Maass M, Harig U. Evaluation of culture conditions used for isolation of *Chlamydia pneumoniae*. Am J Clin Pathol 1995; 103: 141–8.
14. Nadrchal R, Makristathis A, Apfalter P, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in atheromatous tissues by polymerase chain reaction. Wien Klin Wochenschr 1999; 111: 153–6.
15. Balin BJ, Gerard HC, Arking EJ, et al. Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. Med Microbiol Immunol 1998; 187: 23–42.
16. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982.
17. Godzik KL, O'Brien ER, Wang SK, Kuo CC. In vitro susceptibility of human vascular wall cells to infection with *Chlamydia pneumoniae*. J Clin Microbiol 1995; 33: 2411–4.
18. Kaukoranta-Tolvanen SS, Laitinen K, Saikku P, Leinonen M. *Chlamydia pneumoniae* multiplies in human vascular endothelial cells in vitro. Microb Pathogen 1994; 16: 313–9.
19. Moazed TC, Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA. Evidence of systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* via macrophages in the mouse. J Infect Dis 1998; 177: 1322–5.
20. Quinn TC, Gaydos CA. In vitro infection and pathogenesis of *Chlamydia pneumoniae* in endothelial cells. Am Heart J 1999; 138: 507–11.
21. Airenne S, Sourcel HM, Alakärppä H, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection in human monocytes. Infect Immun 1999; 67: 1445–9.
22. Maass M, Dalhoff K. Transport and storage conditions for cultural recovery of *Chlamydia pneumoniae*. J Clin Microbiol 1995; 33: 1793–6.
23. Apfalter P, Blasi F, Boman J, et al. Multicenter comparison trial of DNA extraction methods and PCR assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* in endarterectomy specimens. J Clin Microbiol 2001; in Druck.
24. Gurfinkel E, Bozovich G, Daroca A, Beck E, Mautner B, for the ROXIS Study Group. Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: ROXIS pilot study. Lancet 1997; 350: 404–7.
25. Gupta S, Leatham EW, Carrington D, Mendall MA, Kaski JC, Camm AJ. Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. Circulation 1996; 96: 404–7.
26. Anderson JL, Muhlestein JB, Carlquist J, et al. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease and serological evidence for *Chlamydia pneumoniae* infection. Circulation 1999; 99: 1540–7.
27. Gurfinkel E, Bozovich G, Beck E, Testa E, Livellara B, Mautner B. Treatment with the antibiotic roxithromycin in patients with acute non-Q-wave coronary syndromes. The final report of the ROXIS Study. Eur Heart J 1999; 20: 121–7.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

☒ Medizintechnik-Produkte



Neues CRT-D Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

☒ Bestellung e-Journal-Abo

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

Impressum

Disclaimers & Copyright

Datenschutzerklärung