

Claudia Simone Bendl  
Dr. med.

## **Die Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von *Chlamydia pneumoniae* im Liquor bei Patienten mit Multipler Sklerose und anderen neurologischen Erkrankungen**

Geboren am 25.8.1975 in Wertheim  
Reifeprüfung am 28.6.1995 in Wertheim  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1995/96 bis WS 2001/02  
Physikum am 10.9.1997 an der Universität Marburg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg, Toronto (Kanada) und Langnau (Schweiz)  
Staatsexamen am 19.6.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Neurologie  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. A. Grau

Der Nachweis von *Chlamydia pneumoniae* im Liquor erfordert die Etablierung eines hochsensitiven Verfahrens, das genau auf den Erreger und das zellarme Untersuchungsmaterial abgestimmt ist.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden der DNA-Extraktion, PCR und Visualisierung des Amplifikats verglichen und so optimiert, daß bei größtmöglicher Sensitivität und Spezifität das Vorkommen *Chlamydia pneumoniae* im Liquor bei Patienten mit Multipler Sklerose und anderen neurologischen Erkrankungen gezeigt werden konnte.

Die Wahl eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens erwies sich als besonders wichtig für den Erfolg des Nachweises.

Liquorproben, die mit dem „QIAamp Blood DNA Mini Kit“ der Firma Qiagen aufgearbeitet wurden, zeigten bei allen 17 Patienten mit „gesicherter MS“ nach Poser und allen 27 Kontrollpersonen mit anderen neurologischen Erkrankungen ein negatives PCR-Ergebnis. Lediglich bei einem von 16 Patienten mit „möglicher oder wahrscheinlicher MS und MS-Varianten“ ließ sich *Chlamydia pneumoniae* nachweisen.

Einige dieser Proben wurden zusätzlich nach einem Standardverfahren mittels Phenol-Chloroform-Extraktion untersucht. Hier ließ sich bei sieben von zwölf Patienten mit „gesicherter MS“, einem von zehn Kontrollpatienten und zwei von drei Patienten mit „möglicher oder wahrscheinlicher MS und MS-Varianten“ *Chlamydia pneumoniae* nachweisen, ohne daß sich Hinweise auf Kontaminationen fanden. Wir halten daher die Ergebnisse der Aufarbeitung mit dem Qiagen-Kit für falsch negativ.

Eine nested PCR, die am MOMP-Gen bindet, wurde mit dem Ziel, die Sensitivität zu erhöhen, optimiert. Hierzu dienten Vergleiche mittels verschiedener Verdünnungsstufen von DNA-Positivkontrolle aus einer Kultur von *Chlamydia pneumoniae*.

Eine relativ niedrige Bindungstemperatur für das erste Primerpaar erwies sich als besonders günstig, denn die Sensitivität konnte erhöht werden, ohne daß nach der Reamplifikation unspezifische Produkte auftraten.

Der Nachweis der Amplifikate erfolgte auf einem Agarosegel.

Mit dieser nested PCR konnte gegenüber einer Direkt-PCR in Kombination mit einer Southern-Blot-Hybridisierung eine höhere Sensitivität erreicht werden.

Die Sensitivität der nested PCR ließ sich durch eine anschließende Southern-Blot-Hybridisierung nicht weiter erhöhen.

Mit der so optimierten Nachweismethode (Phenol-Chloroform-Extraktion, nested PCR und Agarosegelnachweis) wurden Liquorproben von insgesamt 19 Patienten mit „gesicherter MS“, fünf mit „möglicher oder wahrscheinlicher MS und MS-Varianten“ und 21 Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen untersucht. In der ersten Gruppe ließ sich bei zehn Proben *Chlamydia pneumoniae* nachweisen (52,6 %), in der zweiten bei zwei (40 %) und bei den Kontrollpatienten in fünf Liquorproben (23 %).

Im untersuchten Kollektiv war das Vorkommen von *Chlamydia pneumoniae* im Liquor zwar nicht spezifisch für MS-Patienten, die Prävalenz war bei Patienten mit „gesicherter MS“ jedoch höher als bei Kontrollpatienten ( $p\text{-exact}=0,047$ ; „Fisher's-Exact-Test“). Ob dieser Unterschied sich auch bei einem größeren Patientenkollektiv zeigt, wird derzeit im Rahmen einer umfangreicheren Studie in der Neurologischen Klinik der Universität Heidelberg überprüft.

Das Amplifikat einer PCR-positiven Patientenprobe wurde exemplarisch sequenziert, um die Spezifität der PCR zu überprüfen. Abgesehen von einer Punktmutation war es mit der publizierten Sequenz des Chlamydien-MOMP-Gens identisch.