

**Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Vergleich von zwei ELISA-Testen zum Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydia  
trachomatis**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.) für das Fachgebiet

Humanmedizin

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Susanna Bednarzik

geboren am 15.09.1988 in Nordhausen

Betreuer: PD Dr. med. Dipl. biol. Albrecht Oehme

Gutachter:

1. PD Dr. med. Dipl. biol. Albrecht Oehme
2. Prof. Dr. med. Hermann Behre
3. Prof. Dr. med. Andreas Essig, Ulm

04.06.2019

30.01.2020

## Referat

Der Chlamydia trachomatis-IgA- bzw. -IgG EIA der Firma ANI Labsystems Ltd. Oy, Vantaa, Finnland, Vertrieb in Deutschland: Sekisui Virotech GmbH, Rüsselsheim, Deutschland wurde im Vergleich zum Chlamydia trachomatis-IgA- bzw. -IgG-ELISA plus medac der Firma medac GmbH, Standort Wedel, Deutschland untersucht. Letzterer ist der ELISA-Test, der bisher im Labor für Virologie/Serologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zum Einsatz kommt. Ziel dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob der Test der Firma ANI Labsystems auch im klinischen Einsatz vergleichbar gute Ergebnisse erzielt und eine Alternative zum bisher verwendeten Test darstellt.

Im Zeitraum vom 19.05.2011 bis zum 11.07.2012 wurden 216 Blutproben in der Kinderwunschprechstunde von OÄ Dr. med. P. Kaltwaßer gesammelt. Die Möglichkeit zum Erhalt dieser Proben entstand durch eine Kooperation mit dem Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre.

Die aufgearbeiteten Serumproben wurden mit beiden Testen durch einen DSX™ 4-Platten ELISA-Vollautomaten auf das Vorhandensein von *C.-trachomatis*-IgA- und -IgG-Antikörper getestet und die Ergebnisse mittels statistischer Analyse durch IBM® SPSS® 20 für Windows ausgewertet. Wichen die Testergebnisse der beiden ELISA-Teste voneinander ab, wurde Einsicht in die Patientenakte genommen. Hierbei sollte untersucht werden, ob anhand der Krankengeschichte und der klinischen Befunde der Patientin eine Zuordnung zu einem Krankheitsstatus gelingt und nachfolgend, welcher Test in seinen Ergebnissen besser mit der Krankengeschichte übereinstimmt.

Der Test der Firma ANI Labsystems ist in der Chlamydiendiagnostik des Labors für Virologie/Serologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg keine Alternative zum Chlamydia IgA- bzw. -IgG-ELISA plus medac der Firma medac. Aus der retrospektiven Untersuchung und Auswertung von Patientenakten kann nicht auf den aktuell vorliegenden Infektionsstatus mit Chlamydia trachomatis geschlossen werden. Es liegt keine Tendenz zur besseren Übereinstimmung eines der beiden Teste mit dem aus der Krankenakte ersichtlichen Krankheitsstatus vor.

Bednarzik, Susanna: Vergleich von zwei ELISA-Testen zum Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydia trachomatis, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 80 Seiten, 2019

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Taxonomie der Chlamydien .....	2
1.1.1	Taxonomie der Serovare von <i>C. trachomatis</i> .....	3
1.2	Aufbau der Chlamydien.....	4
1.3	Entwicklungszyklus der Chlamydien .....	5
1.4	Persistenz von <i>C. trachomatis</i> .....	7
1.5	Erkrankungen durch <i>C. trachomatis</i> .....	8
1.5.1	Das Trachom.....	9
1.5.2	Erkrankungen durch die Serovare D–K .....	9
1.5.3	Lymphogranuloma venereum (LGV) .....	11
1.5.4	Besondere Patientengruppen .....	12
1.6	Diagnostik.....	13
1.6.1	Untersuchungsmaterial.....	14
1.6.2	Nachweisverfahren .....	14
1.6.3	Serologie.....	15
1.6.4	Mikroimmunfluoreszenztest (MIFT) .....	17
1.6.5	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	18
1.7	Therapie .....	20
1.7.1	Therapie der genitalen Chlamydieninfektion.....	20
1.7.2	Therapie von Trachom und Einschlusskonjunktivitis sowie Pneumonie bei Neugeborenen .....	21
2.	Fragestellung .....	22
3.	Material.....	23
3.1	Patientengut.....	23
3.2	Geräte, Laborausstattung und Verbrauchsmaterialien .....	23
3.3	Testkits und Kitinhalt.....	24

3.3.1	Testkitinhalt.....	24
3.3.2	Erklärung zu den Reagenzien .....	26
4.	Methoden.....	27
4.1	Arbeitsablauf .....	27
4.1.1	Chlamydia trachomatis-IgA bzw. -IgG-ELISA plus medac (Ctmedac) .....	27
4.1.2	Chlamydia trachomatis IgA- bzw. -IgG EIA, ANI Labsystems (CtANILab) .....	28
4.2	Berechnung und Interpretation der Ergebnisse.....	29
4.3	Statistische Analyse.....	30
4.3.1	Erklärung der angewandten statistischen Mittel.....	31
4.4	Klinische Befunde .....	33
5.	Ergebnisse .....	35
5.1.	Häufigkeit und Häufigkeitsverteilung.....	35
5.1.1	Ergebnisse des Ctmedac und des CtANILab.....	35
5.1.2	Gegenüberstellung in der Kontingenztafel .....	36
5.2	Beobachtete Übereinstimmung (observed agreement) und Cohens Kappa $\kappa$ .....	38
5.3	Streudiagramme und Korrelationskoeffizient.....	40
5.3.1	Korrelationskoeffizient.....	40
5.3.2	Streudiagramme.....	42
5.4	Bland-Altman-Diagramm.....	45
5.5	Analyse der Patientenakten .....	47
5.5.1	Betrachtung der IgG-Titer der 42 Patientenakten bezüglich der Übereinstimmung des Testergebnisses und des klinischen Befundes .....	48
5.5.2	Betrachtung der IgA-Titer der 42 Patientenakten bezüglich der Übereinstimmung des Testergebnisses und des klinischen Befundes .....	49
6.	Diskussion.....	51
6.1	Gegenüberstellung in der Kontingenztafel .....	51
6.2	Beobachtete Übereinstimmung (observed agreement) und Cohens Kappa $\kappa$ .....	51
6.3	Streudiagramme und Korrelationskoeffizient.....	52

6.4	Bland-Altman-Diagramm.....	53
6.5	Vergleich der eigenen mit den vom Hersteller angegeben Daten.....	54
6.6	Analyse der Patientenakten .....	55
6.6.1	Relevanz der Antikörperbestimmung bei Erkrankungen durch <i>C. trachomatis</i> für Screening und Infertilitätsdiagnostik .....	56
6.6.2	Kann durch Auswertung der Patientenakten der Krankheitsstatus bestimmt werden und stimmen die Ergebnisse des einen Testes besser mit den Patientenakten überein? .....	58
7.	Zusammenfassung und Ausblick .....	62
8.	Literaturverzeichnis.....	64
9.	Anlagen.....	71
10.	Thesen .....	79
11.	Votum der Ethik-Kommission .....	X
12.	Selbstständigkeitserklärung .....	XI
13.	Erklärung über frühere Promotionsversuche .....	XII
14.	Danksagung .....	XIII

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: vereinfachte Darstellung der Taxonomie der Chlamydien nach (Bush and Everett, 2001; Stephens et al., 2009) .....	2
Abbildung 2: Reproduktionszyklus der Chlamydien mit Persistenz nach (Schoborg, 2011) .....	6
Abbildung 3: Testprinzip Antikörper-ELISA, Beispiel <i>C. trachomatis</i> ELISA, nach (medac, 2008)19	
Abbildung 4: medac, Testkit.....	24
Abbildung 5: ANI Labsystems, Testkit .....	24
Abbildung 6: medac, Mikrotiterplatten IgA und IgG, ausgewertet .....	24
Abbildung 7: ANI Labsystems, Mikrotiterplatte mit Probenverdünnungspuffer.....	24
Abbildung 8: Gegenüberstellung des ersten und zweiten Testergebnisses für IgA, Ctmedac ...	43
Abbildung 9: Gegenüberstellung des ersten und zweiten Testergebnisses für IgG, Ctmedac ...	43
Abbildung 10: Gegenüberstellung des ersten und zweiten Testergebnisses für IgA, CtANILab	43
Abbildung 11: Gegenüberstellung des ersten und zweiten Testergebnisses für IgG, CtANILab	43
Abbildung 12: Gegenüberstellung Testergebnisse IgA, Ctmedac und CtANILab.....	44
Abbildung 13: Gegenüberstellung Testergebnisse IgG, Ctmedac und CtANILab.....	44
Abbildung 14: Bland-Altman-Diagramm, Ctmedac IgA.....	45
Abbildung 15: Bland-Altman-Diagramm, Ctmedac IgG .....	46
Abbildung 16: Bland-Altman-Diagramm, CtANILab IgA.....	46
Abbildung 17: Bland-Altman-Diagramm, CtANILab IgG.....	47
Abbildung 18: Einverständniserklärung .....	71

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erkrankungen durch <i>C. trachomatis</i> nach (Meyer, 2007; ECDC, 2009b).....	12
Tabelle 2: Komplikationen durch <i>C. trachomatis</i> , Serovar D–K nach (Meyer, 2007; ECDC, 2009b) .....	13
Tabelle 3: Indikationen für die Durchführung einer <i>C.-trachomatis</i> -Diagnostik bei sexuell aktiven Erwachsenen nach (ECDC, 2009b).....	13
Tabelle 4: Nachweisverfahren für <i>C. trachomatis</i> (Meyer, 2009).....	15
Tabelle 5: Serologische Methoden zur Chlamydien-Diagnostik nach (Meyer, 2009).....	15
Tabelle 6: Interpretation unterschiedlicher Ergebniskombinationen spezifischer Antikörper nach (medac, 2008).....	17
Tabelle 7: Antigene für die serologische <i>C.-trachomatis</i> -Diagnostik nach (Forsbach-Birk et al., 2010) .....	18
Tabelle 8: Testkits .....	24
Tabelle 9: Berechnung und Interpretation der Ergebnisse (medac, 2008).....	29
Tabelle 10: Berechnung und Interpretation der Ergebnisse (ANILabsystems, 2009).....	30
Tabelle 11: Berechnung von Cohens Kappa nach (Altman, 1991) .....	32
Tabelle 12: Kategorisierung und Interpretation von Cohens Kappa nach (Altman, 1991) .....	32
Tabelle 13: Häufigkeit der Ergebnisse Ctmedac.....	35
Tabelle 14: Häufigkeit der Ergebnisse CtANILab.....	35
Tabelle 15: Häufigkeitsverteilung, IgA .....	36
Tabelle 16: Häufigkeitsverteilung, IgG .....	37
Tabelle 17: Beobachtete Intra- und Inter-Test-Übereinstimmung und Cohens Kappa $\kappa$ .....	38
Tabelle 18: Rangkorrelation $r_s$ nach Spearman für IgA und IgG, Ctmedac.....	40
Tabelle 19: Rangkorrelation $r_s$ nach Spearman für IgA und IgG, CtANILab.....	41
Tabelle 20: Rangkorrelation $r_s$ nach Spearman, IgA, Ctmedac und CtANILab.....	41
Tabelle 21: Rangkorrelation $r_s$ nach Spearman, IgG Ctmedac und CtANILab .....	42
Tabelle 22: Gegenüberstellung der IgG-Testergebnisse der 42 betrachteten Patientinnen .....	48
Tabelle 23: Gegenüberstellung der IgA-Testergebnisse der 42 betrachteten Patientenakten .....	49
Tabelle 24: Gegenüberstellung erster und zweiter Testansatz Ctmedac IgA .....	72

Tabelle 25: Gegenüberstellung erster und zweiter Testansatz Ctmedac IgG .....	72
Tabelle 26: Gegenüberstellung erster und zweiter Testansatz CtANILab IgA .....	73
Tabelle 27: Gegenüberstellung erster und zweiter Testansatz CtANILab IgG .....	73
Tabelle 28: Gegenüberstellung Testergebnisse Ctmedac und CtANILab IgA.....	74
Tabelle 29: Gegenüberstellung Testergebnisse Ctmedac und CtANILab IgG .....	74
Tabelle 30: Reproduzierbarkeit, Chlamydia trachomatis-IgA-ELISA plus medac (medac, 2008)	75
Tabelle 31: Sensitivität und Spezifität, Chlamydia trachomatis-IgA-ELISA plus medac (medac, 2008) .....	75
Tabelle 32: Reproduzierbarkeit, Chlamydia trachomatis-IgG-ELISA plus medac (medac, 2008)	76
Tabelle 33: Sensitivität und Spezifität, Chlamydia trachomatis-IgG-ELISA plus medac (medac, 2008) .....	76
Tabelle 34: Reproduzierbarkeit innerhalb eines Testansatzes, IgA, ANI Labsystems (ANILabsystems, 2009).....	77
Tabelle 35: Reproduzierbarkeit in verschiedenen Testansätzen, IgA, ANI Labsystems (ANILabsystems, 2009).....	77
Tabelle 36: Reproduzierbarkeit innerhalb eines Testansatzes, IgG, ANI Labsystems (ANILabsystems, 2009).....	77
Tabelle 37: Reproduzierbarkeit in verschiedenen Testansätzen, IgG, ANI Labsystems (ANILabsystems, 2009).....	78
Tabelle 38: Die Prävalenz von <i>C.-trachomatis</i> -IgG- und -IgA-Antikörpern mittels Peptid-EIAs von ANI Labsystems und einem anderen kommerziellen Hersteller (Verkooyen et al., 2002).....	78

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

### Abkürzungen:

A. dest.	= Aqua destillata
Apc	= Mittelwert der Absorption der Positiv-Kontrolle
AR	= aberrant reticulate bodies = aberrant bodies = aberrante Körperchen
Arb	= Mittelwert der Absorption des Reagenzienleerwertes
As	= Mittelwert der Absorption der Probe
ATP	= Adenosintriphosphat
AU	= arbitrary units = beliebige Einheiten
AWMF	= Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V.
BSA	= bovine serum albumin = Rinderserumalbumin
CDC	= Centers for Disease Control and Prevention = Zentren für Krankheitskontrolle und Prävention
CO	= Cut-Off
chSP	= chlamydial heat shock protein = Hitzeschockprotein der Chlamydien
CPAF	= chlamydial protease-like activity factor = chlamydialer proteaseähnlicher Aktivitätsfaktor
DIF	= Direkte Immunfluoreszenz
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
DL+C	= diagnostische Laparoskopie mit Chromopertubation
ECDC	= European Centre for Disease Prevention and Control = Europäisches Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten
EIA	= Enzymimmunoassay
EK	= elementary bodies = Elementarkörper
ELISA	= Enzyme Linked Immuno Essay
Fab	= antigenbindendes Fragment des Antikörpers

Fc	= crystallisable fragment = konstante Region eines Antikörpers
FKS	= fetales Kälberserum
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	= Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	= Schwefelsäure
HP17	= hypothetical protein 17 = hypothetisches Protein 17
HRP	= horse radish peroxidase = Meerrettich-Peroxidase
HSP	= Hitzeschockprotein
Ig	= Immunglobuline
kbp	= Kilo Basenpaare
KBR	= Komplementbindungsreaktion
LGV	= Lymphogranuloma venereum
LPS	= Lipopolysaccharid
MIFT	= Mikroimmunfluoreszenztest
ml	= Milliliter
MOMP	= major outer membrane protein = Hauptprotein der äußeren Membran
NAT	= Nukleinsäure amplifizierender Test
NBCS	= new born calf serum = fetales Kälberserum
OD	= Optische Dichte
OmcA	= small cysteine-rich outer membrane complex protein A = kleiner cysteinreicher Außenmembranproteinkomplex A, wird durch das Gen omp-3 codiert
OmcB	= large cysteine-rich outer membrane complex B protein = großer cysteinreicher Außenmembranproteinkomplex B, entspricht Omp-2
omp-1	= Gen, welches das Hauptmembranprotein MOMP codiert
omp-2	= Gen, welches Omp-2 bzw. OmcB codiert
Omp-2	= outer membrane protein 2, entspricht OmcB
omp-3	= Gen, welches OmcA codiert

$P_0$	= gemessener Übereinstimmungswert der beiden Schätzer
PBS	= phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	= polymerase-chain-reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PCO	= polyzystisches Ovar
$p_e$	= zufällig erwartete Übereinstimmungsrate
PID	= pelvic inflammatory disease = Entzündung des kleinen Beckens
PmpD	= polymorphic membrane protein D = polymorphes Membranprotein D
p. o.	= per os
RK	= reticulate bodies = Retikularkörper
RKI	= Robert-Koch-Institut
RNA	= Ribonukleinsäure
RpsA	= ribosomal protein S1 = ribosomales Protein S1
$r_s$	= Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
SARA	= sexually acquired reactive arthritis= sexuell erworbene reaktive Arthritis
S bzw. SD	= Standardabweichung
STD	= sexually transmitted disease = sexuell übertragbare Krankheit
TARP	= translocated actin-recruiting protein = transloziertes Actin rekrutierendes Protein
TMB	= 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TSAP	= thiol-specific antioxidant peroxidase = thiol-spezifische antioxidative Peroxidase
WHO	= World Health Organization = Weltgesundheitsorganisation
ZRA	= Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie am Universitätsklinikum Halle (Saale)

**Symbole:**

$\kappa$  = Cohens Kappa

## 1. Einleitung

Mit einer jährlichen Inzidenz von 100 Millionen zählt *Chlamydia trachomatis* zu den am häufigsten sexuell übertragenen Erregern weltweit (WHO, 2012). Laut der STD-Sentinelenerhebung des Robert-Koch-Instituts ist dies auch in Deutschland der Fall (RKI, 2010a). Die Neuinfektionsrate wird in Deutschland mit 300.000 pro Jahr beziffert (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2007). Da seit Inkrafttreten des Infektionsschutzgesetzes von 2001 lediglich in Sachsen eine Meldepflicht besteht, handelt es sich hierbei jedoch um eine Schätzung (Gille et al., 2005; RKI, 2010a).

Die genitale Chlamydieninfektion ist vor allem eine Erkrankung sexuell aktiver, junger Erwachsener. Das Risiko zu erkranken steigt mit der Zahl der wechselnden Geschlechtspartner (ECDC, 2009a) und sinkt mit steigendem Alter und dem Eintritt in eine feste partnerschaftliche Verbindung (RKI, 2010a). Im europäischen Kontext finden sich die höchsten Infektionsraten in der Gruppe der weiblichen 15- bis 24-Jährigen mit einem Maximum vor dem 20. Lebensjahr (ECDC, 2009a). Repräsentative Daten für Deutschland liegen dazu nicht vor. Allerdings ergaben sich in kleineren Studien vergleichbare Zahlen, welche die Autoren einer Untersuchung dazu veranlassten, von einer „heimlichen Epidemie“ unter den Jugendlichen und jungen Erwachsenen in Deutschland zu sprechen (Gille et al., 2005; RKI, 2010b).

*C. trachomatis* gilt als Hauptverursacher der infektionsbedingten Sterilität (Gille et al., 2005). Bei Frauen bleiben bis zu 80 % der chlamydienbedingten Genitalinfektionen asymptomatisch, bei Männern sind es bis zu 50 % (RKI, 2010a). Dies führt zu einer fortwährenden Übertragung der Bakterien, zum anderen zu einer verspäteten oder gar ausbleibenden Diagnose und damit Therapiemöglichkeit (ECDC, 2009a). Unerkannte, chronische oder unzureichend behandelte Infektionen können Ursache schwerer Folgeerkrankungen sein (RKI, 2010b). Eine gefürchtete Folge einer unbehandelten Chlamydieninfektion bei der Frau ist die Entzündung des kleinen Beckens (pelvic inflammatory disease = PID) (Rowley et al., 2012). Das Spektrum der Erkrankung reicht dabei von asymptomatischen, subklinischen bis hin zu schweren Verlaufsformen. Folge des ablaufenden Entzündungsprozesses sind Verklebungen und die Bildung von narbigen Strikturen, die wiederum zu chronischen Bauchschmerzen, extrauterinen Schwangerschaften und tubarer Infertilität führen können (Crossman, 2006). Auf Grund der hohen Rate asymptomatischer Verläufe wird die Infektion jedoch oft erst nach mehreren Jahren bemerkt, wenn der Kinderwunsch in den Vordergrund tritt (Gille et al., 2005). In Deutschland führt die genitale Chlamydieninfektion bei jeder vierten bis fünften betroffenen

Frau zur Sterilität. Dies entspricht ungefähr 100.000 Frauen im gebärfähigen Alter, die so unfreiwillig kinderlos bleiben (Keck and Clad, 2004).

Eine Impfung gegen *C. trachomatis* ist nicht erhältlich (ECDC, 2009a). Deshalb gilt es, eine frühzeitige Behandlung der Infektion zu gewährleisten, um schwerwiegenden Folgen vorzubeugen, sowie die Weiterverbreitung des Erregers zu unterbinden. Am 01.01.2008 trat ein Beschluss des gemeinsamen Bundesausschusses in Kraft, nach dem allen Frauen bis zum abgeschlossenen 25. Lebensjahr ein jährlicher Chlamydientest angeboten wird (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2007). Die Evaluation dieses Programms zeigte bisher jedoch eine unvollständige Umsetzung dieser Screeningmethode (Dudareva-Vizule et al., 2013.).

Allgemein problematisch ist, dass die Infektion mit Chlamydien in Deutschland eine eher unbekannte Erkrankung ist im Hinblick auf die Unwissenheit der Bevölkerung über deren Existenz, die Symptomarmut der Betroffenen und ein Defizit an epidemiologischen Daten. Im Vergleich zu anderen Nationen, welche durch breit angelegte Aufklärungskampagnen (Niederlande), Meldepflicht (Schweden) und Screeningprogramme (USA) Fortschritte in der Bekämpfung der genitalen Chlamydieninfektion aufweisen, bestehen in Deutschland deutliche Ausbaupotenziale in der Aufklärungsarbeit, Sozialmedizin und Forschung (Gille et al., 2005).

## 1.1 Taxonomie der Chlamydien

Ordnung	Familie	Gattung	Spezies	typischer Wirt
<i>Chlamydiales</i>	<i>Chlamydiaceae</i>	<i>Chlamydia</i>	<i>C. abortus</i>	Säugetier
			<i>C. psittaci</i>	Vögel
			<i>C. felis</i>	Katzen
			<i>C. caviae</i>	Meerschweinchen
			<i>C. pecorum</i>	Säugetier
			<i>C. pneumoniae</i>	Mensch
			<i>C. trachomatis</i>	Mensch
			<i>C. suis</i>	Schwein
			<i>C. muridarum</i>	Maus, Hamster
			<i>Parachlamydiaceae</i>	
	<i>Waddliaceae</i>		<i>W. chondrophila</i>	
	<i>Simkaniaceae</i>		<i>S. negevensis</i>	

Abbildung 1: vereinfachte Darstellung der Taxonomie der Chlamydien nach (Bush and Everett, 2001; Stephens et al., 2009)

Mit zunehmendem Wissen über biologische und molekulare Daten, Morphologie und Entwicklung hat sich der taxonomische Status der Chlamydien verändert (Kaleta and Taday, 2003). Ursprünglich wurden verschiedene Eigenschaften der Chlamydienspezies zur Differenzierung herangezogen: das verursachte Krankheitsbild, das Wirtsspektrum, die Antigenstruktur der Zellwand und der Glykogengehalt der Einschlusskörper (Moulder, 1988). Da die Einschlusskörper von *C. trachomatis* glykogenhaltig sind, lassen sie sich im Gegensatz zu anderen Spezies, die kein Glykogen enthalten, mit Iod anfärben. Weiterhin weist *C. trachomatis* eine gute Empfindlichkeit gegenüber Sulfonamiden auf, während andere Spezies in der Regel resistent sind (Everett et al., 1999).

Die aktuelle Einteilung der Chlamydien sieht eine Unterteilung der Ordnung der *Chlamydiales* in 4 Familien vor: *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae*. Zu der Familie der *Chlamydiaceae* gehört die Gattung *Chlamydia* (Bush and Everett, 2001). Von Everett et al. wurde die Einführung einer weiteren Gattung, *Chlamydophila*, vorgeschlagen (Everett et al., 1999). Auf Grund des Mangels an widerspruchsfreien biologischen Markern wurde diese Unterteilung jedoch nicht allgemein anerkannt (Stephens et al., 2009). Zu der Gattung *Chlamydia* wiederum gehören die Arten, *C. abortus*, *C. psittaci*, *C. felis*, *C. caviae*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. suis* und *C. muridarum* (Stephens et al., 2009).

### **1.1.1 Taxonomie der Serovare von *C. trachomatis***

Das Vorkommen verschiedener Genvarianten (Allele) an einem Genort (Locus) wird als Genpolymorphismus bezeichnet (Madigan and Martinko, 2006). Unter dem Genotyp eines Organismus versteht man die exakte, individuelle genetische Ausstattung inklusive eventuell vorhandener extrachromosomaler DNA (Madigan and Martinko, 2006; Gjuvsland et al., 2013). Dieses individuelle Erbbild eines Organismus legt die Grundlage für sein sichtbares Erscheinungsbild (Phänotyp) (Orgogozo et al., 2015). Wie unterschiedlich die Ausprägung bestimmter Merkmale innerhalb einer Spezies sein kann, zeigt die Vielfalt der Serovare von *C. trachomatis*. Serotypen, auch Serovare genannt, sind Varianten bzw. Untergruppen von Mikroorganismen innerhalb einer Spezies bzw. Subspezies, unterteilt anhand verschiedener Oberflächenantigene (Baron, 1996; Farlex Partner Medical Dictionary, 2012). Die Serotypisierung kann durch serologische Tests durchgeführt werden. Die Unterteilung in Serovare ist z. B. aus epidemiologischer Sicht und zur Klassifizierung medizinisch bedeutsamer Erreger von Interesse (Baron, 1996).

Die verschiedenen Stämme der Spezies *C. trachomatis* sind in 21 Serovare aufgeteilt:

- Das Trachom verursachend: A, B, Ba, C
- Urogenitale Infektionen verursachend: D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J, Ja, K
- Lymphogranuloma venereum verursachend: L1, L2, L2a, L2b, L3

(Wang and Grayston, 1991; Morré et al., 1998; Dean et al., 2000; Schaeffer and Henrich, 2008)

Traditionell wurde die Typisierung durch immunologische Detektion des major outer membrane protein (MOMP) kodierenden Gens *omp-1* durchgeführt. Die phylogenetisch konservierte Region des *omp-1* diente dabei zur speziesspezifischen Detektion von *C. trachomatis*. Die 4 variablen Regionen (VR1-VR4) des *omp-1* Gens wurden weiterführend zur Sero- und Genotypisierung herangezogen (Schaeffer and Henrich 2008). Es wurden viele Versuche unternommen, die phylogenetische Verwandtschaft unter den *C.-trachomatis*-Stämmen festzustellen. Verschiedene neuere Ansätze beruhen auf Analysen von *omp-1*- und 16S rRNA- bzw. 23S-rRNA-Sequenzen, Multilokus-Sequenz-Typisierung und Sequenzierung des gesamten Genoms. Dennoch konnte noch kein Konsens über die evolutionäre Zusammengehörigkeit der verschiedenen *C.-trachomatis*-Stämme erzielt werden (Harris et al., 2012).

## 1.2 Aufbau der Chlamydien

Der Begriff „Chlamydien“ leitet sich von *chlamys* (gr. für „Mantel“) ab (Klos, 2009). Chlamydien sind unbewegliche, gramnegative Bakterien, die sich obligat intrazellulär vermehren. Sie treten in 3 unterschiedlichen Erscheinungsformen auf: als Elementar- und Retikularkörperchen sowie als Intermediärkörperchen, welches eine Zwischenstufe darstellt. Diese 3 bilden zusammen den Inhalt des Einschlusskörpers, der durch eine dünne, fragile Vakuolen-Membran gebildet wird und sich innerhalb der Wirtszelle befindet (Ward, 1988; Moulder, 1991; Kaleta and Taday, 2003, Klos, 2009).

Chlamydien enthalten sowohl DNA als auch RNA, Ribosomen, eine zytoplasmatische Membran und eine Zellwand. Es fehlt Ihnen jedoch die für gramnegative und grampositive Bakterien typische Peptidoglykanschicht (Moulder, 1991; Klos, 2009,). Ein kryptisches Plasmid von 7,5 kbp konnte in den Serovaren von *C. trachomatis* festgestellt werden (Pickett et al., 2005). Alle Chlamydien der Familie der *Chlamydiaceae* enthalten eingebettet in der Außenmembran ein gattungsspezifisches hitzestabiles Lipopolysaccharid (LPS-Antigen). Der Außenmembrankomplex besteht größtenteils aus MOMP sowie den beiden cysteinreichen Proteinen small outer membrane complex protein A (OmcA) und large outer membrane

complex protein B (OmcB) (Nüchter, 2004; Findlay et al., 2005; Forsbach-Birk et al., 2010). Mit 60 % bildet MOMP den Hauptteil der Außenmembran (Caldwell and Schachter, 1982). Die Proteine sind untereinander durch Disulfidbrücken verbunden und tragen so zur Form und Stabilität der Elementarkörperchen bei (Newhall and Jones, 1983). Weiterhin trägt das MOMP gattungs-, spezies- und serovarspezifische Epitope (Caldwell and Schachter, 1982) und stellt somit ein immunologisch wichtiges Protein dar (Everett et al., 1999).

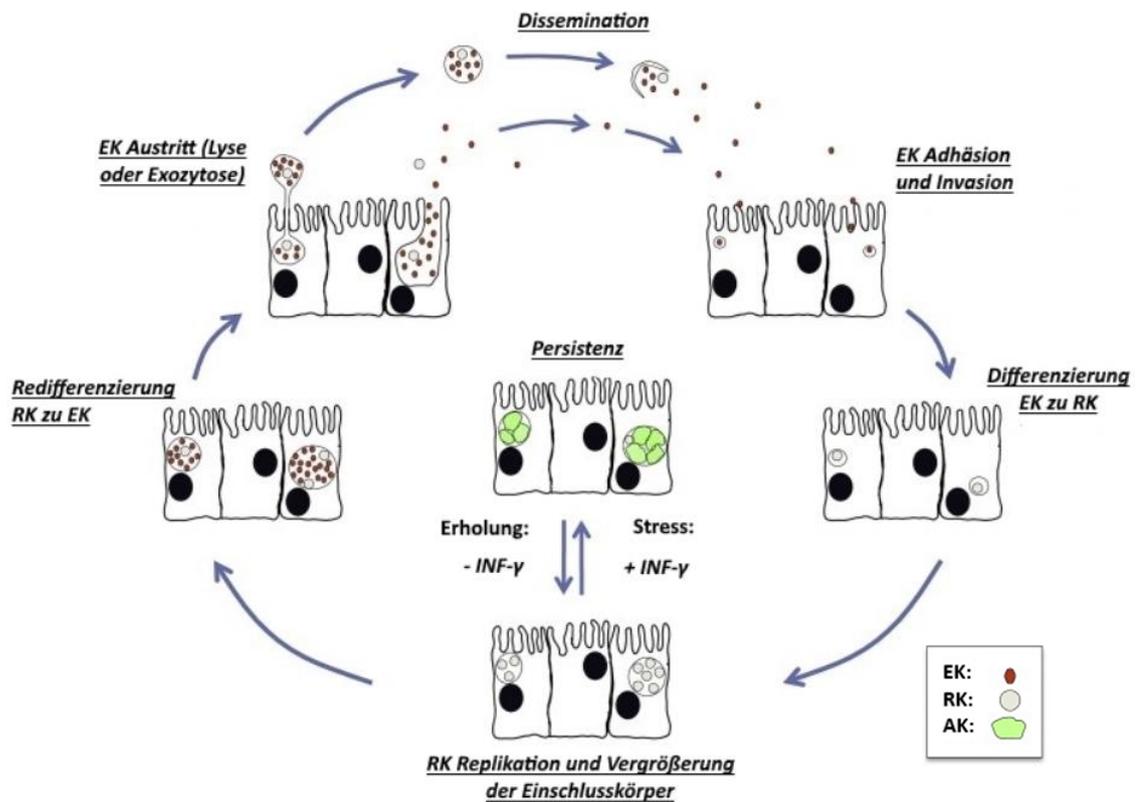
### 1.3 Entwicklungszyklus der Chlamydien

Chlamydien sind in ihrem Vermehrungszyklus auf eine Wirtszelle angewiesen (Bush and Everett, 2001). Auf künstlichen Nährböden gelingt die Anzucht folglich nicht (Klos, 2009). Im Sequenzvergleich des Genoms konnten Gene für die Synthese von ATP und Peptidoglycan identifiziert werden (Madigan and Martinko, 2006). Chlamydien sind jedoch nicht in der Lage, energiereiche Verbindungen und Nukleotide zu synthetisieren. Daher sind Chlamydien auf die parasitäre Nutzung der Ressourcen einer eukaryoten Zelle angewiesen (Klos, 2009; Madigan and Martinko, 2006). Extrakorporale Entwicklungsschritte sind bisher nicht bekannt (Kaleta and Taday, 2003).

Während des Vermehrungszyklus treten die Chlamydien in 2 Erscheinungsformen auf (Moulder, 1991).

- 1.) *Die Elementarkörperchen (EK) (0,25–0,3 µm Durchmesser):* Sie entsprechen der infektiösen Form der Chlamydien, dienen also der Ausbreitung des Erregers. Elementarkörper sind selbst nicht vermehrungsfähig, da metabolisch inaktiv. Sie sind klein, dicht gepackt und durch eine starre dreischichtige Zellwand widerstandsfähig gegen Austrocknung.
- 2.) *Die Retikularkörperchen (RK) (1 µm Durchmesser):* Retikularkörperchen sind selbst nicht infektiös, sondern entsprechen der vegetativen Form des Krankheitserregers und vermehren sich in der Wirtszelle durch Binärsplaltung. Sie haben im Vergleich zum EK eine zerbrechliche, flexible Zellwand und der Inhalt ist weniger dicht gepackt.

(Moulder, 1991; Madigan and Martinko, 2006; Klos, 2009)



**Abbildung 2: Reproduktionszyklus der Chlamydien mit Persistenz nach (Schoborg, 2011)**

AK = „Aberrant Bodies“; EK = Elementarkörperchen; RK = Retikularkörperchen

Der Vermehrungszyklus von *C. trachomatis* nimmt ungefähr 48 Stunden in Anspruch (Moulder, 1991) und lässt sich in folgende Schritte unterteilen (vgl. Abbildung 2).

- 1.) Anheftung des Elementarkörperchens an die Wirtszelle
- 2.) Phagozytose des Elementarkörperchens und Bildung eines Einschlusskörpers
- 3.) Umwandlung in ein Retikularkörperchen
- 4.) Vermehrung der Retikularkörperchen durch intrazelluläre Teilung und Wachstum
- 5.) Umwandlung der Retikularkörperchen zu Elementarkörperchen
- 6.) Freisetzung und Dissemination der Elementarkörperchen

(Madigan and Martinko, 2006)

Bei der Anheftung der Chlamydien an die Zielzelle fungiert das Hauptmembranprotein MOMP als Adhäsion, welches über Bildung unspezifischer, d. h. elektrostatischer und hydrophober Interaktionen die Bindung an die Zielzelle ermöglicht (Su et al., 1990). Eine andere Möglichkeit der Aufnahme in die Zelle ist die clathrinvermittelte Endozytose. Weitere Mechanismen der

Anheftung und Zellenpenetration sind noch nicht vollständig beschrieben (Hybiske and Stephens, 2007).

Nach Anheftung an die Zielzelle erfolgt die Phagozytose des EK durch die Zelle. Dabei verschmelzen intakte Vakuolen nach der Endozytose nicht mit den lysosomalen Kompartimenten der Zelle, sondern bilden eine Nische für die ungestörte Replikation der Chlamydien, Einschlusskörper genannt. Dies stellt einen wichtigen Faktor zur Vermeidung der Wirtszellenabwehr dar (Friis, 1972; Schoborg, 2011). Der weitere Entwicklungszyklus findet im Einschlusskörper in nächster Nähe zum Zellkern, dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat der Wirtszelle statt. Die zur Entwicklung benötigten Metaboliten können so direkt aus der Wirtszelle bezogen werden (Schoborg, 2011).

Drei Stunden nach der Infektion beginnen sich die ersten EK in RK umzuwandeln (Ward, 1988). Dies geschieht durch die chemische Reduktion der Disulfidbrücken zwischen den Proteinkomplexen der Außenmembran (Everett et al., 1999). Nach ungefähr 12 Stunden beginnt die Vermehrung der RK durch binäre Spaltung. Dabei durchlaufen die RK 8 bis 12 Zellteilungszyklen (Schoborg, 2011). In dieser Phase der hohen metabolischen Aktivität sind die Chlamydien gegenüber äußeren Einflüssen wie Stoffwechsel- oder Zellwandinhibitoren sehr empfindlich (Schachter and Stephens, 1984).

Einige RK beginnen sich nach 18 bis 22 Stunden wieder in EK umzuwandeln. In diesem Stadium der Kondensation werden die Vermehrungsformen der Chlamydien auch als Intermediärkörperchen, welche eine Größe von ungefähr 0,5  $\mu\text{m}$  haben, bezeichnet. Sie stellen quasi eine Zwischenstufe zwischen EK und RK dar. Nach 48 Stunden sind die Einschlusskörper dicht gepackt mit kleinen EK und etwas größeren, zugrunde gehenden Resten von RK, aus denen sie hervorgegangen sind. Die Einschlusskörper sind nun zum Teil so groß, dass sie das ganze Zellvolumen einnehmen und so andere Strukturen der Wirtszelle verdrängen, sodass selbst der Zellkern eingedellt erscheinen kann. Ist der Entwicklungszyklus nach 48 Stunden abgeschlossen, rupturiert die befallene Wirtszelle und setzt die enthaltenen Chlamydienzellen frei. Die EK können nun eine neue Zelle infizieren, während die verbleibenden RK zugrunde gehen (Ward, 1988; Klos, 2009).

#### **1.4 Persistenz von *C. trachomatis***

Der Verlauf und die Folgen einer infektiösen Erkrankung werden durch die Virulenz des Erregers, Umweltfaktoren und den Status des Immunsystems des Infizierten bestimmt. Bei einigen Frauen heilt die Infektion ohne Gewebeschäden aus, während sich bei anderen eine chronisch aktive Infektion entwickelt oder *C. trachomatis* in den Zustand der Persistenz

übergeht. Beides stellt einen Risikofaktor für Schäden der Adnexe mit konsekutiver tubarer Infertilität dar (den Hartog et al., 2006).

Unter Einwirkung von Stressfaktoren können Chlamydien, die sich im Reproduktionszyklus befinden, persistieren. Dabei setzen sie sich vom normalen Entwicklungszyklus ab und gehen in einen nicht infektiösen, jedoch lebensfähigen Zustand über. Dieser Zustand der Persistenz ist abzugrenzen von der chronisch aktiven Infektion eines Wirts mit Chlamydien. Der Metabolismus, die Teilung der RK und die Umwandlung zu EK werden zum Erliegen gebracht. Die Bildung sogenannter „Aberrant Bodies“ wird angeregt. Die „Aberrant Bodies“ sind im Vergleich zu den RK größer, irregulär geformt und weniger dicht gepackt. Chlamydien können so ungünstige Bedingungen der Wirtszelle über Wochen und Monate überleben und eine Infektion der Zelle über diesen Zeitraum aufrecht erhalten (Schoborg, 2011).

In vitro kann eine Persistenz durch eine Behandlung mit INF- $\gamma$  oder einem künstlich erzeugten Mangel an Glucose, Eisen oder essentiellen Aminosäuren wie Tryptophan erzeugt werden. Weiterhin begünstigt eine Koinfektion der Zelle mit Humanem Herpes-Simplex-Virus die Bildung persistenter Chlamydien. Wird der Stressor entfernt, kehren die Chlamydien in den normalen Reproduktionszyklus zurück (Hogan et al., 2004; Schoborg, 2011). Die Beobachtungen der In-vitro-Versuche geben Anlass, auch auf In-vivo-Zusammenhänge persistenter Chlamydieninfektionen zu schließen. In-vitro-Versuche mit Antibiotika, z. B.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, liefern Hinweise, dass eine inadäquate Antibiotikatherapie auch zur Persistenz in vivo führen kann (Hogan et al., 2004).

Die Persistenz repräsentiert einen Mechanismus der Chlamydien, den sie als Reaktion auf ungünstige Bedingungen entwickelt haben und der ihnen zumindest zum Teil ermöglicht, unter diesen schwierigen Bedingungen ihr Überleben zu sichern (Hogan et al., 2004).

## **1.5 Erkrankungen durch *C. trachomatis***

Je nach Serotyp löst *C. trachomatis* unterschiedliche Erkrankungen aus (vgl. Tabellen 1 und 2).

- 1.) Die Serotypen A–C verursachen das Trachom. Dies ist eine chronisch rezidivierende Erkrankung der Horn- und Bindehaut des Auges, die vorwiegend in den Tropen auftritt (RKI, 2010a).
- 2.) Die Serotypen D–K verursachen urogenitale Infektionen, die sexuell übertragen werden. Gelegentlich werden auch eine Einschlusskonjunktivitis am Auge und nach perinataler Übertragung Infektionen bei Neugeborenen ausgelöst (Hof, 2014).

- 3.) Die Serotypen L1–L3 verursachen das Lymphogranuloma venereum. Diese sexuell übertragbare Infektion tritt vor allem in den Tropen auf (RKI, 2010a).

### **1.5.1 Das Trachom**

Das Trachom tritt endemisch in 53 Ländern auf. Betroffen sind tropisch warme Regionen wie weite Teile Afrikas, das südliche Asien (z. B. China und Indien) und Brasilien. Vor allem unter schlechten hygienischen Bedingungen wird die Erkrankung per Schmierinfektion, d. h. direkt über das infektiöse Sekret oder über Gegenstände des täglichen Gebrauchs übertragen. Kinder sind durch den engen Körperkontakt zu nahestehenden Personen besonders empfänglich für die Übertragung der Erreger (WHO, 2012). Auch Fliegen spielen in der Übertragung eine wichtige Rolle (RKI, 2010a). Die Infektion kann folgenlos abheilen, hinterlässt jedoch keine Immunität, sodass eine Reinfektion möglich ist und unter genannten Bedingungen häufig stattfindet. Nach einer Inkubationszeit von 1 bis 2 Wochen erscheint das Trachom als chronische folliculäre Keratokonjunktivitis mit Hyperämie des Auges, vermehrtem Tränenfluss und eitrigem Ausfluss (Klos, 2009; Hof, 2014). Dessen Folge kann vor allem durch häufige Reinfektionen eine narbige Schrumpfung der Bindehaut und Augenlider und konsekutiv ein schmerzhaftes Entropium sein. Der ständige Reiz der Wimpern führt zu andauernden Verletzungen und Infektionen der Kornea, die letztendlich dadurch eintrübt. Der Betroffene erblindet (RKI, 2010a; AWMF, 2016). Weltweit leiden schätzungsweise 2,2 Millionen Menschen unter einer Sehbehinderung durch das Trachom, 1,2 Millionen davon sind irreversibel erblindet (WHO, 2012). Trotz guter Behandelbarkeit stellt es weltweit die zweithäufigste Erblindungsursache dar (RKI, 2010a).

### **1.5.2 Erkrankungen durch die Serovare D–K**

Die Prävalenz von urogenitalen Chlamydieninfektionen erhöht sich durch eine Anzahl von Risikofaktoren, sie umfassen:

- Alter unter 24 Jahre und erster Geschlechtsverkehr in relativ jungem Alter
- Ältere Sexualpartner (die sich mit höherer Wahrscheinlichkeit schon mit sexually transmitted diseases = STDs infiziert haben)
- Häufig wechselnde Sexualpartner und Inkonsistenz oder Unterlassen des Kondomgebrauchs
- Weitere STDs in der Anamnese
- Sozioökonomische Faktoren

(Crossman, 2006; ECDC, 2009a)

Die Inkubationszeit beträgt 1 bis 3 Wochen (RKI, 2010a). Der unbehandelte Verlauf einer Chlamydieninfektion ist nicht absehbar:

- Asymptomatische Verläufe heilen nicht selten spontan aus.
- In asymptomatischen, vor allem endozervikal lokalisierten Infektionen können die Erreger für lange Zeit persistieren.
- Klinische Manifestationen können sich auch später noch in zunächst symptomlosen Patient(inn)en ausprägen.
- Asymptomatische Infektionen können zu einem Tubenverschluss, einer Entzündung des kleinen Beckens (Pelvic Inflammatory Disease = PID) und konsekutiv zu einer Unfruchtbarkeit führen.

(ECDC, 2009a)

Die Serovare D–K führen bei Mann und Frau zu urogenitalen Infektionen, Einschlusskonjunktivitis und postinfektiös zur sexuell erworbenen reaktiven Arthritis (= sexually acquired reactive arthritis = SARA) (RKI, 2010a).

Die urogenitale Infektion der Frau bleibt in bis zu 80 % der Fälle symptomlos. Da die Infektion sich zunächst an der wenig innervierten Zervikalschleimhaut manifestiert, verursacht sie kaum Beschwerden (RKI, 2010a). In der Folge können weitere, eher unspezifische klinische Symptome bei der Frau auftreten, wie Fluor, Urethritis mit Dysurie, Entzündung der Bartholin-Drüsen, postkoitale Blutungen und gelegentlicher schlecht differenzierter Bauch- oder Unterbauschmerz (Lanjouw et al., 2010; RKI, 2010a). Steigt die Infektion von der Zervix auf, löst sie in 10–30 % der nicht behandelten Frauen eine PID aus (ECDC, 2009a). Die PID ist eine Entzündung des oberen weiblichen Genitaltraktes und geht einher mit Endo- und Parametritis, Adnexitis, tuboovariellen Abszessen und selten Peritonitis mit Perihepatitis. Narben- und Strikturenbildung kann im Verlauf zu chronischen Unterbauschmerzen führen (Crossman, 2006). Ein Verschluss der Tuben durch Vernarbung und Stenosen als Folge der Salpingitis stellt einen der häufigsten Gründe für eine Sterilität oder Extrauterin gravidität dar (RKI, 2010a). Das Spektrum der Erkrankung reicht von subklinischen, asymptomatischen Verläufen bis hin zu schweren Manifestationen (Crossman, 2006).

Da die urogenitale Infektion des Mannes in bis zu 50 % der Fälle asymptomatisch bleibt, besteht auch hier das Problem einer späten oder gar ausbleibenden Diagnose. *C. trachomatis* ist Ursache für nahezu 60 % der Fälle einer Nicht-Gonokokken-Urethritis des Mannes (Hof, 2014). Symptome umfassen eitrigem Ausfluss aus der Urethra sowie Schmerzen und Brennen beim Wasserlassen. Bei aufsteigenden Infektionen kommt es zu einer Prostatitis und

Epididymitis (RKI, 2010a). Auch beim Mann kann die Infektion zu Sterilität führen (Lanjouw et al., 2010). Je nach sexueller Gewohnheit sind auch Proktitis und Pharyngitis beschrieben (Lanjouw et al., 2010; RKI, 2010a).

Die Einschlusskonjunktivitis betrifft vor allem Neugeborene, die sich perinatal im Geburtskanal der Mutter infizieren (RKI, 2010a). Erwachsene können sich durch Kontakt mit kontaminierten Händen oder erregerhaltigem Sperma bzw. Vaginalsekret infizieren (ECDC, 2009a). Nach einer Inkubationszeit von 2–25 Tagen entwickelt sich eine akute eitrige Konjunktivitis, die jedoch in der Regel nach 3–16 Monaten folgenlos abheilt und nur in seltenen Fällen zu Narbenbildung und Eintrübung der Kornea führt (Hof, 2014). Wird eine adäquate Therapie eingeleitet, kann die Krankheitsdauer auf wenige Tage reduziert werden. Die credésche Prophylaxe zur Verhinderung einer okulären Gonokokkeninfektion kann eine okuläre Chlamydieninfektion nicht verhindern (Klos, 2009; AWMF, 2016).

Die sexuell erworbene reaktive Arthritis (= sexually acquired reactive arthritis = SARA) kann bei Männern und Frauen eine weitere Folge der Infektion mit *C. trachomatis* sein (ECDC, 2009b). Sie manifestiert sich typischerweise in den unteren Extremitäten durch Mono- oder Oligoarthritis und kann durch Enthesitis, Bursitis, Tenosynovitis, Sakroiliitis oder Daktylitis begleitet sein (Brzank and Wollenhaupt, 2013). Die Chlamydien verbleiben in Monozyten und Fibroblasten der Synovialmembran des Gelenkes im Zustand der Persistenz (Nettelbreker et al., 1998). Dort liefern sie den Stimulus für eine bakterienspezifische Immunreaktion (Wollenhaupt and Zeidler, 1998). Eine Antibiotikatherapie ist daher in vielen Fällen nicht hilfreich (Hof, 2014).

### **1.5.3 Lymphogranuloma venereum (LGV)**

Das Lymphogranuloma venereum tritt hauptsächlich in warmen, tropischen Gebieten bei Menschen mit niedrigem Sozialstatus auf (Hof, 2014). Vor 2004 wurden selten Fälle in Industrienationen festgestellt. Seither wird jedoch von Ausbrüchen in den Niederlanden und anderen Industrieländern berichtet (Lanjouw et al., 2010). Dabei sind nahezu alle Fälle bei HIV-positiven Männern, die Sex mit Männern (MSM) haben, aufgetreten (Hughes et al., 2013).

Nach einer Inkubationszeit von 3–12 Tagen entsteht am Infektionsort zunächst eine schmerzlose herpetiforme Primärläsion, die ulzerös zerfällt. Nach 10–30 Tagen kommt es zur nunmehr schmerzhaften, eitrigem Einschmelzung des regionären Lymphknotens, Bubo genannt, welcher im Verlauf aufbricht. Ohne Therapie geht die Krankheit in das chronische Stadium über. Hierbei kommt es zur narbigen Abheilung mit Verschluss der Lymphgefäße, die zu Lymphabflussstörungen im betroffenen Gebiet führt (RKI, 2010a; Hof, 2014).

Je nach sexueller Gewohnheit kann auch das Rektum betroffen sein. Die Symptome umfassen Obstipation oder Diarrhö, Tenesmen, anorektale und abdominale Schmerzen sowie ulzeröse Proktitis mit schleimigem oder blutigem Ausfluss. Narbige Strikturen und Stenosen, die sich in Folge bilden, müssen gegebenenfalls chirurgisch saniert werden (Lanjouw et al., 2010; RKI, 2010a).

#### 1.5.4 Besondere Patientengruppen

Die Infektion einer Schwangeren mit *C. trachomatis* ist ein Risikofaktor für vorzeitigen Blasensprung, Frühgeburtlichkeit und niedriges Geburtsgewicht (ECDC, 2009a,b). Bei 60–70 % der *C.-trachomatis*-positiven Schwangeren kommt es unter der Geburt zu einer Infektion des Kindes (AWMF, 2016). Die häufigste Manifestation ist dabei die Einschlusskonjunktivitis (Ophthalmia neonatorum). Bei Aspiration von chlamydienhaltigem Vaginalsekret sind schwere Pneumonien beschrieben. (ECDC, 2009a; RKI, 2010a). Bei mehr als 50 % der Kinder mit einer Pneumonie tritt begleitend eine Otitis media auf (AWMF, 2016).

**Tabelle 1: Erkrankungen durch *C. trachomatis* nach (Meyer, 2007; ECDC, 2009b)**

Serovar A–C	Serovar D–K	Serovar L1–L3
↓		↓
- Trachom		- Lymphogranuloma Venereum
	↙ ↓ ↘	
Frauen	Neugeborene	Männer
- Urethritis - Zervizitis - Proktitis - Konjunktivits	- Ophthalmia neonatorum - Pneumonie - Otitis media	- Urethritis - Proktitis - Konjunktivitis

**Tabelle 2: Komplikationen durch *C. trachomatis*, Serovar D–K nach (Meyer, 2007; ECDC, 2009b)**

Infektionen bei Frauen	Infektionen während der Schwangerschaft	Infektionen bei Männern
<ul style="list-style-type: none"> <li>- aufsteigende Entzündung mit Entwicklung einer PID</li> <li>- Tubenfaktor-Infertilität</li> <li>- extrauterine Schwangerschaft</li> <li>- SARA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- vorzeitiger Blasensprung</li> <li>- niedriges Geburtsgewicht</li> <li>- Übertragung von Mutter zu Kind</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Epididymitis</li> <li>- Epididymoorchitis</li> <li>- SARA</li> </ul>

SARA = sexually acquired reactive arthritis

## 1.6 Diagnostik

Ein Chlamydien-Screening wird für junge Frauen unter 25 Jahren kostenlos im jährlichen Turnus angeboten (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2007). Darüber hinaus ist eine Diagnostik bei klinischen Hinweisen, welche in Tabelle 3 aufgeführt sind, empfehlenswert.

**Tabelle 3: Indikationen für die Durchführung einer *C.-trachomatis*-Diagnostik bei sexuell aktiven Erwachsenen nach (ECDC, 2009b)**

Frauen	Männer	Frauen und Männer
<ul style="list-style-type: none"> <li>- postkoitale- oder Zwischenblutungen</li> <li>- Dyspareunie</li> <li>- Schmerzen im kleinen Becken</li> <li>- Dysurie mit negativer Mittelstrahlurinkultur</li> <li>- mukopurulenter Ausfluss</li> <li>- entzündete, leicht verletzbare Zervix</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Epididymitis, Epididymoorchitis</li> <li>- urethraler Ausfluss</li> <li>- Urethritis</li> <li>- Dysurie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- reaktive Arthritis, Konjunktivitis</li> <li>- Proktitis</li> <li>- genitale Ulzerationen</li> <li>- inguinale Schmerzen</li> </ul>

### 1.6.1 Untersuchungsmaterial

Voraussetzung für eine aussagekräftige mikrobiologische Diagnostik ist die korrekte Probenentnahme von Epithelzellen, da sich in ihnen die Erreger befinden (Klos, 2009). Ein Vulva-, Vagina- (Meyer, 2007) oder Zervixabstrich der Frau bzw. ein Urethralabstrich beim Mann dient der Materialgewinnung. Alternativ ist auch der Nachweis aus einer Harnprobe möglich. Da sich die Chlamydien in der Urethra befinden, sollte der Erststrahlurin als Probe gewonnen werden, um genügend infizierte Endothelzellen zu erhalten. Entsprechend des Manifestationsortes werden auch konjunktivale, pharyngeale oder rektale Abstriche entnommen (Lister et al., 2004; Klos, 2009). Chlamydien können selbst in Gewebeproben und Sperma nachgewiesen werden (Meyer, 2007).

Die Abstriche werden meist im Rahmen einer klinischen Untersuchung entnommen. Evaluationen zu selbstentnommenen Vaginalabstrichen zeigen vergleichbare Ergebnisse bezüglich der effektiven Probengewinnung. Damit können niederschwellige Screeningprogramme implementiert werden (Schachter et al., 2003).

Serum, aus Patient(inn)en entnommenen Blutproben gewonnen, dient dem Nachweis speziesspezifischer Antikörper durch die serologische Untersuchung (Meyer, 2007).

### 1.6.2 Nachweisverfahren

Es existieren verschiedene Nachweisverfahren für *C. trachomatis*. Die Wahl der geeigneten Methode hängt im individuellen Fall vom klinischen Bild und der Zielstellung der Diagnostik ab (RKI, 2010a).

Der direkte Chlamydiennachweis ist durch Zytologie, Zellkultur, Antigennachweis und molekularbiologische Methoden möglich. Der indirekte Nachweis gelingt durch die Serologie. Die Diagnose Chlamydien-„positiv“ kann gestellt werden, wenn entweder der Organismus isoliert, ein chlamydienspezifisches Antigen festgestellt oder serologisch die Zirkulation chlamydienspezifischer Antikörper nachgewiesen werden konnte (Kaleta and Taday, 2003).

Die verschiedenen Testverfahren sind in der Tabelle 4 zusammengefasst. Näher erläutert wird die für diese Arbeit relevante serologische Untersuchung.

**Tabelle 4: Nachweisverfahren für *C. trachomatis* (Meyer, 2009)**

Nachweisverfahren	Testmethode	Probenmaterial
<b>Zytologie</b>	- Giemsa-Färbung	- Abstrich
<b>Zellkultur</b>	- McCoy-Zellen, HeLa-Zellen	- Abstrich (Biopsie)
<b>Antigennachweis</b>	- DIF	- Abstrich
	- EIA	- Abstrich (Urin)
	- Schnelltest	- Abstrich
<b>Nukleinsäurenachweis</b>	- Hybridisierung	- Abstrich, Urin, Biopsie, Sperma
	- Amplifikationsverfahren (NAT)	- Abstrich, Urin, Biopsie, Sperma
<b>Antikörperteste</b>	- KBR, EIA, MIFT, Westernblot	- Serum
	- Line Assays	

EIA = Enzymimmunoassay; DIF = Direkte Immunfluoreszenz; KBR = Komplementbindungsreaktion; MIFT = Mikroimmunfluoreszenztest; NAT = Nukleinsäure amplifizierender Test

### 1.6.3 Serologie

**Tabelle 5: Serologische Methoden zur Chlamydien-Diagnostik nach (Meyer, 2009)**

Testformat	Antigene
- KBR	- LPS
- EIA	- LPS, Proteinsequenzen des MOMP (omp-1), HSP60 und anderes
- MIFT	- Formalin-fixierte EK (MOMP)
- Immunoblot	- geblottetes, aufgetrenntes Chlamydiengesamtantigen
- rekombinanter Immunoblot	- isolierte oder rekombinante Antigene

EIA = Enzymimmunoassay; EK = Elementarkörperchen; HSP = Hitzeschockprotein 60; KBR = Komplementbindungsreaktion; LPS = Lipopolysaccharid; MIFT = Mikroimmunfluoreszenztest; MOMP = major outer membrane protein; omp-1 = outer membrane protein 1

Eine Zusammenfassung der serologischen Verfahren zur Chlamydien-Diagnostik ist in Tabelle 5 dargestellt. Die beiden für diese Untersuchung relevanten werden unter den Punkten 1.6.4 und 1.6.5 erläutert.

Antikörper werden nach Antigenkontakt von aktivierten B-Zellen hergestellt und bilden die Grundlage für die spezifische Abwehrreaktion gegen extrazelluläre Pathogene, lösliche Proteine sowie Toxine. Antikörper finden sich im Serum und anderen Körperflüssigkeiten wie z. B. Muttermilch oder Magensekret (Madigan and Martinko, 2006).

Nicht immer geht eine urogenitale Chlamydieninfektion mit einer systemischen Antikörperantwort einher. Gerade lokale, oberflächliche Infektionen des unteren Genitaltraktes können sich durch eine schwache und verspätete systemische Immunreaktion der serologischen Diagnostik entziehen. Durchbrechen die Erreger jedoch die Epithelbarriere bei einer invasiven und ascendierenden Infektion (PID, LGV), ist eine ausgeprägte Immunantwort mit einer deutlichen Antikörperproduktion nachzuweisen (Meyer, 2007). Da in diesem Stadium der Erkrankung die Chlamydien per Abstrich nicht mehr erfassbar sind, liegt die diagnostische Bedeutung der Serologie im Nachweis der Antikörper als chronisch invasive Marker (Meyer, 2009).

Im Verlauf einer typischen Immunreaktion auf ein Antigen sind IgM-Antikörper die erste Antikörper-Klasse, die gebildet wird. Sie sind jedoch selten bei einer Chlamydieninfektion nachzuweisen (Black, 1997). Um zwischen einer abgelaufenen oder bestehenden Infektion zu unterscheiden, werden IgA- und IgG-Antikörper zur Diagnostik herangezogen (vgl. Tabelle 6) (Meyer, 2007).

Es kann 4–8 Wochen dauern, bis nach einer Infektion mit *C. trachomatis* Antikörper gebildet werden (Black, 1997; RKI, 2010a). Für die Diagnostik einer akuten Infektion besitzen sie demnach einen geringen Stellenwert. Auch nachgewiesene IgA-Antikörper sind nicht notwendigerweise ein Aktualitätsmarker (RKI, 2010a). Die Antikörper sind teilweise auch nach erfolgter Behandlung noch nach Jahren nachweisbar und sprechen bei fehlender Symptomatik daher nicht zwingend für eine persistierende oder chronisch aktive Infektion (Clad et al., 2000; RKI, 2010a). Die Persistenz der Antikörpertiter ist daher nicht unbedingt von dem Vorhandensein von Antigenen abhängig, sondern eher von der Reaktivität des individuellen Immunsystems (Clad et al., 2000). Es gilt daher immer, Klinik und serologische Ergebnisse im Zusammenhang zu betrachten und die Dynamik der Antikörpertiter zu beachten. Können Antikörper nachgewiesen werden oder liegt ein grenzwertiges Ergebnis vor, wird eine erneute Kontrolle nach 14 Tagen empfohlen (vgl. Tabelle 6) (medac, 2008).

**Tabelle 6: Interpretation unterschiedlicher Ergebniskombinationen spezifischer Antikörper nach (medac, 2008)**

Mögliche Ergebnisse		Interpretation
IgG	IgA	
- negativ	- positiv	- Frühes Infektionsstadium oder solitär persistierendes IgA: IgA und IgG nach 14 Tagen überprüfen.
- positiv	- positiv	- Bestehende Infektion: IgA und IgG nach 14 Tagen überprüfen. Bei chronischer Infektion mit persistierenden Erregern bleiben die Antikörperspiegel konstant, bei einer akuten Infektion steigen sie an.
- positiv	- negativ	- Zurückliegende Infektion: Bei klinischem Verdacht nach 14 Tagen IgA und IgG überprüfen.
- negativ	- negativ	- Kein Hinweis auf eine bestehende oder abgelaufene Infektion: Bei klinischem Verdacht nach 14 Tagen auf IgA und IgG überprüfen.

#### 1.6.4 Mikroimmunfluoreszenztest (MIFT)

Als Antigen für den 1970 entwickelten MIFT werden gereinigte und mit Formalin fixierte Elementarkörperchen der jeweiligen Chlamydienarten bzw. Serotypen verwendet. Sie werden in einem vorbestimmten Muster auf einen Objektträger aufgebracht und mit Patient(inn)enserum inkubiert. Nach Inkubation, Waschung und Trocknung der Probe werden fluoreszenzmarkierte Antikörper hinzugefügt, die wiederum an die nachzuweisenden spezifischen Chlamydienantikörper binden. Nach einem erneutem Inkubations-, Wasch- und Trocknungsdurchlauf werden die Proben visuell mit einem positiven und negativen Referenzserum verglichen. In der Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop leuchten die positiven Proben auf (Black, 1997).

Der Test ist arbeits- und kostenintensiv (Black, 1997). Die korrekte Auswertung erfordert zudem Erfahrung und Expertenwissen und ist abhängig vom Untersucher und vom durchführenden Labor. Unter den serologischen Methoden gilt er als Goldstandard der Diagnostik. Die neuere Forschung zeigte vergleichbare Ergebnisse für ELISA-Teste, so dass aufgrund der Kosten-Nutzen-Relation diesen der Vorzug gegeben werden sollte (Morré et al., 1998; Baud et al., 2010; Muvunyi et al., 2012).

### 1.6.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

**Tabelle 7: Antigene für die serologische *C.-trachomatis*-Diagnostik nach (Forsbach-Birk et al., 2010)**

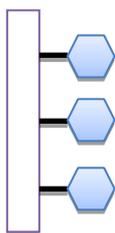
Antigen	Sensitivität	Spezifität
- MOMP	- 83 %	- 100 %
- Omp-2	- 92 %	- 100 %
- CPAF	- 84 %	- 98 %
- TARP	- 73 %	- 90 %
- PmpD	- 70 %	- 82 %
- cHSP60	- 61 %	- 90 %
- HP17	- 45 %	- 94 %
- RpsA	- 22 %	- 100 %
- TSAP	- 36 %	- 99 %

cHSP = chlamydial heat shock protein; CPAF = chlamydial protease-like activity factor; HP17 = hypothetical protein 17; MOMP = major outer membrane protein; Omp-2 = outer membrane protein 2; PmpD = polymorphic membrane protein; RpsA = ribosomal protein S1; TARP = translocated actin-recruiting protein; TSAP = thiol-specific antioxidant peroxidase

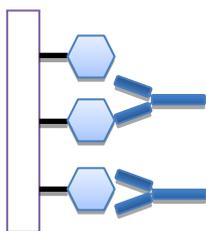
EILSA-Teste sind gekennzeichnet durch eine hohe Durchsatsrate, objektive Ergebnisse und leichte technische Durchführbarkeit (Muvunyi et al., 2012). Hier werden speziesspezifische Peptide der Chlamydienaußenhülle als Antigen genutzt. Dadurch kann eine hohe Sensitivität (bis 92 %) und Spezifität (bis 100 %) erreicht werden (vgl. Tabelle 7) (Forsbach-Birk et al., 2010).

ELISAs sind quantitative Immunoassays. Das Prinzip dieser Methode beruht dabei auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der das Paratop eines Antikörpers spezifisch das Epitop eines entsprechenden Antigens bindet. Die Ausbildung dieser Bindung entspricht einer Gleichgewichtsreaktion und unterliegt demzufolge dem Massenwirkungsgesetz (Luttmann et al., 2009). Kovalent an Antikörpermoleküle gebundene Enzyme sind in der Lage, dem Test hinzugefügtes Substrat umzusetzen. Die Konzentration des gefärbten Reaktionsproduktes lässt sich auch in sehr niedrigen Konzentrationen mengenmäßig genau messen und entspricht der Menge des nachzuweisenden Antigens oder Antikörpers (Madigan and Martinko, 2006). Der Immunoassay ist demnach ein hochspezifischer und empfindlicher Test (Madigan and Martinko, 2006; Luttmann et al., 2009). Unterschieden werden 2 grundlegende ELISA-

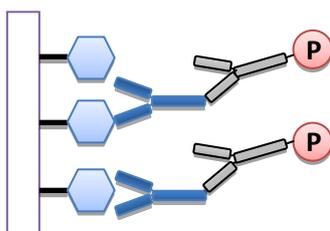
Varianten. Gegenstand des Nachweises kann entweder ein Antigen oder ein Antikörper sein (Madigan and Martinko, 2006). Der für diese Untersuchung relevante Antikörpernachweis soll im Folgenden erklärt werden (vgl. Abbildung 3).



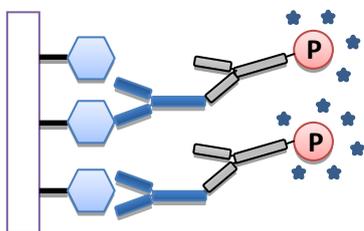
Mit *C. trachomatis*-spezifischem synthetisierten Peptid (aus der variablen Region von MOMP) beschichtete Mikrotiterplatte.



Die *C. trachomatis*-spezifischen Antikörper binden an das Antigen.



Das peroxidasegekoppelte Anti-human-IgA bzw. -IgG bindet an die IgA- bzw. IgG-Antikörper.



Nun erfolgt die Inkubation mit TMB-Substrat und dann das Stoppen der Reaktion.

Die Auswertung erfolgt photometrisch.

★ = TMB-Substrat, P = Peroxidase

**Abbildung 3: Testprinzip Antikörper-ELISA, Beispiel *C. trachomatis* ELISA, nach (medac, 2008)**

Beim Antikörper-ELISA werden mittels eines an einer festen Phase gebundenen spezifischen Antigens Antikörper in Humansen nachgewiesen (Madigan and Martinko).

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten der Antikörper-ELISA-Teste sind mit einem spezifischen Antigen beschichtet, im Fall der vorliegenden Testsysteme spezifische, synthetische Peptide aus der variablen Region von MOMP (medac, 2008; ANILabsystems, 2009). Sind die gesuchten Antikörper in der hinzugefügten Probe vorhanden, binden sie spezifisch an das adsorbierte Antigen. Nur Antikörper mit einem spezifischen Paratop können an die Antigene binden. Um die abgelaufene Antigen-Antikörper-Reaktion nachzuweisen, wird ein weiterer Antikörper, der mit einem Enzym, hier Meerrettich-Peroxidase, markiert ist, hinzugegeben. Dieser Antikörper ist eine Anti-human-IgA- bzw. -IgG-Präparation und ist so konzipiert, dass weder die spezifische

Bindungsfähigkeit des Antikörpers noch die katalytische Aktivität des Enzyms eingeschränkt sind. Der zweite Antikörper bindet nun an den Fc-Teil des nachzuweisenden Antikörpers. Ein hinzugefügtes Substrat, hier TMB-Substrat, wird von dem Enzym in ein farbiges Reaktionsprodukt umgesetzt. Die Reaktion wird durch Hinzugeben von Schwefelsäure gestoppt. Photometrisch wird die Extinktion des Reaktionsproduktes gemessen. Die Menge der sich entwickelnden Farbe ist proportional zur Menge des nachzuweisenden Antikörpers (Madigan and Martinko, 2006; medac, 2008).

Die Peroxidase oxidiert die Substrate mit Hilfe von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Am weitesten verbreitet ist die Verwendung von Meerrettich-Peroxidase (horse radish peroxidase = HRP), da sie sehr stabil ist und eine hohe Katalysegeschwindigkeit aufweist. Das am häufigsten verwendete Substrat in HRP-Detektionssystemen ist 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), ein farbloses Chromogen, welches in dieser Reaktion außerdem als Protonendonator dient. Unter Bildung von Wasser wird diese vorher farblose Substanz durch Abgabe von Wasserstoff oxidiert und bildet ein blaues Endprodukt. Durch die Zugabe einer anorganischen Säure wie Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ) wird die Reaktion gestoppt und ein stabiler gelber Komplex gebildet (Laing et al., 2011).

## **1.7 Therapie**

### **1.7.1 Therapie der genitalen Chlamydieninfektion**

Auch wenn Chlamydieninfektionen spontan und ohne Residuen ausheilen können, sollte eine Therapie umgehend nach Diagnosestellung eingeleitet werden, um Komplikationen zu verhindern (CDC, 2010). Alle Sexualpartner der letzten 6 Monate sollten in die Behandlung mit einbezogen werden, um Reinfektionen zu vermeiden (AWMF, 2016). Eine adäquate Dosierung der Antibiose und konsequente Fortführung über die komplette Behandlungsdauer ist für die Vermeidung einer Persistenz- und Resistenzentwicklung dringend erforderlich (Hogan et al., 2004; Schoborg, 2011).

Die empfohlene Therapie der unkomplizierten urogenitalen Infektion in Erwachsenen umfasst laut der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF):

- 1. Wahl: (Tetracycline) Doxycyclin 100 mg, 2 x tgl. für 7 Tage per os (p. o.)
- 2. Wahl: (Makrolide) Azithromycin 1 g (bzw. 1,5 g), in Einzeldosis p. o.

(AWMF, 2016)

Komplizierte Verläufe, wie PID oder Epididymitis, erfordern stets eine zweiwöchige Behandlung, eventuell mit parenteraler Verabreichung des Antibiotikums unter stationären Bedingungen (RKI, 2010a; AWMF, 2016). Als Alternativpräparat zu Doxycyclin können hierbei Ofloxacin und Moxifloxacin (Fluorchinolone) eingesetzt werden. Zur Eskalation der Therapie einer PID kann Doxycyclin mit Metronidazol (Nitroimidazole) kombiniert werden. Weiterhin ist es möglich, Doxycyclin mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zu kombinieren, um bei einer PID auch differentialdiagnostische Erreger wie z. B. Gonokokken zu berücksichtigen. Laut AWMF eignen sich hierzu Ceftriaxon (3. Generation Cephalosporine) und Kombinationspräparate wie Amoxicillin/Clavulansäure und Piperacillin/Tazobactam (Penicilline/ $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren) (AWMF, 2016).

Schwangere Patientinnen mit unkompliziertem Erkrankungsverlauf können mit Azithromycin 1 g (bzw. 1,5 g) in Einzeldosis p. o. behandelt werden. Alternativ wird Erythromycin (Makrolide) 500 mg 4 x tgl. für 7 Tage p. o. oder bei schlechter Verträglichkeit 2 x tgl. für 14 Tage p. o. gegeben (AWMF, 2016).

Das LGV wird mit Doxycyclin 100 mg 2 x tgl. p. o. oder Erythromycin 500 mg 4 x tgl. p. o. über einen Zeitraum von 3 Wochen behandelt (RKI, 2010a; AWMF, 2016).

### **1.7.2 Therapie von Trachom und Einschlusskonjunktivitis sowie Pneumonie bei Neugeborenen**

Okuläre Infektionen müssen mit einer systemischen Antibiotikagabe behandelt werden. Hierbei gilt bei Erwachsenen, inklusive schwangeren Frauen, die einmalige Gabe von Azithromycin 1,5 g p. o. als Mittel der ersten Wahl. Alternativ kann Azithromycin 500 mg 1 x tgl. für 3 Tage p. o. oder bei nicht Schwangeren Doxycyclin 100 mg, 2 x tgl. Für 7 Tage p. o. eingesetzt werden. Ausschließlich für das Trachom kann als Mittel der zweiten Wahl die topische Gabe von Azithromycin 2 x tgl. für 3 Tage in Betracht gezogen werden (AWMF, 2016). Die lokale antibiotische Therapie der Einschlusskonjunktivitis ist unterstützend möglich, jedoch nicht zwingend erforderlich. Auf jeden Fall sollte jedoch die systemische Behandlung des Sexualpartners erfolgen (AWMF, 2016).

Infektionen bei Neugeborenen, ob Konjunktivitis oder Pneumonie, werden durch die vierzehntägige orale Gabe von Erythromycin behandelt. Die Dosis beträgt für Erythromycin-Ethylsuccinat 40–50 mg/kg pro Tag und Erythromycin estolat 30–40 mg/kg pro Tag (AWMF, 2016).

## 2. Fragestellung

Im Labor für Virologie/Serologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wird zur Diagnostik von IgA- und IgG-Antikörpern gegen *C. trachomatis* der Chlamydia trachomatis-IgA- bzw. -IgG-ELISA plus medac der Firma medac GmbH, Standort Wedel, Deutschland verwendet. Alternativ steht nun der Chlamydia trachomatis IgA- bzw. -IgG EIA der Firma ANI Labsystems Ltd. Oy, Vantaa, Finnland, Vertrieb in Deutschland: Sekisui Virotech GmbH, Rüsselsheim, Deutschland zu Verfügung.

Vor Aufstellung von Kosten-Nutzen-Relationen soll zunächst geprüft werden, ob der zur Diskussion stehende Test auch im klinischen Einsatz im Vergleich zum Chlamydia trachomatis-IgA- bzw. -IgG-ELISA plus medac vergleichbar gute Ergebnisse erzielt und eine Alternative zum bisher verwendeten Test darstellt.

Im Rahmen dieser Untersuchung sollen folgende Fragen geklärt werden:

- 1.) Welcher Test weist die bessere Reproduzierbarkeit auf, bzw. welcher Test zeigt die bessere Intra-Test-Übereinstimmung?
- 2.) Wie hoch ist die Inter-Test-Übereinstimmung der beiden ELISA-Teste?
- 3.) Kann bei divergenten Testergebnissen durch Synopse der Anamnese, des klinischen Befundes und anderer Laborbefunde der Krankheitsstatus bestimmt werden?
- 4.) Welcher der beiden ELISA-Teste korreliert bei divergierenden Testergebnissen besser mit den klinischen Daten?

## 3. Material

### 3.1 Patientengut

Eine Kooperation mit dem Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. H. M. Behre ermöglichte es, Blutproben für diese Untersuchung zu erhalten. Insgesamt wurden 216 Proben in der Kinderwunschprechstunde von OÄ Dr. med. P. Kaltwaßer im Zeitraum vom 19.05.2011 bis zum 11.07.2012 gesammelt. Die Blutproben stammen ausschließlich von Frauen.

Die Patientinnen wurden im Laufe des ärztlichen Beratungsgespräches von Frau Dr. Kaltwaßer zusätzlich über diese laufende Untersuchung aufgeklärt. Sie wurden darum gebeten, ihr schriftliches Einverständnis zum Weiterverwenden ihrer Blutprobe sowie zur anonymisierten Auswertung der Angaben über Ihre Gesundheit im Rahmen dieser Untersuchung zu geben. Die Patientinnen wurden darauf hingewiesen, dass die Teilnahme freiwillig ist und ein Widerruf dieser Einwilligung jederzeit ohne Angaben von Gründen und ohne zu erwartende Nachteile möglich ist. Gaben die Patientinnen ihr Einverständnis, wurde ihnen eine Blutprobe von 1 x 4,5 ml Blut in ein Serumröhrchen entnommen. Diese wurde noch im Zentrum für Reproduktionsmedizin aufgearbeitet und jeweils 1 ml des Serums zur Testung im Rahmen der vorliegenden Untersuchung in das Labor für Virologie/Serologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg überführt.

Die Patienteninformation mit der Einverständniserklärung befindet sich unter 9. Anlagen. Ein positives Votum der zuständigen Ethikkommission liegt vor.

### 3.2 Geräte, Laborausstattung und Verbrauchsmaterialien

- DSX™ 4-Platten ELISA-Vollautomat
- Messzylinder zur Verdünnung der Reagenzien
- Eppendorf-Präzisionspipetten (Einkanalpipetten: 10–100 µl, 100–1000 µl) mit Pipetten-Tips
- Kleine Reagenzgläser aus Kunststoff zum Verdünnen von Probenverdünnungspuffer und Proben
- Reagenzlashalter
- Einmalhandschuhe
- Aqua destillata

### 3.3 Testkits und Kitinhalt

#### 3.3.1 Testkitinhalt

Tabelle 8: Testkits

medac GmbH, Wedel, Deutschland	ANI Labsystems Ltd. Oy, Vantaa, Finnland Vertrieb in Deutschland: Sekisui Virotech GmbH
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chlamydia trachomatis-IgA-ELISA plus medac</li> <li>- Chlamydia trachomatis-IgG-ELISA plus medac</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chlamydia trachomatis IgA EIA</li> <li>- Chlamydia trachomatis IgG EIA</li> </ul>



Abbildung 4: medac, Testkit



Abbildung 5: ANI Labsystems, Testkit

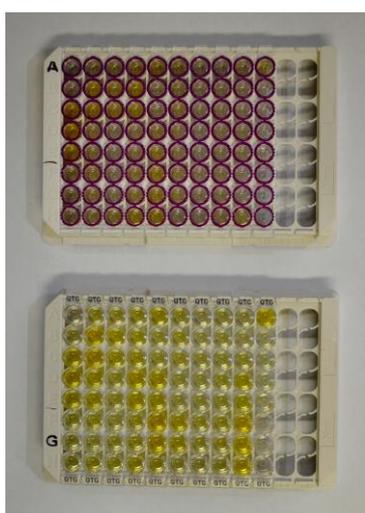


Abbildung 6: medac, Mikrotiterplatten IgA und IgG, ausgewertet



Abbildung 7: ANI Labsystems, Mikrotiterplatte mit Probenverdünnungspuffer

Chlamydia trachomatis-IgA- bzw. -IgG-ELISA plus medac, medac GmbH

- *Mikrotiterplatte*: 12 x 8 Vertiefungen (Teststreifen), lila markiert für IgA, mit „QTG“ beschriftet für IgG (vgl. Abbildung 6), mit Halterahmen und Trockenmittelpappe im Aluminiumbeutel vakuumverschweißt, brechbar, Rundboden, beschichtet mit *C.-trachomatis*-spezifischem, synthetischem Peptid und NBCS, gebrauchsfertig
- *Negativkontrolle*: 1,5 ml humanes Serum, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält NCBS, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamicinsulfat
- *Positivkontrolle*: 1,5 ml humanes Serum, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält BSA, FKS, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamicinsulfat
- *Kalibrator*: 1,5 ml humanes Serum, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält BSA, FKS, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamicinsulfat
- *Waschpuffer*: 100 ml PBS/Tween (10x), pH 7,2–7,4, enthält ProClin™ 300
- *Probenverdünnungspuffer*: 110 ml PBS/Tween/NBCS, pH 7,0–7,2, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält ProClin™ 300
- *Konjugat*: 3 x 4,5 ml Anti-human-IgA- bzw. -IgG-Antikörper (Ziege), HRP-konjugiert, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamicinsulfat
- *TMB-Substrat*: 10 ml, gebrauchsfertig
- *Stopplösung*: 2 x 11 ml 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Schwefelsäure), gebrauchsfertig
- *Abdeckfolien* für die Platten, 2 Stück

(medac, 2008)

Chlamydia trachomatis IgA- bzw. -IgG EIA, ANI Labsystems Ltd. Oy

- *beschichtete Mikrotiterplatte*: 12 x 8 Vertiefungen (Teststreifen), mit Halterahmen und im Aluminiumbeutel verschweißt, brechbar, Rundboden (vgl. Abbildung 7)
- *Probenverdünnungslösung*: 30 ml trisgepufferte Kochsalzlösung mit Zusätzen, einem blau gefärbten Reagenz und 0,05 % Bronidox®
- *Negativkontrolle*: 1 ml *C.-trachomatis*-Antikörper-negatives Humanserum mit 0,05 % Bronidox® als Konservierungsmittel
- *Positivkontrolle*: 1 ml *C.-trachomatis*-Antikörper-positives Humanserum mit 0,05 % Bronidox® als Konservierungsmittel
- *Konjugate*: 40 ml gepufferte Kochsalzlösung mit Zusätzen, einem rotgefärbten Reagenz, Meerrettich-Peroxidase-(HRP-)konjugiertes anti-human-IgA bzw. -IgG (Schaf) mit 0,1 % N-Methylisothiazolon als Konservierungsmittel

- *TMB-Substrat-Solution*: 2 x 18 ml, Citrat-Puffer, enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) mit Zusätzen und 0,01 % Kathon CG als Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
- *Stopplösung*: 25 ml 0,45 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Schwefelsäure)
- *Waschlösung*: 100 ml konzentrierte citratgepufferte Kochsalzlösung mit Zusätzen und 0,05 % Bronidox® als Konservierungsmittel
- *Abdeckfolien* für die Platten, 2 Stück
- *Einwegbehälter* für die Reagenzien, 2 Stück

(ANILabsystems, 2009)

### 3.3.2 Erklärung zu den Reagenzien

- ProClin™ 300: ein auf 5-Chlor-2-Methyl-4-Isothiazolin-3-on/2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one (CMIT/MIT 3 %) basierende antimikrobielle Lösung, Lösungsmittel ist Propylenglycol mit Zusatz von Alkylcarboxylate als Stabilisator
- Tween: Tween 20, entspricht Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat, ein Emulgator
- Bronidox: 5-Brom-5-Nitro-1,3-Dioxan, eine antimikrobielle Substanz
- Kathon CG: eine auf 5-Chloro-2-Methyl-4-Isouthiazol-3-one/2-Methyl-4-Isouthiazol-3-on basierende antimikrobielle Lösung, Lösungsmittel ist Wasser mit Zusätzen von Magnesiumsalzen wie Magnesiumchlorid und Magnesiumnitrat als Stabilisator

(Uretsky, 2000)

## 4. Methoden

Die Funktionsweise des für diese Untersuchung relevanten Antikörper-ELISA wurde unter Punkt 1.6.5 erläutert.

### 4.1 Arbeitsablauf

Blutproben von Patientinnen der Kinderwunschsprechstunde, die ihr Einverständnis zu der Teilnahme an der Untersuchung gaben, wurden in die Studie einbezogen.

Die Seren wurden vor der Analyse bei -20 °C gelagert. Die Testung der Proben erfolgte mit 2 verschiedenen serologischen Testen, nämlich:

- dem im Labor für Virologie/Serologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angewendete Test Chlamydia trachomatis-IgA bzw. -IgG-ELISA plus medac der Firma medac GmbH und
- dem Chlamydia trachomatis IgA- bzw. -IgG EIA der Firma ANI Labsystems Ltd. Oy, Vertrieb in Deutschland von Sekisui Virotech GmbH.

Alle Testkomponenten wurden vor Ansetzen der Teste auf Raumtemperatur erwärmt.

Der eingesetzte DSX™ 4-Platten ELISA-Vollautomat wurde vor Durchlauf des Testes mit testspezifischem Waschpuffer, Konjugat, TMB-Substrat, Stopplösung und A. dest. beschickt. Insgesamt stand pro Probandin 1 ml Probenmaterial zur Verfügung. Die zur maschinellen Beschickung erforderliche Mindesteintauchtiefe des ELISA-Vollautomaten konnte damit nicht erreicht werden. Die Wellplatten wurden daher händisch beschickt und dann in den Automaten eingesetzt.

In jedem Testdurchlauf wurden jeweils eine IgA- und eine IgG-Mikrotiterplatte des Chlamydia trachomatis-IgA bzw. -IgG-ELISA plus medac oder entsprechend des Chlamydia trachomatis IgA- bzw. -IgG EIA von ANI Labsystems beschickt und analysiert. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Mikrotiterplatten sind mit 12 x 8, also 96 Wells versehen, sodass 45 Proben je Durchlauf getestet werden konnten.

#### 4.1.1 Chlamydia trachomatis-IgA bzw. -IgG-ELISA plus medac (Ctmedac)

Im ersten Schritt wurden die Seren per Hand im Verhältnis 1 : 50 mit Probenverdünnungslösung verdünnt. Dies entspricht 10 µl Serum und 490 µl Probenverdünnungslösung. Folgend wurden jeweils 50 µl des Probenverdünnungspuffers zur Leerwertbestimmung, 50 µl der Negativkontrolle und der Positivkontrolle sowie in

Doppelbestimmung 50 µl des Kalibrators mit einer 1-Kanal-Pipette in die Kavitäten der IgA- und IgG-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Proben wurden in Doppelbestimmung zu je 50 µl angesetzt. Nach händischer Beschickung der IgA- und IgG-Mikrotiterplatten wurden diese zur weiteren Bearbeitung in den DSX™ 4-Platten ELISA-Vollautomaten eingesetzt und dort für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die dreimalige Waschung mit jeweils 200 µl Waschlösung.

Im zweiten Arbeitsschritt wurden jeweils 60 µl Konjugat in die Kavitäten pipettiert und erneut für 60 Minuten inkubiert mit wiederum dreimaliger Waschung.

Das Hinzufügen von jeweils 50 µl TMB-Substrat in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit Inkubation für weitere 30 Minuten bei 37 °C unter Lichtausschluss umfasste den dritten Arbeitsschritt.

Danach wurde im vierten Schritt durch Zugabe von jeweils 100 µl Stopplösung die Reaktion gestoppt. Positive Proben sind durch einen Farbumschlag von blau nach gelb gekennzeichnet. Im Anschluss erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei 450 nm/Referenz 620–650 nm.

Da die Mikrotiterplatten mit einem *C.-trachomatis*-spezifischem, synthetischen Peptid beschichtet sind, sind laut Angaben des Herstellers falsch positive Ergebnisse durch Kreuzreaktionen mit anderen Chlamydienarten ausgeschlossen (medac, 2008).

#### **4.1.2 Chlamydia trachomatis IgA- bzw. -IgG EIA, ANI Labsystems (CtANILab)**

Die Seren wurden im Verhältnis 1 : 10 mit Probenverdünnungslösung verdünnt. Per Hand wurden 180 µl Probenverdünnungslösung mit einer 1-Kanal-Pipette in jede Kavität pipettiert. Dann folgte das Pipettieren von jeweils 20 µl Probenverdünnungslösung für den Leerwert, 20 µl der Negativ-Kontrolle, 20 µl der Positiv-Kontrolle in Doppelbestimmung sowie jeweils 20 µl der Proben im Doppelansatz, sodass auch hier 45 Proben pro Testdurchlauf analysiert wurden. Es folgte das Einsetzen der IgA- und IgG-Mikrotiterplatte in den DSX™ 4-Platten ELISA-Vollautomaten und die Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C. Weiterhin erfolgte ein fünfmaliges Waschen jeder Vertiefung mit 400 µl Waschlösung.

Im Schritt 2 wurden 200 µl Konjugat in jede Vertiefung pipettiert und der Ansatz weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte wieder ein fünfmaliges Waschen jeder Vertiefung wie beschrieben.

Nun wurden im dritten Schritt jeweils 200 µl TMB-Substrat in jede Kavität hinzugefügt und dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde in einem vierten Schritt durch Zugabe von jeweils 100 µl Stopplösung die enzymatische Farbumsetzung gestoppt und bei 450 nm/Referenz 620 nm (590 nm–690 nm) die Absorption photometrisch gemessen. Positive Proben sind gekennzeichnet durch einen Farbumschlag von blau zu gelb.

Laut Angaben des Herstellers können durch Verwendung eines speziesspezifischen, synthetisch hergestellten Antigens falsch positive Ergebnisse durch Interferenzen mit Antikörpern gegen andere Chlamydienarten vermieden werden (ANILabsystems, 2009).

## 4.2 Berechnung und Interpretation der Ergebnisse

Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte automatisch durch das an den DSX™ 4-Platten ELISA-Vollautomat gekoppelte Computerprogramm/Photometer. Basierend auf der Extinktion der Proben errechnete sich ein metrischer Wert, der von Ctmedac in der willkürlich festgelegten Einheit AU/ml und von CtANILab ohne Einheit angegeben wurde. Je nach vorheriger Festlegung durch den Hersteller wurden diese Messergebnisse weiterhin in die 3 Kategorien Antikörper-„positiv“, -„grenzwertig“ und -„negativ“ eingeordnet. Die Ausgabe der Messergebnisse erfolgte in einer Datenmatrix. Zur Quantifizierung der Messergebnisse wurden die Formeln aus Tabelle 9 und Tabelle 10 herangezogen.

**Tabelle 9: Berechnung und Interpretation der Ergebnisse (medac, 2008)**

<b>Berechnung</b>	
1.) $OD_{\text{Korrigiert}} = (OD_{\text{Sollwert des Kalibrators}} / OD_{\text{Messwert des Kalibrators}}) \times OD_{\text{Gemessen}}$	
2.) $\text{Konzentration [AU/ml]} = b / (a / OD_{\text{Korrigiert}} - 1)$	
<b>Interpretation der Ergebnisse</b>	
Der erfassbare Messbereich erstreckt sich von 22–200 AU/ml. Angegeben wurden Ergebnisse außerhalb des Messbereiches mit < 20,0 AU/ml an der unteren Nachweisgrenze bzw. > 200,00 AU/ml an der oberen Nachweisgrenze. Für IgA und IgG gilt:	
Unit-Werte < 22.00	negativ
22.00 ≤ Unit-Wert < 28.00	grenzwertig
28.00 ≥ Unit-Wert	positiv

OD = Optische Dichte; AU/ml = arbitrary units per millilitre; a und b = Kurvenparameter der chargenspezifischen Standardkurve

**Tabelle 10: Berechnung und Interpretation der Ergebnisse (ANILabsystems, 2009)**

Berechnung	
1.) $CO = 0.6 \times (Apc - Arb)$	
2.) $S/CO = (As - Arb) / CO$	
Interpretation der Ergebnisse	
Eine Begrenzung des zu erfassenden Messbereiches liegt nicht vor. Minimal kann das Ergebnis „0,00“ betragen. Ein Maximalwert als obere Nachweisgrenze ist vom Hersteller nicht vorgesehen. Die Werte werden ohne Einheit angegeben. Für IgA und IgG gilt:	
$S/CO < 1.0$	negativ
$1.0 \leq S/CO < 1.4$	zweifelhaft
$S/CO \geq 1.4$	positiv

Arb = Mittelwert der Absorption des Reagenzienleerwertes; Apc = Mittelwert der Absorption der Positiv-Kontrolle; As = Mittelwert der Absorption der Probe; CO = Cut-Off-Wert in arbitrary units (AU); S/CO = Signal/Cut-Off

### 4.3 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurde IBM® SPSS® 20 für Windows verwendet.

Es sollte festgestellt werden, welcher Test die bessere Reproduzierbarkeit aufweist bzw. wie gut die beiden Teste miteinander übereinstimmen. Da beide Teste die Ergebnisse in unterschiedlichen Einheiten angeben, ist ein direkter Vergleich der Testergebnisse nicht möglich. Vergleichbar sind jedoch die von den Testergebnissen abgeleiteten kategorialen Zuordnungen „positiv“, „grenzwertig“ und „negativ“. Hierbei kann die *beobachtete Übereinstimmung* und *Cohens Kappa  $\kappa$*  mit dazugehörigem Konfidenzintervall betrachtet werden (Kwiecien et al., 2011). Weiterhin kann die Korrelation der metrischen Daten bzw. Testergebnisse anhand des *Rangkorrelationskoeffizienten  $r_s$  nach Spearman* errechnet werden. (Coggon, 2007).

Um die Testergebnisse innerhalb eines Testes direkt miteinander zu vergleichen, kann eine *Bland-Altman-Analyse* durchgeführt sowie der *Rangkorrelationskoeffizienten  $r_s$  nach Spearman* berechnet werden. Weiterhin ist auch hier ein indirekter Vergleich anhand der oben

genannten Kategorien durch die *beobachtete Übereinstimmung* und *Cohens Kappa  $\kappa$*  möglich (Kwiecien et al., 2011).

*Streudiagramme* und *Kontingenztafeln* dienen der Visualisierung der Testergebnisse (Weiß, 2013).

#### 4.3.1 Erklärung der angewandten statistischen Mittel

Die genannten statistischen Mittel sollen im Folgenden erklärt werden.

Die Häufigkeit und Häufigkeitsverteilung der Testergebnisse wurde mittels *Kontingenztafeln* dargestellt.

Um herauszufinden, ob eine neue Messmethode bezüglich einer medizinischen Variablen eingeführt werden kann, eignet sich zur Prüfung der Güte der neuen Messmethode der Vergleich mit einem etablierten Verfahren. Das Streudiagramm, das Bland-Altman-Diagramm und Cohens Kappa  $\kappa$  stellen deskriptive und grafische Methoden dar, die eine Analyse der Übereinstimmung erlauben, und werden unter dem Begriff *Konkordanzanalyse* zusammengefasst (Kwiecien et al., 2011).

Durch die Berechnung von *Cohens Kappa  $\kappa$*  kann die Übereinstimmung kategorialer Urteilsausprägungen quantitativ bewertet werden (Kwiecien et al., 2011). Erfolgt die Beurteilung eines Sachverhaltes durch 2 unterschiedliche Bewerter, spricht man von einem „interrater agreement“, bei der Beurteilung eines Sachverhaltes durch einen Bewerter, die wiederholt stattfindet, von „intrarater agreement“. Die *beobachtete Übereinstimmung* zeigt lediglich, welche Ergebnisse tatsächlich gleich sind. Cohens Kappa  $\kappa$  misst jedoch den Anteil der Übereinstimmungen korrigiert um den Anteil an zufällig übereinstimmenden Ergebnissen (vgl. Tabelle 11). Ergänzend wird das Konfidenzintervall zur Beurteilung der Präzision der Schätzung angegeben (Grouven et al., 2007).

Kappa kann zwischen 0 und 1 liegen. Während Kappa bei völliger Übereinstimmung einen Wert von 1 annimmt, bedeutet ein Wert von 0, dass lediglich eine zufällige Übereinstimmung vorliegt. Eine absolute Definition der Werte zwischen 0 und 1 ist nicht möglich. Es gibt jedoch Richtlinien, die die Interpretation erleichtern sollen (vgl. Tabelle 12) (Altman, 1991). Zur Feststellung der Übereinstimmung der Teste wurde eine Kappa-Analyse der kategorialen Ergebnisse durchgeführt. Die Analyse erfolgte zum einen zwischen dem ersten und zweiten Ansatz der Proben, dies entspricht der Übereinstimmung innerhalb eines Testes, zum anderen zwischen den beiden ELISA-Testen, dies gleicht der Übereinstimmung zwischen den beiden Testen.

**Tabelle 11: Berechnung von Cohens Kappa nach (Altman, 1991)**

$$\kappa = (p_0 - p_e) / (1 - p_e)$$

$P_0$  = Gemessener Übereinstimmungswert der beiden Schätzer;  $p_e$  = zufällig erwartete Übereinstimmungsrate

**Tabelle 12: Kategorisierung und Interpretation von Cohens Kappa nach (Altman, 1991)**

Wert von Cohens Kappa $\kappa$	Ausmaß der Übereinstimmung
< 0,20	Nicht ausreichend (poor)
0,21–0,40	Hinreichend (fair)
0,41–0,60	Moderat (moderate)
0,61–0,80	Gut (good)
0,81–1,00	Sehr gut (very good)

Das Streudiagramm, auch Punktwolke genannt, dient der grafischen Darstellung des Zusammenhangs von 2 Variablen mit stetiger Ausprägung. Jeder Punkt repräsentiert ein Messpaar, dessen Werte in einem zweiachsigen Diagramm auf der X- bzw. Y-Achse gegeneinander abgetragen werden (Coggon, 2007). Die Beziehung zwischen den Wertepaaren wird so visuell vermittelt (Kwiecien et al., 2011). Dicht beieinander liegenden Punkte des Streudiagramms signalisieren einen starken Zusammenhang (Weiß, 2013). Je höher die Übereinstimmung der Messwerte der ELISA-Teste, desto näher befinden sich die Punkte bei der Winkelhalbierenden (Kwiecien et al., 2011).

Weiterführend erfolgt die Berechnung des *Korrelationskoeffizienten*. Die Korrelation gibt an, inwieweit die Punkte des Streudiagramms auf bzw. wie nah sie an einer Geraden liegen und kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Dies stellt ein Maß für die Stärke eines Zusammenhangs zwischen bivariaten, stetigen Variablen dar. Ein negatives Vorzeichen bedeutet eine Annäherung der Punkte an eine Gerade, die von links oben nach rechts unten abfällt. Damit besteht ein gegensinniger Zusammenhang. Ein positiver Koeffizient bedeutet eine Anpassung der Werte an eine von links unten nach rechts oben ansteigende Gerade. Somit besteht ein gleichsinniger Zusammenhang. Liegt der Koeffizient nahe Null, lassen sich die Punkte an keine Gerade anpassen (Coggon, 2007). Ausgewählt wurde für diese Untersuchung der *Rangkorrelationskoeffizient  $r_s$  nach Spearman*. Dies ist ein nichtparametrisches Verfahren zur Feststellung der Stärke eines monotonen Zusammenhangs zwischen 2 Merkmalen (Coggon, 2007). Voraussetzung für die Berechnung des

Rangkorrelationskoeffizienten sind zumindest ordinal skalierte Werte. Ein linearer Zusammenhang ist nicht Bedingung. Verarbeitet werden den Werten zugeordnete Rangzahlen, sodass Ausreißer weniger ins Gewicht fallen (Zöfel, 2001).

Die *Bland-Altman-Analyse* erlaubt die quantitative Bewertung der Unterschiede in den absoluten Testergebnissen der beiden ELISA-Teste. Bei einem Bland-Altman-Diagramm werden die Mittelwerte der Messungen gegen die Differenzen der Messpaare abgetragen. Die horizontale Linie entspricht dem Mittelwert aller Differenzen, die gestrichelte Linie  $\pm 1,96 \times$  Standardabweichung (SD) (Kwiecien et al., 2011). Der Mittelwert aller Differenzen gibt an, ob eine Messmethode die systematische Tendenz zeigt, eher höhere oder niedrigere Ergebnisse als die zu vergleichende Messmethode zu erbringen. Ausgehend von der Annahme, dass die Differenzen normalverteilt sind, definiert der durch die  $1,96 \times$  Standardabweichung eingeschlossene Bereich die Grenzen, innerhalb derer sich 95 % der Differenzen befinden, und wird auch als Übereinstimmungsbereich, als „limits of agreement“ bezeichnet. Je weniger der Mittelwert der Differenzen von Null abweicht und je näher die Grenzen des Übereinstimmungsbereiches beieinander liegen, desto größer ist die Übereinstimmung der beiden Messmethoden. Die Güte der Übereinstimmung muss jedoch letztendlich im Hinblick auf die klinische Relevanz beurteilt werden (Bland and Altman, 1999). Wie groß der 95%-Übereinstimmungsbereich sein darf, sodass er noch als akzeptabel gelten kann, muss der Anwender für die jeweilige Beurteilung festlegen (Kwiecien et al., 2011).

Um die Streuung von Werten, welche nicht in der gleichen Einheit oder Größenordnung gemessen werden, zu normieren, bedient man sich des *Variationskoeffizienten*. Er stellt ein relatives Streuungsmaß dar und wird in Prozent angegeben. Man kann ihn als Streuung in Prozent vom Mittelwert interpretieren (Kohn und Öztürk, 2013).

#### 4.4 Klinische Befunde

Bei 42 Patientinnen lieferten die beiden untersuchten ELISA-Teste divergierende Ergebnisse. Exemplarisch wurden dann die Akten dieser Patientinnen untersucht, um aus der Synopse von klinischem Befund, Anamnese und Laborergebnissen eine Aussage bezüglich tatsächlichen Krankheitsstatus zu ermöglichen.

Unter Punkt 1.5 wurde beschrieben, welche Erkrankungen *C. trachomatis* hervorrufen kann und in Punkt 1.6, welcher Labormethoden man sich bedient, um eine urogenitale Infektion festzustellen. In der klinischen Infertilitätsdiagnostik kommt zudem der diagnostischen Laparoskopie mit Chromopertubation (DL+C) besondere Bedeutung zu. Hierbei wird eine blaue Farbstofflösung, z. B. Methylenblau, über einen Adapter in die Gebärmutterhöhle eingebracht.

Sind die Eileiter durchgängig, fließt die Farbstofflösung in die Bauchhöhle und wird dort sichtbar (Breckwoldt and Keck, 2008). Sie hat sich als zuverlässige Methode erwiesen, um eventuelle postentzündliche, pathologische Veränderungen am inneren Genitale und im kleinen Becken festzustellen und zu beurteilen (Fiddeler et al., 2005; Breckwoldt und Keck, 2008). Bei der Analyse der Patientenakten wurden zusammenschauend die Anamnese, Laborbefunde und klinische Befunde betrachtet und folgende Punkte zusammengetragen:

#### **Anamnese**

- Frühere Erkrankungen, die wegweisend für eine Chlamydieninfektion sein könnten: Zervizitis, Adnexitis, PID, chronischer Unterbauchschmerz oder eine Extrauterin gravidität (Crossman, 2006; RKI, 2010a)?

#### **Laborbefund**

- Positive Abstrich-PCR oder Urin-PCR (Guidance 2009)?
- Vorliegen eines positiven serologischen Befundes des Labors des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie (ZRA) des Universitätsklinikum Halle (Saale)?

#### **Klinische Befunde**

- Auffällige DL+C: darstellbare Adhäsionen, Strikturen und Vernarbungen im kleinen Becken, Sactosalpinx oder Adnexitis (Dieterle et al., 1998; Crossman, 2006; RKI, 2010a)?

## 5. Ergebnisse

216 Serumproben wurden in der Zeit vom 19.05.2011 bis 11.07.2012 in der Kinderwunschprechstunde des Universitätsklinikums Halle (Saale) gesammelt. Sie wurden mit dem Chlamydia trachomatis IgA- bzw. -IgG EIA der Firma ANI Labsystems Ltd. Oy, (CtANILab) und dem Chlamydia trachomatis-IgA- bzw. -IgG-ELISA plus der Firma medac GmbH (Ctmedac) auf das Vorhandensein von IgA- und IgG-Antikörpern getestet.

### 5.1. Häufigkeit und Häufigkeitsverteilung

#### 5.1.1 Ergebnisse des Ctmedac und des CtANILab

Jede Probe wurde im Ctmedac und CtANILab für die IgA- und IgG-Antikörper doppelt bestimmt. Aus dieser Doppelbestimmung wurden die Mittelwerte errechnet. Die Ergebnisse der beiden ELISA-Teste wurden entsprechend der Bewertungsintervalle (vgl. 4.2) „positiv“, „negativ“ und „grenzwertig“ in Tabelle 13 und Tabelle 14 zusammengefasst.

**Tabelle 13: Häufigkeit der Ergebnisse Ctmedac**

Test Ergebnis	IgA	IgG
<b>Positiv</b>	20 (9,3 %)	48 (22,2 %)
<b>Negativ</b>	186 (86,1 %)	159 (73,6 %)
<b>Grenzwertig</b>	10 (4,6 %)	9 (4,2 %)
<b>Total</b>	216 (100 %)	216 (100%)

**Tabelle 14: Häufigkeit der Ergebnisse CtANILab**

Test Ergebnis	IgA	IgG
<b>Positiv</b>	28 (13,0 %)	45 (20,8 %)
<b>Negativ</b>	176 (81,5 %)	158 (73,1 %)
<b>Grenzwertig</b>	12 (5,6 %)	13 (6,0 %)
<b>Total</b>	216 (100 %)	216 (100 %)

## 5.1.2 Gegenüberstellung in der Kontingenztafel

Tabelle 15: Häufigkeitsverteilung, IgA

		CtANILab IgA			
		positiv	negativ	grenzwertig	Total
Ctmedac IgA	positiv	17 (7,9 %)	2 (0,9 %)	1 (0,5 %)	20 (9,3 %)
	negativ	6 (2,8 %)	170 (78,7 %)	10 (4,6 %)	186 (86,1 %)
	grenzwertig	5 (2,3 %)	4 (1,9 %)	1 (0,5 %)	10 (4,6 %)
	Total	28 (13,0 %)	176 (81,5 %)	12 (5,6 %)	216 (100,0 %)

Der Gegenüberstellung in der Kontingenztafel ist zu entnehmen, dass die beiden Enzymimmunoassays in 188 Proben (87,0 %) für IgA ein übereinstimmendes Ergebnis zeigen. Dabei wird 1 Probe (0,5 %) übereinstimmend „grenzwertig“, 170 (78,7 %) übereinstimmend „negativ“ und 17 Proben (7,9 %) übereinstimmend „positiv“ getestet.

Bezogen auf Ctmedac, welcher 20 Proben positiv testet, stimmen 3 (15 %) Ergebnisse von CtANILab nicht damit überein bzw. von 28 von CtANILab als positiven getestete Proben stimmen 11 (39,2 %) von Ctmedac nicht überein.

Bezüglich der 186 negativ von Ctmedac getesteten Proben zeigt CtANILab in 16 (8,6 %) Fällen ein anderes Ergebnis. Umgekehrt stimmen 6 (3,4 %) Proben von Ctmedac nicht mit den 176 von CtANILab als negativ getestete Proben überein.

Fünf Proben, die vom CtANILab als „positiv“ bewertet werden, befundet der Ctmedac als „grenzwertig“. Weitere 6 vom CtANILab als „positiv“ bewertete Proben erscheinen im Ctmedac „negativ“. Vier Proben, die vom CtANILab als „negativ“ bewertet werden, erscheinen bei Ctmedac „grenzwertig“. Weitere 2 in CtANILab als „negativ“ bewertete Proben erscheinen in Ctmedac „positiv“. Eine Probe wird von CtANILab als „grenzwertig“ getestet und bei Ctmedac als „positiv“ befundet. Bei 10 Proben wird von Ctmedac kein spezifischer Antikörpernachweis erbracht, in CtANILab befindet sich das Messergebnis allerdings im „grenzwertigen“ Bereich.

Insgesamt bewertet der CtANILab 11 Proben „positiv“, in denen der Ctmedac lediglich „grenzwertige“ oder gar keine Antikörpertiter nachweisen kann. Zehn Proben befinden sich im CtANILab im „grenzwertigen“ Bereich, während der Ctmedac keine Antikörper nachweist. Umgekehrt sind im Ctmedac 3 Proben „positiv“, die im CtANILab als „negativ“ oder „grenzwertig“ bewertet werden, weiterhin 4 Proben „grenzwertig“, die im CtANILab als

„negativ“ bewertet werden. Von den 28 (13 %) im IgA abweichenden Proben werden von CtANILab also insgesamt 6 respektive 21 Proben, wenn man die Gegenüberstellung „negativ“ oder „positiv“ zu „grenzwertig“ beachtet, mit einem höheren Antikörpertiter gemessen. Umgekehrt werden vom Ctmedac 2 respektive 7 Proben mit einem im Vergleich höheren Titer gemessen.

**Tabelle 16: Häufigkeitsverteilung, IgG**

		CtANILab IgG			
		positiv	negativ	grenzwertig	Total
Ctmedac IgG	positiv	42 (19,4 %)	3 (1,4 %)	3 (1,4 %)	48 (22,2 %)
	negativ	2 (0,9 %)	152 (70,4 %)	5 (2,3 %)	159 (73,6 %)
	grenzwertig	1 (0,5 %)	3 (1,4 %)	5 (2,3 %)	9 (4,2 %)
	Total	45 (20,8 %)	158 (73,1 %)	13 (6,0%)	216 (100,0 %)

199 Proben (92,1 %) werden von beiden ELSIA-Testen übereinstimmend bewertet: jeweils gleichsam 5 Proben (2,3 %) „grenzwertig“, 152 Proben (70,4 %) „negativ“ und 42 Proben (19,4 %) „positiv.“

Bezogen auf Ctmedac, welcher 48 Proben positiv testet, stimmen 6 (12,5 %) Ergebnisse von CtANILab nicht damit überein bzw. von 45 von CtANILab als positiven getestete Proben stimmen 3 (6,7 %) von Ctmedac nicht überein.

Bezüglich der 159 negativ von Ctmedac getesteten Proben zeigt CtANILab in 7 (4,4 %) Proben ein anderes Ergebnis. Umgekehrt stimmen 6 (3,8 %) Proben von Ctmedac nicht mit den 158 von CtANILab als negativ getestete Proben überein.

Eine vom CtANILab als „positiv“ bewerte Probe erscheint im Ctmedac als „grenzwertig“. Zwei weitere im CtANILab als „positiv“ gemessene Proben werden im Ctmedac als „negativ“ bewertet. Von insgesamt 6 Proben, die vom CtANILab als „negativ“ befundet werden, erscheinen 3 im Ctmedac als „grenzwertig“ und weitere 3 als „positiv“. Fünf Proben, vom CtANILab als „grenzwertig“ gewertet, werden von Ctmedac als „negativ“ gemessen. Drei Weitere im CtANILab als „grenzwertig“ erscheinende Proben werden vom Ctmedac „positiv“ bewertet.

Insgesamt werden 3 Proben von CtANILab als „positiv“ befundet, die von Ctmedac als „negativ“ bzw. als „grenzwertig“ bewertet werden. Fünf Proben, in denen die Antikörperkonzentration als „grenzwertig“ bewertet wird, erschienen im Ctmedac „negativ“.

Umgekehrt erscheinen im Ctmedac 6 Proben „positiv“, die vom CtANILab „negativ“ oder „grenzwertig“ bewertet werden. Weitere 3 Proben werden als „grenzwertig“ bewertet, während sie im CtANILab „negativ“ befundet werden. Von den 17 (7,9 %) in IgG abweichenden Testergebnissen werden 2 respektive 8 Proben, bei Mitbeachtung der „grenzwertig“ bewerteten Proben, vom CtANILab mit einem höheren Antikörpertiter gemessen. Umgekehrt werden im Ctmedac 3 respektive 9 Proben mit einem im Vergleich höheren Titer gemessen.

## 5.2 Beobachtete Übereinstimmung (observed agreement) und Cohens Kappa $\kappa$

Tabelle 17: Beobachtete Intra- und Inter-Test-Übereinstimmung und Cohens Kappa  $\kappa$

		beobachtete Übereinstimmung			Kappa		
		%	95 % Konfidenzintervall		%	95 % Konfidenzintervall	
			Normal approx. untere Grenze	Normal approx. obere Grenze		Untere Grenze	Obere Grenze
Ctmedac	IgA 1./2.	96,3	93,8	98,8	85,1	75,6	94,6
	IgG 1./2.	97,7	95,7	99,7	94,2	89,3	99,1
CtANILab	IgA 1./2.	98,6	97,1	100,0	95,7	90,1	100,0
	IgG 1./2.	99,5	98,6	100,0	98,9	96,7	100,0
Ctmedac / CtANILab	IgA	87,0	82,6	91,5	54,3	40,9	67,7
	IgG	92,1	88,5	95,7	80,9	72,6	89,3

Ctmedac = Chlamydia trachomatis-IgA- bzw. -IgG-ELISA plus, medac; CtANILab = Chlamydia trachomatis IgA- bzw. -IgG EIA, ANI Labsystems; 1./2. = Gegenüberstellung des ersten und zweiten kategorialen Testergebnisses einer Probe

Gegenübergestellt wurden jeweils die kategorialen Ergebnisse des ersten und zweiten Probenansatzes für IgA und IgG eines ELISAs. Bewertet wurden die beobachtete Übereinstimmung sowie die zufallskorrigierte Übereinstimmung nach Cohens Kappa  $\kappa$ . Da jede Probe zweimal durch einen Enzymimmunoassay bewertet wurde, entspricht dies für Cohens Kappa  $\kappa$  dem „intraassay agreement“ (Übereinstimmung der Bewertung eines Beurteilers). Weiterhin wurden die kategorialen Testergebnisse von jeweils IgA und IgG der beiden

Enzymimmunoassays Ctmedac und CtANILab auf beobachtete und zufallskorrigierte Übereinstimmung überprüft. Da hier eine Probe von 2 verschiedenen Testen bewertet wurde, entspricht dies für Cohens Kappa  $\kappa$  dem „interassay agreement“ (Übereinstimmung unterschiedlicher Bewerter).

Für die Interpretation von Kappa wurde die von Altman vorgeschlagene Bewertungstabelle herangezogen (vgl. Tabelle 12).

Bei Ctmedac zeigen sich im Bereich der niedrigen Titer Abweichungen in insgesamt 13 Proben, welche eine Konsequenz für die kategoriale Zuordnung haben. Für IgA zeigen sich 4 Proben im Doppelansatz „grenzwertig“/„negativ“ und 4 Proben „grenzwertig“/„positiv“. Für IgG zeigt sich ebenso 1 Probe „grenzwertig“/„negativ“ und 3 Proben „grenzwertig“/„positiv“, sowie 1 Probe „positiv“/„negativ“.

Unterschiede im Doppelansatz von CtANILab, welche das kategoriale Testergebnis beeinflussen, zeigen sich hier in 4 Proben. In IgA zeigt 1 Probe eine Unterscheidung zwischen „grenzwertig“/„negativ“ auf und 2 Proben zwischen „grenzwertig“/„positiv“. Für IgG zeigt lediglich 1 Probe einen Unterschied zwischen „grenzwertig“/„positiv“ auf.

Betrachtet man nun die Übereinstimmung der Testergebnisse innerhalb einer Nachweismethode, zeigt sich für Ctmedac sowie für CtANILab eine nahezu vollständige beobachtete Übereinstimmung mit gering höheren Werten für CtANILab. Die nach Cohen korrigierte Übereinstimmung für die Testergebnisse von IgA des Ctmedac entspricht 85,1 % (95 % KI: 75,6–94,6), dies ist niedriger als die von CtANILab mit 95,7 % (95 % KI: 90,1–100,0). Beide Werte entsprechen jedoch nach Altman einer „sehr guten“ Übereinstimmung. Für IgG kann bei CtANILab mit 98,9 % (95 % KI: 96,7–100,0) und einem etwas niedrigeren Prozentsatz bei Ctmedac mit 94,2 % (95 % KI: 89,3–99,1) ebenfalls eine „sehr gute“ zufallskorrigierte Übereinstimmung des ersten und zweiten Probenansatzes festgestellt werden.

Die Gegenüberstellung von Ctmedac und CtANILab in den Testergebnissen von IgA zeigt eine zufallskorrigierte Übereinstimmung von 54,3 % (95 % KI: 40,9–67,7) und ist als „moderat“ zu bewerten. Die kategorialen Testergebnisse von IgG zeigen mit 80,9 % (95 % KI: 72,6–89,3) eine „gute“ Übereinstimmung.

Die dazugehörigen Kontingenztafeln befinden sich unter 9. Anlagen (vgl. Tabelle 24–Tabelle 29).

## 5.3 Streudiagramme und Korrelationskoeffizient

### 5.3.1 Korrelationskoeffizient

Der errechnete Rangkorrelationskoeffizient  $r_s$  nach Spearman beträgt bei Ctmedac 0,95 für IgA und 0,99 für IgG (vgl. Tabelle 18) bzw. bei CtANILab für IgA und IgG jeweils 0,99 (vgl. Tabelle 19). In der Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Teste beträgt die Rangkorrelationskoeffizient  $r_s$  nach Spearman 0,58 für IgA (vgl. Tabelle 20) und 0,71 für IgG (vgl. Tabelle 21).

**Tabelle 18: Rangkorrelation  $r_s$  nach Spearman für IgA und IgG, Ctmedac**

Korrelation			1. Ansatz IgA Ctmedac	2. Ansatz IgA Ctmedac	1. Ansatz IgG Ctmedac	2. Ansatz IgG Ctmedac
Rangkorrelation $r_s$ nach Spearman	1. Ansatz IgA Ctmedac	Correlation Coefficient	1,000	,954**		
		Sig. (2-tailed)	.	>0,001		
	N	216	216			
	2. Ansatz IgA Ctmedac	Correlation Coefficient	,954**	1,000		
	Sig. (2-tailed)	>0,001	.			
	N	216	216			
	1. Ansatz IgG Ctmedac	Correlation Coefficient			1,000	,992**
		Sig. (2-tailed)			.	>0,001
	N	216			216	
	2. Ansatz IgG Ctmedac	Correlation Coefficient			,992**	1,000
	Sig. (2-tailed)	>0,001	.			
	N	216	216			

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed) = Die Korrelation ist signifikant bei 0,01 (2-seitig);

Correlation Coefficient = Korrelationskoeffizient; Sig. (2-tailed) = Signifikanz (2-seitig), N = Anzahl der Fälle

Tabelle 19: Rangkorrelation  $r_s$  nach Spearman für IgA und IgG, CtANILab

Korrelation			1. Ansatz IgA CtANILab	2. Ansatz IgA CtANILab	1. Ansatz IgG CtANILab	2. Ansatz IgG CtANILab			
Rangkorrelation $r_s$ nach Spearman	1. Ansatz IgA CtANILab	Correlation Coefficient	1,000	,995**					
		Sig. (2-tailed)	.	>0,001					
		N	216	216					
	2. Ansatz IgA CtANILab	Correlation Coefficient	,995**	1,000					
		Sig. (2-tailed)	>0,001	.					
		N	216	216					
		1. Ansatz IgG CtANILab	Correlation Coefficient					1,000	,992**
			Sig. (2-tailed)					.	>0,001
N			216		216				
2. Ansatz IgG CtANILab		Correlation Coefficient	,992**		1,000				
	Sig. (2-tailed)	>0,001	.						
	N	216	216						

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed) = Die Korrelation ist signifikant bei 0,01 (2-seitig);

Correlation Coefficient = Korrelationskoeffizient; Sig. (2-tailed) = Signifikanz (2-seitig), N = Anzahl der Fälle

Tabelle 20: Rangkorrelation  $r_s$  nach Spearman, IgA, Ctmedac und CtANILab

Korrelation			Mittelwert 1./2. Ansatz IgA Ctmedac	Mittelwert 1./2. Ansatz IgA CtANILab
Rangkorrelation $r_s$ nach Spearman	Mittelwert 1./2. Ansatz IgA Ctmedac	Correlation Coefficient	1,000	,578**
		Sig. (2-tailed)	.	>0,001
		N	216	216
	Mittelwert 1./2. Ansatz IgA CtANILab	Correlation Coefficient	,578**	1,000
Sig. (2-tailed)		>0,001	.	
N		216	216	

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed) = Die Korrelation ist signifikant bei 0,01 (2-seitig);

Correlation Coefficient = Korrelationskoeffizient; Sig. (2-tailed) = Signifikanz (2-seitig), N = Anzahl der Fälle

**Tabelle 21: Rangkorrelation  $r_s$  nach Spearman, IgG Ctmedac und CtANILab**

Korrelation		Mittelwert 1./2. Ansatz IgG Ctmedac	Mittelwert 1./2. Ansatz IgG CtANILab
<b>Rangkorrelation <math>r_s</math> nach Spearman</b>	<b>Mittelwert 1./2. Ansatz IgG Ctmedac</b>	Correlation Coefficient	1,000
		Sig. (2-tailed)	.
		N	216
	<b>Mittelwert 1./2. Ansatz IgG CtANILab</b>	Correlation Coefficient	,714**
Sig. (2-tailed)		>0,001	
N		216	

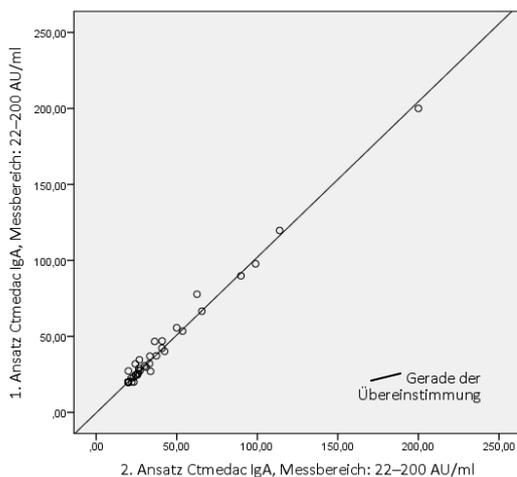
\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). = Die Korrelation ist signifikant bei 0,01 (2-seitig); Correlation Coefficient = Korrelationskoeffizient; Sig. (2-tailed) = Signifikanz (2-seitig), N = Anzahl der Fälle

### 5.3.2 Streudiagramme

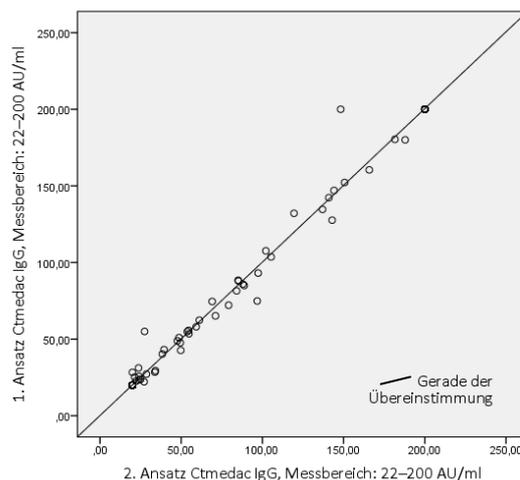
Die Abbildung 8 bis 11 stellen Streudiagramme der gegeneinander aufgetragenen Messergebnisse des ersten und zweiten Testansatzes einer Probe für IgA bzw. IgG dar. Die Punkte der Streudiagramme liegen weitestgehend auf oder nah an der Winkelhalbierenden und spiegeln so die gute Übereinstimmung der Messergebnisse innerhalb der jeweiligen Immunoassays wider. Analog der etwas besseren Werte für Kappa zeigen die Streudiagramme für den CtANILab eine dichtere Anordnung der Punkte auf als die Streudiagramme für Ctmedac. Deutlich zu erkennen sind mehrere „Ausreißer“ (= ausgeprägt unterschiedliche Ergebnisse im Doppelansatz) im Streudiagramm Ctmedac für IgG (vgl. Abbildung 9).

Die Werte des CtANILab werden ohne Einheit angegeben (vgl. 4.2). Gleiches gilt auch für die Bland-Altman-Diagramme.

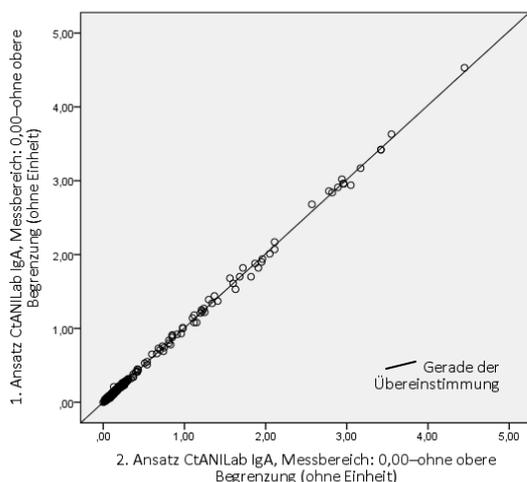
Die Abbildung 12 und Abbildung 13 stellen die Testergebnisse von Ctmedac und CtANILab jeweils für IgA und IgG gegenüber. Die weiterhin hier eingefügten horizontalen und vertikalen Linien entsprechen dem Schema der Kontingenztafel zur Berechnung des Wertes für Kappa und stellen eine visuelle Ergänzung zu den entsprechenden Kontingenztafeln dar.



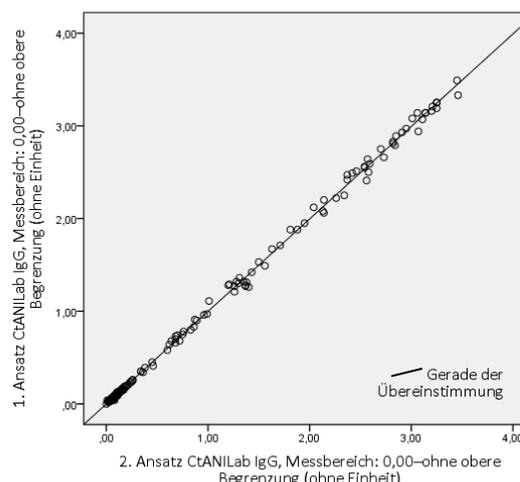
**Abbildung 8: Gegenüberstellung des ersten und zweiten Testergebnisses für IgA, Ctmedac**



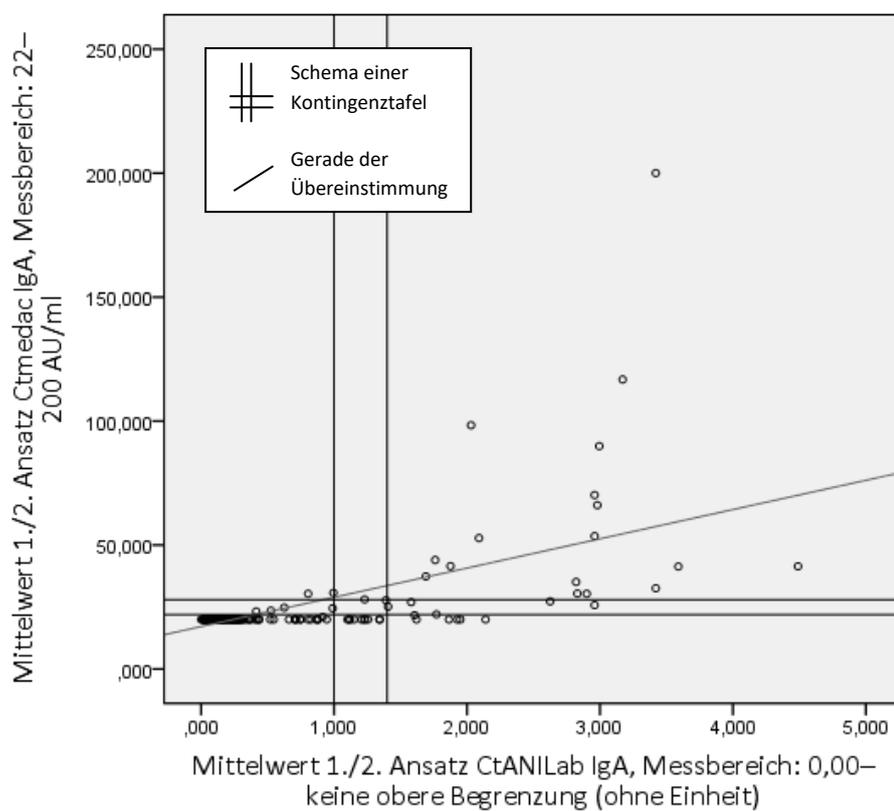
**Abbildung 9: Gegenüberstellung des ersten und zweiten Testergebnisses für IgG, Ctmedac**



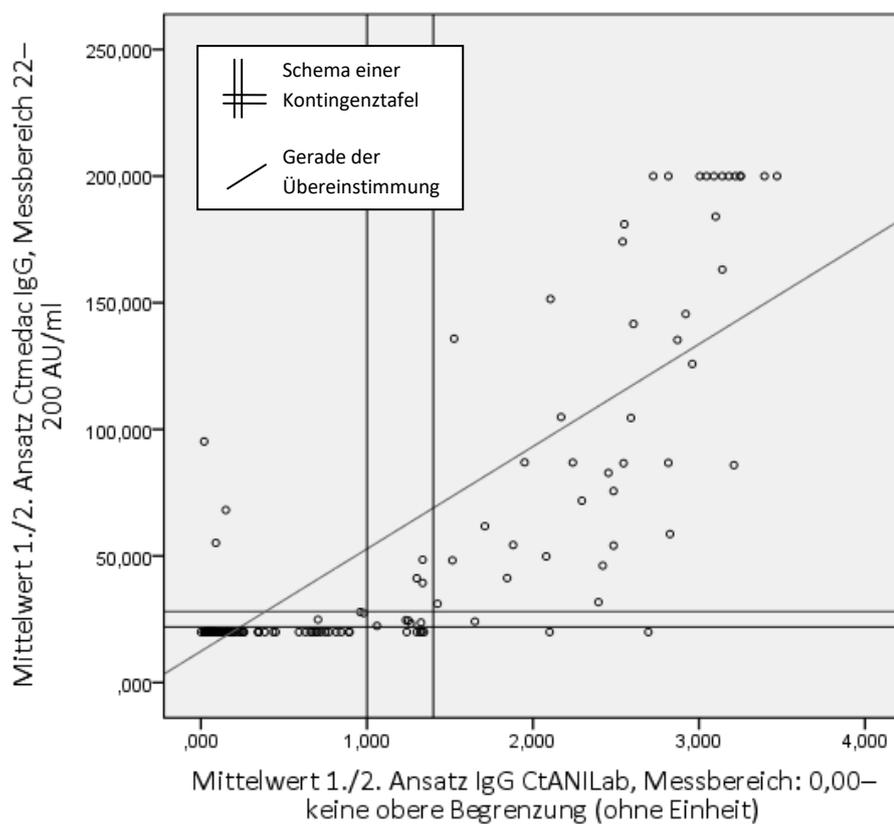
**Abbildung 10: Gegenüberstellung des ersten und zweiten Testergebnisses für IgA, CtANILab**



**Abbildung 11: Gegenüberstellung des ersten und zweiten Testergebnisses für IgG, CtANILab**



**Abbildung 12: Gegenüberstellung Testergebnisse IgA, Ctmedac und CtANILab**



**Abbildung 13: Gegenüberstellung Testergebnisse IgG, Ctmedac und CtANILab**

## 5.4 Bland-Altman-Diagramm

Die Bland-Altman-Diagramme beschreiben die Abweichung der metrischen Testdaten der Doppelbestimmungen für IgA und IgG von Ctmedac und CtANILab. Die mittlere Differenz liegt für Ctmedac in beiden Bland-Altman-Diagrammen nahezu bei 0 (vgl. Abbildung 14 und Abbildung 15). Es liegt also kein Hinweis auf eine systematische Abweichung zwischen den Messungen vor. Der Übereinstimmungsbereich liegt in den Grenzen  $[-3,26; +3,79]$  für die Messungen von IgA (vgl. Abbildung 14) und  $[-9,22; +9,56]$  für die Messungen von IgG (vgl. Abbildung 15).

Abbildung 16 und Abbildung 17 stellen die Testergebnisse bzw. deren mittlere Differenzen und die Mittelwerte des CtANILab gegenüber. Auch hier liegt die Mittelwertlinie der Differenzen für IgA und IgG erwartungsgemäß nahezu bei 0. Die Variationsbreite der mittleren Differenzen beträgt  $[-0,056; +0,063]$  für IgA (vgl. Abbildung 16) bzw.  $[-0,0701; +0,0665]$  für IgG (vgl. Abbildung 17).

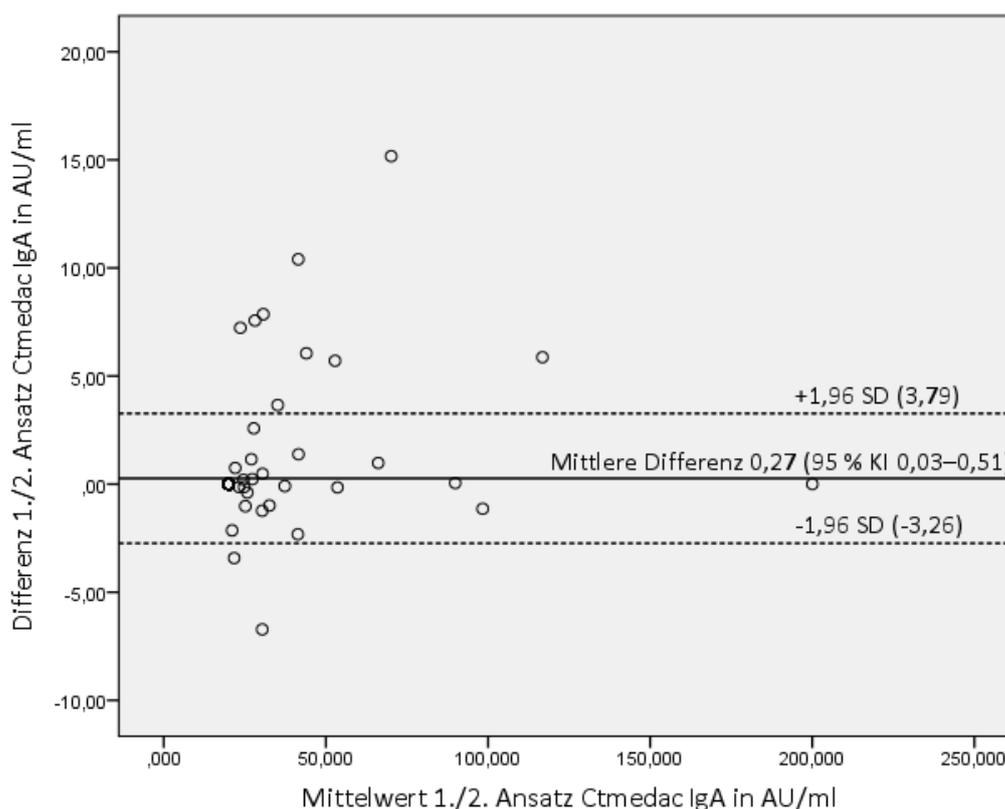


Abbildung 14: Bland-Altman-Diagramm, Ctmedac IgA

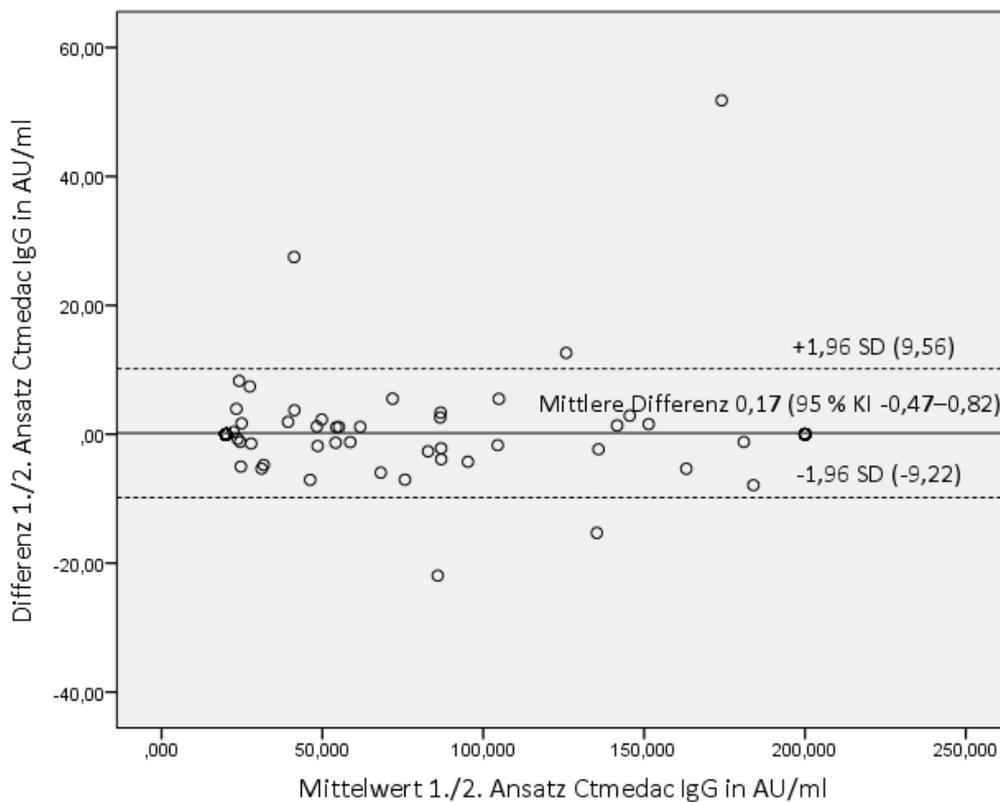


Abbildung 15: Bland-Altman-Diagramm, Ctmedac IgG

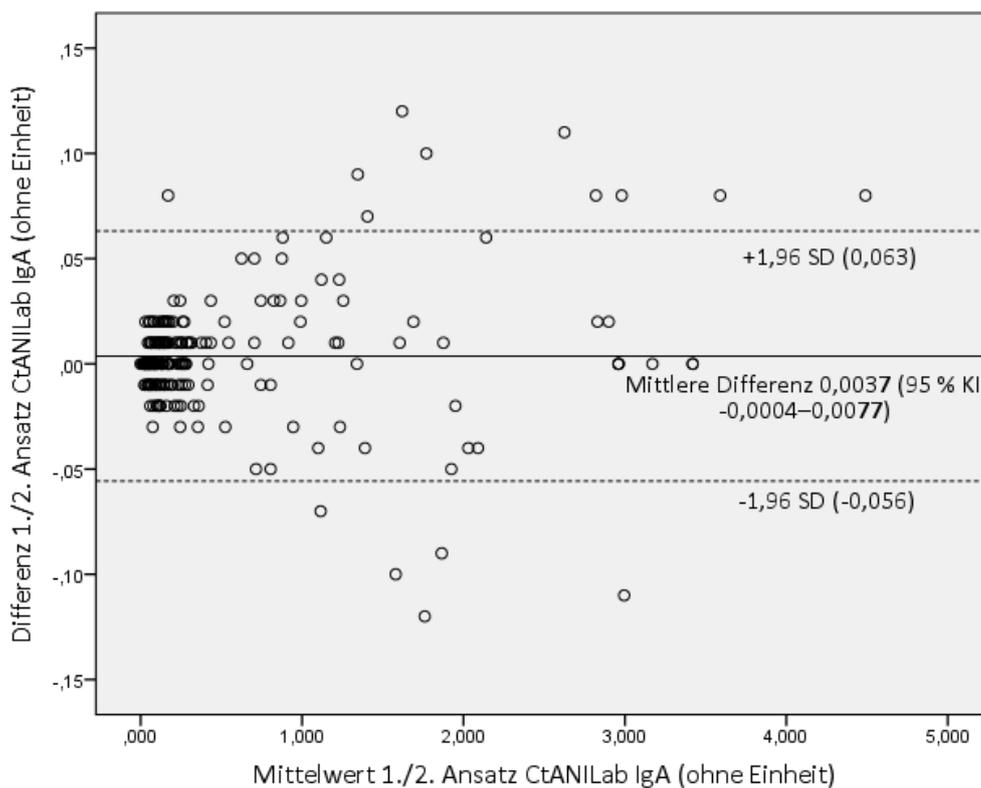
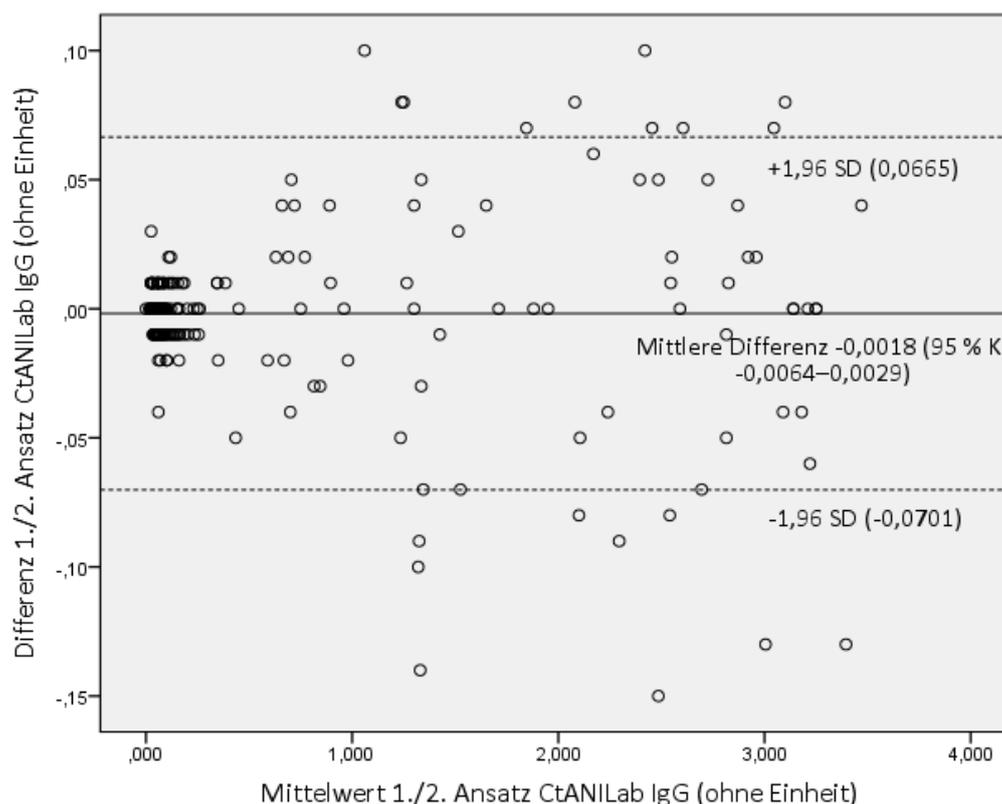


Abbildung 16: Bland-Altman-Diagramm, CtANILab IgA



**Abbildung 17: Bland-Altman-Diagramm, CtANILab IgG**

## 5.5 Analyse der Patientenakten

Abweichende Ergebnisse in den beiden untersuchten Testen weisen die Proben von 42 der insgesamt 216 Patientinnen auf. In jede dieser 42 Krankenakten wurde Einsicht genommen, um festzustellen, ob anhand der klinischen Befunde, der Anamnese und anderer Laborbefunde die Zuordnung zu einem definierten Krankheitsstatus gelingen kann.

14 Serumproben zeigen für die IgG-Bestimmung abweichende Ergebnisse, 25 für IgA und 3 sowohl für IgA als auch für IgG. Konträre Ergebnisse liegen für IgG bei 5 Proben vor in dem Sinne, dass ein Test „positiv“, der andere die Probe „negativ“ anzeigt. Drei dieser 5 Proben werden dabei von Ctmedac als „positiv“ befundet. Für die IgA-Antikörper befundet CtANILab von 8 Proben 6 als „positiv“, welche im Ctmedac „negativ“ sind. Die Abweichungen der restlichen Testergebnisse befinden sich in einem engen Bereich um den Grenzwert herum, sodass ein Test IgG- oder IgA-„positiv“ oder „negativ“, der andere Test den Antikörpertiter als „grenzwertig“ einstuft.

Folgende Tendenzen können dabei festgestellt werden:

Ein von gleichsam beiden ELISA-Testen erfasster erhöhter IgG-Titer ist in der überwiegenden Zahl der betrachteten Fälle von nachzuvollziehenden klinischen Befunden begleitet wie makroskopisch sichtbaren Veränderungen in der DL+C oder positiver Anamnese für Adnexitis,

PID oder chronischen Unterbauchschmerzen. Bei einem gleichsam negativen IgG-Titer können im überwiegenden Anteil der Fälle keine Symptome nachgewiesen werden. War nur in einem der beiden Teste der IgG Titer erhöht, liefert in einigen Fällen eine durchgeführte DL+C wichtige Hinweise auf das Vorliegen von Pathologien am inneren Genitale. Da jedoch nicht bei jeder betroffenen Patientin eine laparoskopische Untersuchung durchgeführt wurde, insgesamt ist bei 24 der 42 Patientinnen eine DL+C dokumentiert, konnte dieser Ansatz nicht einheitlich verfolgt werden und die eindeutige Zuordnung zu einem Krankheitsstatus gelang in vielen Fällen nicht.

### 5.5.1 Betrachtung der IgG-Titer der 42 Patientenakten bezüglich der Übereinstimmung des Testergebnisses und des klinischen Befundes

**Tabelle 22: Gegenüberstellung der IgG-Testergebnisse der 42 betrachteten Patientinnen**

			CtANILab IgG			
			positiv	negativ	grenzwertig	Total
Ctmedac IgG	positiv	Anzahl	14	3	3	20
	negativ	Anzahl	2	8	5	15
	grenzwertig	Anzahl	1	3	3	7
	<b>Total</b>	<b>Anzahl</b>	17	14	11	42

In 14 der 42 Proben ist der IgG-Titernachweis in beiden untersuchten Testen positiv. Dabei zeigen die Patientinnen bis auf 4 Ausnahmen entsprechende klinische Befunde, die auf eine Chlamydieninfektion hinweisen.

Bei 8 Patientinnen mit in beiden Testen negativem IgG-Nachweis, mit in IgA- „grenzwertig“ oder- „positiv“ erhöhten Antikörpertitern, können bei 2 Patientinnen hinweisende klinische Befunde erhoben werden. In diesen beiden Fällen ist der IgA-Titer im CtANILab erhöht.

Drei Proben werden in beiden Testen „grenzwertig“ getestet. Hier kann jedoch kein Hinweis auf eine Chlamydieninfektion eruiert werden.

Bei insgesamt 8 Proben werden 3 von CtANILab als „IgG-negativ“ und 5 als „IgG-grenzwertig“ bewertet, wobei Ctmedac jeweils das entgegengesetzte Ergebnis erbringt. In 2 Fällen liegen Hinweise auf eine Infektion vor, hierbei zeigt sich je einmal CtANILab und einmal Ctmedac „IgG-grenzwertig“.

Bei insgesamt 4 Proben werden 1 von CtANILab als „IgG-positiv“ und 3 als „IgG-grenzwertig“ bewertet, wo Ctmedac jeweils das entgegengesetzte Ergebnis erbringt. In 2 Fällen liegen Hinweise für eine durchgemachte Adnexitis vor. Es zeigen sich in diesen beiden Fällen je einmal CtANILab und Ctmedac „IgG-positiv“.

Von 5 Proben erscheinen im CtANILab 3 „IgG-negativ“ und 2 „IgG-positiv“ mit jeweils entgegengesetztem Ergebnis im Ctmedac. In lediglich einem dieser Fälle kann durch einen vormals positiven Abstrich eine Chlamydieninfektion festgestellt werden, hierbei ist Ctmedac „IgG-positiv“. In den anderen 4 Fällen kann auch auf Grund unvollständiger Diagnostik keine eindeutige Aussage getroffen werden.

### 5.5.2 Betrachtung der IgA-Titer der 42 Patientenakten bezüglich der Übereinstimmung des Testergebnisses und des klinischen Befundes

**Tabelle 23: Gegenüberstellung der IgA-Testergebnisse der 42 betrachteten Patientenakten**

			CtANILab IgA			
			positiv	negativ	grenzwertig	Total
Ctmedac IgA	positiv	Anzahl	1	2	1	4
	negativ	Anzahl	6	13	10	29
	grenzwertig	Anzahl	5	4	0	9
	Total	Anzahl	12	19	11	42

Es kann die deutliche Tendenz festgestellt werden, dass der IgA-Titer im CtANILab häufiger erhöht ist als im Ctmedac. Dies geht jedoch nicht regelhaft mit Vorliegen von akuten Symptomen oder klinischen Befunden einher.

In 23 der 42 Proben zeigt CtANILab einen erhöhten IgA-Titer, dabei sind 12 „positiv“ und 11 „grenzwertig“, wohingegen Ctmedac in 21 dieser Fälle einen niedrigeren oder negativen Titer angibt. In der Gegenuntersuchung zeigen 13 von 42 Proben im Ctmedac ein erhöhtes IgA, dabei sind 4 „positiv“ und 9 „grenzwertig“. In 7 dieser Fälle liegt kein oder ein niedrigerer Titer bei CtANILab vor.

Insgesamt liegt in 8 Fällen eine alleinige IgA-Titer-Erhöhung vor. Sechs dieser 8 Fälle betreffen CtANILab, hierbei sind 1 Probe „positiv“ und 5 „grenzwertig“. Bei 2 dieser von CtANILab detektierten Fälle wurde eine DL+C durchgeführt und es konnten Zeichen einer chronischen bzw. durchgemachten Chlamydieninfektion festgestellt werden. In den beiden von Ctmedac

mit einem „grenzwertig“ erhöhten IgA-Titer bewerteten Proben liegt ein negativer PCR-Abstrich vor.

Von 21 Patientinnen, die einen erhöhten IgG- sowie IgA-Titer aufwiesen, wurde bei 13 eine DL+C durchgeführt. Zusammenfassend betrachtet lagen hierbei bei 2 Patientinnen Hinweise auf eine aktive Infektion vor. In diesen beiden Fällen wird die IgA-Erhöhung durch CtANILab detektiert, bei Ctmedac ist indes in diesen Fällen nur IgG erhöht. Bei 5 weiteren Patientinnen sind in einer DL+C Befunde am inneren Genitale sichtbar, welche eher auf eine chronische oder durchgemachte Infektion hindeuten. CtANILab zeigt in diesen 5 Fällen die höheren IgA-Antikörpertiter, gleichwohl Ctmedac in 2 dieser Fälle ebenfalls einen erhöhten IgA-Titer aufweist. Bei 1 Patientin, bei welcher in der Vergangenheit ein positiver PCR-Abstrich vorlag, zeigt Ctmedac den höheren IgA-Titer.

## 6. Diskussion

Die vorliegende Untersuchung befasst sich mit der serologischen *C.-trachomatis*-Diagnostik. Im Zeitraum vom 19.05.2011 bis 11.07.2012 wurden dafür Serumproben von 216 Patientinnen in der Kinderwunschsprechstunde des ZRA des Universitätsklinikums Halle (Saale) gesammelt und ausgewertet. Die dabei erhobenen Daten und statistischen Auswertungen werden im Folgenden in einen wissenschaftlichen Zusammenhang gestellt.

### 6.1 Gegenüberstellung in der Kontingenztafel

In der Gegenüberstellung der kategorialen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass CtANILab die Tendenz hat, in abweichenden Testergebnissen für IgA häufiger höhere IgA-Titer zu messen. Von den 28 im IgA abweichenden Proben wurden von CtANILab insgesamt 6 respektive 21 Proben, wenn man die Gegenüberstellung „negativ“ bzw. „positiv“ zu „grenzwertig“ beachtet, mit einem höheren Antikörpertiter gemessen. Umgekehrt wurden vom Ctmedac 2 respektive 7 Proben mit einem im Vergleich höheren Titer gemessen. Die Ergebnisse für IgG zeigten eine ausgeglichene Verteilung der abweichenden Ergebnisse. Weiterführend wird diese Feststellung unter dem Punkt 6.6.2 diskutiert.

### 6.2 Beobachtete Übereinstimmung (observed agreement) und Cohens Kappa $\kappa$

Für die Reproduzierbarkeit der Teste innerhalb eines Testansatzes konnte bei der beobachteten Übereinstimmung und für Cohens Kappa  $\kappa$  für beide Teste eine „sehr gute“ Übereinstimmung festgestellt werden. Ctmedac zeigte jedoch mit Werten für Kappa von 85,1 % (95 % KI: 75,6–94,6) für IgA und 94,2 % (95 % KI: 89,3–99,1) für IgG niedrigere Werte als CtANILab mit IgA 95,7 % (95 % KI: 90,1–100,0) und IgG 98,9 % (95 % KI: 96,7–100,0). Die Übereinstimmung von Ctmedac und CtANILab für die IgA-Ergebnisse ist mit 54,3 % (95 % KI: 40,9–67,7) „moderat“. Die kategorialen Testergebnisse von IgG zeigen mit 80,9 % (95 % KI: 72,6–89,3) eine „gute“ Übereinstimmung.

Auffällig bei der Untersuchung des „intraassay-agreements“ war, dass es vor allem bei Ctmedac in einigen Fällen zu Abweichungen in den metrischen und abgeleitet davon auch in den kategorialen Ergebnissen kam. Diese Doppelansätze, 8 davon IgA betreffend, zeigten Messergebnisse im niedrigen Titerbereich. Weiterhin zeigten sich IgG betreffend wenige offensichtliche Ausreißer im hochpositiven Bereich, welche sich im Streudiagramm gut darstellten, letztendlich jedoch keine Konsequenz für das kategoriale Ergebnis haben.

Unterschiedliche Ergebnisse im niedrigen Titerbereich im Doppelansatz bei CtANILab, welche das kategoriale Testergebnis beeinflussen, zeigten sich hier in 4 Proben, 3 davon IgA betreffend. Ausreißer im hochpositiven Bereich, welche so auffallen wie bei Ctmedac, waren nicht zu verzeichnen.

Abgeleitet von diesen Ergebnissen zeigten beide Teste in den kategorialen Ergebnissen von IgG gegenüber IgA die bessere Intratest-Übereinstimmung. Insgesamt hatte CtANILab die bessere Intratest-Übereinstimmung gegenüber Ctmedac.

Die Intertest-Übereinstimmung der beiden Teste ist für IgG besser als für IgA. Eine bessere Übereinstimmung für IgA wäre wünschenswert gewesen. Da sich für IgA im CtANILab jedoch mehr positive Ergebnisse zeigen als im Ctmedac, überrascht diese lediglich moderate Übereinstimmung nicht. Die therapeutische Relevanz der Antikörperdiagnostik wird unter Punkt 6.6.1 diskutiert.

### 6.3 Streudiagramme und Korrelationskoeffizient

Die Abbildung 12 und Abbildung 13 stellen den positiven Zusammenhang zwischen den Testergebnissen von Ctmedac und CtANILab dar. Der Bereich, in dem die Ergebnisse für IgA und IgG angegeben werden, ist bei Ctmedac von 20,00–200,00 AU/ml begrenzt. Ergebnisse, die darunter oder darüber liegen, werden lediglich als „Unit-Wert <20,00 AU/ml“ bzw. „Unit-Wert >200,00 AU/ml“ aufgezeichnet (medac, 2008). CtANILab gibt die Ergebnisse ohne Einheit, in einem Bereich von 0,00–ohne obere Begrenzung an (ANILabsystems, 2009). Die Begrenzung des Messbereichs bei Ctmedac führt beim Gegeneinanderauftragen der Ergebnisse der beiden Teste im Streudiagramm, durch eine Vielzahl der entsprechenden Proben, zu einer Plateaubildung. Diese kann für IgA im unteren Diagrammbereich (vgl. Abbildung 12) und für IgG im unteren und oberen Diagrammbereich (vgl. Abbildung 13) beobachtet werden. Ein so gut ersichtlicher linearer Zusammenhang wie in den Abbildung 8 bis 11 kommt auf Grund dessen nicht zustande. Die Steigung einer gedachten Gerade mit der besten Anpassung an die Punkte im Streudiagramm wird dadurch abgeflacht.

In der Gegenüberstellung der Ergebnisse von Ctmedac und CtANILab beträgt der errechnete Rangkorrelationskoeffizient  $r_s$  nach Spearman für IgA 0,58 (vgl. Tabelle 20). In Anbetracht dessen, dass sich im unteren Diagrammbereich ein Plateau gebildet hat (vgl. Abbildung 12), stellt dies eine noch gute, jedoch nicht zufriedenstellende Korrelation der Werte dar. Auch in Abbildung 13 ist eine deutliche Plateaubildung im unteren, zudem auch im oberen Diagrammbereich zu erkennen. Der Wert der Rangkorrelation  $r_s$  für IgG beträgt dennoch 0,71 (vgl. Tabelle 21), ein der Rangkorrelation von IgA noch überlegenem Ergebnis. Die

Überlegenheit des Ergebnisses der Rangkorrelation von IgG in der Gegenüberstellung der Testergebnisse von Ctmedac und CtANILab entspricht dem ebenfalls für IgG besseren Kappa-Wert der Übereinstimmung der beiden Teste. Eine bessere Korrelation der Testergebnisse wäre allerdings auch für IgG wünschenswert gewesen.

Die errechneten Rangkorrelationen für den jeweils ersten und zweiten Ansatz der Teste zeigen eine nahezu vollständige positive Korrelation (vgl. Tabelle 18 und Tabelle 19). Hierbei zeigen sich die Rangkorrelationskoeffizienten ebenfalls analog zu der errechneten korrigierten Übereinstimmung nach Cohens Kappa  $\kappa$  mit einem geringfügig niedrigeren Wert für IgA Ctmedac.

## 6.4 Bland-Altman-Diagramm

In Ctmedac ist der Übereinstimmungsbereich mit  $[-3,26; 3,79]$  für die Messungen von IgA und  $[-9,22; +9,56]$  für die Messungen von IgG weit gefasst. Laut des Cut-Offs bei Ctmedac können 6 AU/ml mehr oder weniger gemessen entscheidend sein für ein positives oder negatives Testergebnis. Das heißt, die Ergebnisse für IgG können laut Bland-Altman-Analyse bei der Wiederholung des Testes so stark voneinander abweichen, dass dann ein z. B. positives Ergebnis negativ erscheint oder umgekehrt. Der Übereinstimmungsbereich für IgG ist demnach zu groß, um akzeptabel zu sein. Wie aber bereits beschrieben, treten stark voneinander abweichende Testergebnisse innerhalb des Testes lediglich in wenigen, hochpositiven Proben auf. Sie haben auf das kategoriale Endergebnis, die „positiv“ gemessene Probe, keinen Einfluss. Sehr wohl beeinflussen sie jedoch den Übereinstimmungsbereich im Bland-Altman-Diagramm. Dadurch scheint im Ctmedac IgG eine große Messabweichung vorzuliegen, welche aber nicht generell auf eine schlechte Reproduzierbarkeit hinweist.

Auch bei IgA zeigen sich in wenigen Proben auffällige Abweichungen im hochpositiven Bereich, welche auch hier das kategoriale Ergebnis nicht beeinflussen.

Im Bereich der niedrigen Titer zeigt der Ctmedac in 13 Fällen Abweichungen in den Testergebnissen, welche das kategoriale Ergebnis beeinflussen (vgl. Punkt 5.2). Praktisch kann dies bedeuten, dass eine fortführende Diagnostik bzw. Therapie fälschlicherweise unterlassen oder unnötigerweise fortgeführt wird. Um eine stattgehabte Erkrankung nicht zu übersehen bzw. unnötige Diagnostik zu vermeiden, soll ein grenzwertiges Ergebnis laut Empfehlungen innerhalb von 14 Tagen kontrolliert werden (medac, 2008). So wird ein potentiell positives Ergebnis eventuell doch erfasst bzw. der Ausschluss der Infektion erbracht.

Insgesamt betrachtet kann der Übereinstimmungsbereich von Ctmedac IgA akzeptiert werden. Der Übereinstimmungsbereich von IgG kann ebenfalls toleriert werden, da er am ehesten

durch die „Ausreißer“ im hohen Titerbereich zu begründen ist und Cohens Kappa  $\kappa$  zeigt, dass der Ctmedac IgG eine „sehr gute“ Übereinstimmung auch im Bereich niedriger Titer aufweist.

Die Bland-Altman-Diagramme für CtANILab zeigen mit [-0,056; +0,063] für IgA bzw. [-0,0701; +0,0665] für IgG eine eng gefasste Variationsbreite der mittleren Differenzen. Abweichungen von der mittleren Differenz, die in diesem Bereich liegen, können akzeptiert werden, da sie auch im Bereich niedriger Messwerte kaum ins Gewicht fallen. Es zeigten sich jedoch auch hier in 3 Proben bei IgA und 1 Probe bei IgG Abweichungen im niedrigen Titerbereich, welche das kategoriale Ergebnis beeinflussen. Auch hier gilt, dass durch ein Durchführen einer Kontrolluntersuchung 14 Tage später ein unsicheres Ergebnis bestätigt oder verworfen werden kann (medac, 2008).

## 6.5 Vergleich der eigenen mit den vom Hersteller angegebenen Daten

Laut Clad et al. braucht ein Test vor allem bei Patient(inn)en mit einem niedrigen Titer eine gute Reproduzierbarkeit, damit in wiederholten Testungen Ergebnisse nicht zwischen „negativ“ und „positiv“ schwanken (Clad et al., 2000).

Die vom Hersteller angegebene Reproduzierbarkeit innerhalb eines Testansatzes wird durch die Standardabweichung vom Mittelwert der Testergebnisse mit dazugehörigem Variationskoeffizient beschrieben. Für Ctmedac IgA beträgt sie 0,4 (Variationskoeffizient VK 9,5 %) im Bereich eher niedriger Testergebnissen bis 15,9 (VK 6,0 %) bei sehr hohen Testergebnissen (vgl. Tabelle 30). Bei IgG beträgt die Standardabweichung bei niedrigen Testergebnissen 0,3 (VK 6,3 %) bzw. 5,4 (VK 4,9 %) bei hohen Testergebnissen (vgl. Tabelle 32).

Für CtANILab zeigen sich vom Hersteller angegeben ähnliche Werte. Die Standardabweichung vom Mittelwert der Testergebnisse beträgt bei IgA 0,073 (VK 4,9 %) im Bereich niedriger Titer und 0,106 (VK 6,6 %) im Bereich hoher Titer (vgl. Tabelle 34), für IgG 0,048 (VK 4,8 %) im Bereich niedriger Titer und 0,098 (VK 5,8 %) im Bereich hoher Titer (vgl. Tabelle 35).

Die Standardabweichung nimmt also mit der Höhe der Messwerte zu. Dies wurde auch in dieser Untersuchung beobachtet.

Betrachtet man nun die Variationskoeffizienten, welche bei beiden Testen ähnlich sind, zeigt sich, dass sich die Angaben der Hersteller bezüglich der angegebenen Reproduzierbarkeit ihrer Teste kaum unterscheiden. In beiden Testen liegt eine gute Reproduzierbarkeit innerhalb eines Testansatzes vor. Die Intertestübereinstimmung der Testergebnisse ist ebenfalls gut (vgl. Tabelle 30, Tabelle 32, Tabelle 35, Tabelle 37).

Für Ctmedac IgA beträgt die vom Hersteller angegebene Sensitivität und Spezifität 97 %. Für IgG werden eine Sensitivität von 94 % und eine Spezifität von 97 % angegeben. Als Referenztest wurde der Chlamydia trachomatis-IgG-/IgA-pELISA medac verwendet (medac, 2008). ANI Labsystems ließ den eigenen Test in externen Studien evaluieren, welche die Sensitivität und Spezifität anhand von Patient(inn)engruppen mit bestätigter oder ausgeschlossener Infektion feststellten. Die Autoren schlussfolgerten, dass eine gute Sensitivität und Spezifität vorliegt, ohne diese jedoch zu beziffern (Verkooyen et al., 2002; ANILabsystems, 2009). Eine weitere Studie, welche auch CtANILab IgG mit einschloss, fand für IgG eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 96 % im Vergleich zu dem von den Autoren festgelegten Goldstandard (MIF), Daten zu IgA liegen nicht vor (Muvunyi et al., 2012).

In den genannten Studien zeigen also beide Teste eine gute Leistung. Dabei verwundert es, dass in dieser Untersuchung die Ergebnisse der Teste für IgA lediglich eine „moderate“ und die für IgG „gute“ Übereinstimmung nach Cohens Kappa  $\kappa$  zeigen. Hierbei muss beachtet werden, dass die Hersteller bzw. externen Studien jeweils ihren eigenen Referenztest bzw. Standard festlegten. Die hier festgestellten Ergebnisse im direkten Vergleich von Ctmedac und CtANILab miteinander sind daher nicht ausgeschlossen.

## 6.6 Analyse der Patientenakten

Die Entwicklung der Immunoassays ist so weit fortgeschritten, dass die verfügbaren Enzymimmunoassays zur Detektion von Antikörpern gegen *C. trachomatis* vergleichbar gute oder in einigen Fällen sogar bessere Ergebnisse erzielen als der MIFT, der bisherige „Goldstandard“ der serologischen Diagnostik (Morré et al., 2002; Bax et al., 2003; Baud et al., 2010; Muvunyi et al., 2012). Im Vergleich zum MIFT, bei welchem größtenteils ganze Elementarkörperchen aufgetragen werden, verwenden neue EIAs lediglich Antigen-Sequenzen des MOMP und erlauben so eine bessere Detektion speziesspezifischer Antikörper. Weiterhin können so Kreuzreaktionen vermieden werden (Black, 1997; Meyer, 2007). Der EIA stellt zudem ein standardisiertes, leichter durchzuführendes und preiswerteres Verfahren dar (Morré et al., 2002). In dieser Untersuchung wurde deshalb auf die Untersuchung der Patientinnenproben mit dem MIFT verzichtet.

Bei der Bearbeitung der festgelegten Fragestellung gilt es nun, die Frage der Relevanz der angewendeten diagnostischen Mittel bzw. auch deren Einschränkung zu betrachten, um daraus die Bedeutung der Ergebnisse richtig zu interpretieren.

## 6.6.1 Relevanz der Antikörperbestimmung bei Erkrankungen durch *C.*

### *trachomatis* für Screening und Infertilitätsdiagnostik

Die Bedeutung der serologischen Untersuchung ist immer wieder Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen. Insbesondere beschäftigt die Frage, inwieweit serologische Tests helfen können, im Rahmen einer gynäkologischen Untersuchung bzw. Infertilitätsdiagnostik eine Pathologie an den Tuben vorherzusagen. Einige Autoren gehen davon aus, dass die Bestimmung der IgG- bzw. der IgA-Antikörper akkurat die Wahrscheinlichkeit einer tubaren Schädigung vorhersagen kann (Mouton et al., 2002). Andere gehen davon aus, sie sei von geringem Wert in der Infertilitätsdiagnostik (Bax et al., 2003; Logan et al., 2003).

Die Resultate der serologischen Untersuchung bestimmen, welche weiteren Untersuchungen, wie z. B. die Hysterografie und die diagnostische Laparoskopie, vorgenommen werden (Fiddeleers et al., 2005). Da jeder operative Eingriff ein gewisses Risiko mit sich bringt, wäre es vorzuziehen, das Risiko für eine tubare Pathologie vor einer Laparoskopie einzuschätzen, sodass nur Patientinnen mit einem hohen Risiko dieser invasiven Untersuchung unterzogen werden. Um das Risiko einer Pathologie an den Tuben auf eine preiswerte und nicht invasive Art und Weise zu bewerten, wurde das Bestimmen der IgA- und IgG-Antikörper in die Infertilitätsdiagnostik mit aufgenommen (den Hartog et al., 2006).

Die Serologie kann einen direkten Erregernachweis durch eine Abstrich- oder Urin-PCR nicht ersetzen, doch gibt es Situationen, in denen ein verlässlicher serologischer Test helfen kann. Sie kommt z. B. zum Einsatz, wenn die Frau an einer Infektion des oberen Genitaltraktes leidet und der Erreger lokal (zervikal) nicht mehr nachgewiesen werden kann. Die Serologie wäre nun der einzige Hinweis auf eine Beteiligung von *C. trachomatis* (Muvunyi et al., 2012).

Um zu unterscheiden, ob eine Person schon jemals mit *C. trachomatis* infiziert war oder noch nie, werden speziesspezifische Tests mit einer hohen Sensitivität und guter Reproduzierbarkeit gewünscht. Relevant ist dies vor allem bei Patientinnen mit einem eher niedrigen Titer, da hier bei einer hohen Intra- oder Intertestvariabilität die Ergebnisse zwischen „negativ“ und „niedrig positiv“ variieren (Clad et al., 2000).

Eine hohe Spezifität mit einem hohen negativen Vorhersagewert wird im Hinblick auf die Vorhersagekraft eines serologischen Testes einer tubaren Pathologie gewünscht (Bax et al., 2003). Gleiches gilt für das Screening im Niedrig-Prävalenzbereich (Muvunyi et al., 2012).

Die Ergebnisse, die von verschiedenen Autoren betreffs der Exaktheit der Serologie, vor allem des IgG, im Voraussagen von tubarer Pathologie präsentiert werden, sind sehr unterschiedlich.

Das mag durch die unterschiedlichen serologischen Teste selbst, differierenden Cut-Off-Werten für positive Testergebnisse und unterschiedliche Referenzstandards für eine tubare Pathologie begründet sein (Land et al., 1998).

Voraussetzung für die richtige Interpretation der *C.-trachomatis*-Serologie ist das Verständnis der Kinetik der Antikörpertiter in einer infizierten Patientin. Komoda beschreibt in einer Studie zur Kinetik spezifischer *C.-trachomatis*-IgA- und IgG-Titer, dass eine singuläre IgA-Titer-Erhöhung auf eine Infektion im Frühstadium hinweisen kann. Bestätigt werden sollte dieses Ergebnis aus seiner Sicht jedoch zusätzlich durch eine PCR (Komoda, 2007).

Weiterhin wird vorgeschlagen, IgA als einen Marker für eine chronisch persistierende Infektion anzunehmen (Falck et al., 2002; Siemer et al., 2008). Der IgA- und IgG-Titer in Patientinnen mit einer chronisch persistierenden Infektion würde eine lange Zeit konstant bleiben, ohne abzunehmen (Komoda, 2007). Arsovic et al. berichteten ebenfalls von erhöhten IgA-Titern, zusätzlich zu erhöhten IgG-Titern, in der Gruppe chronisch persistent infizierter Patientinnen mit tubarer Infertilität (Arsovic et al., 2014). Mouton et al. beschrieben, dass die Bestimmung der IgA-Antikörper nutzbringender sei in der Serodiagnostik der tubaren Infertilität als die Bestimmung von IgG-Antikörpern und schlossen auch, dass diese mit einer akuten (chronischen) Infektion korreliert seien (Mouton et al., 2002).

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu anderen Studien, die IgA wenig bis gar keine diagnostische Relevanz beimessen. Verschiedene Untersuchungen legen nahe, dass auch nach einer erfolgten effektiven Therapie die IgA-Antikörper über Jahre persistieren können und aus diesem Grund mitnichten einen Marker für eine akute Infektion darstellen (Clad et al., 2000; Bax et al., 2003; Muvunyi et al., 2012).

Den Hartog et al. sprechen IgG im Vergleich zu IgA die überlegene Rolle als Indikator einer chronisch persistierenden Chlamydieninfektion bzw. einer tubaren Pathologie zu (Land et al., 1998; den Hartog et al., 2006). Dabei ist IgG jedoch mehr ein Marker einer durchgemachten Infektion, weniger Beweis einer persistenten Infektion oder ein spezifischer Hinweis auf eine Beschädigung der Tuben (den Hartog et al., 2006).

Die Hauptlimitation der serologischen Untersuchung ist also die Anzahl falsch positiver Ergebnisse bezüglich einer Pathologie an den Tuben (den Hartog et al., 2006). In dieser Untersuchung wurde bei 24 der 42 Patientinnen, deren Akten eingesehen wurden, eine DL+C durchgeführt. Hierbei konnten lediglich bei 10 Patientinnen Pathologien am inneren Genitale festgestellt werden, trotz erhöhter IgA- bzw. IgG-Antikörpertiter. Dies unterstützt, was den Hartog et al. schreiben: Ein positiver IgG-Titer kann im Rahmen einer chronischen Infektion vorliegen ohne eine nachweisbare Veränderung an den Tuben. IgG-Antikörper sind weiterhin

nicht für den Verlauf dieser Infektion oder das Ausmaß der Schädigung an den Adnexen repräsentativ. Ein weiterer bedeutsamer Grund für einen positiven IgG-Antikörpertiter ist eine durchlaufende Infektion, die eine dauerhafte Seronarbe hinterlässt. Die Bestimmung des IgG-Antikörpertiters kann also nicht zwischen einer durchgemachten oder fortbestehenden Infektion unterscheiden (den Hartog et al., 2006). Dem entspricht, was Muvunyi et al. in ihrer Studie feststellen konnten: es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der IgG-positiven Rate bei subfertilen Frauen mit und denen ohne tubare Pathologie (Muvunyi et al., 2012). Viele Frauen werden so unnötigerweise der DL+C unterzogen.

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass es schwierig bleibt einzuschätzen, ob das Vorliegen von IgA- und bzw. oder IgG-Antikörpern eine akute, chronische, abgeheilte oder persistente Infektion darstellt, da wenig darüber bekannt ist, wie lang spezifische Antikörper noch nach überstandener Infektion in Patientinnen vorliegen (Siemer et al., 2008). Bei 11 der 42 Patientinnen, deren Akten eingesehen wurden, konnte keiner der unter 4.4 beschriebenen Befunde erhoben werden, was jedoch nicht unbedingt heißt, dass sie keine Infektion durchgemacht haben. Clad et al. beschreiben, dass selbst nach erfolgter Behandlung sowohl IgA- als auch IgG-Antikörper über Jahre persistieren können. Dabei scheint die Persistenz der Antikörpertiter nicht von dem Vorhandensein von Antigenen abzuhängen, sondern eher von der Reaktivität des individuellen Immunsystems (Clad et al., 2000).

Angesichts der schwerwiegenden Folgen, die eine unbehandelte Infektion nach sich ziehen kann, sollte davon ausgegangen werden, dass sich der Patient oder die Patientin bei Vorliegen eines positiven IgG-Titers mit *C. trachomatis* infiziert hat. Es sollte demnach eine adäquate Therapie eingeleitet werden, wenn dies noch nicht geschehen ist. Weiterhin sollte eine DL+C bei unerfülltem Kinderwunsch erwogen werden, um eine mögliche Pathologie am inneren Genitale zu erkennen. Ist IgA singularär erhöht, empfiehlt sich zunächst ein Abstrich, um *C. trachomatis* eventuell noch lokal nachzuweisen und ebenfalls die Durchführung einer antibiotischen Therapie, um den Übergang in eine chronische Infektion zu verhindern.

### **6.6.2 Kann durch Auswertung der Patientenakten der Krankheitsstatus bestimmt werden und stimmen die Ergebnisse des einen Testes besser mit den Patientenakten überein?**

Die Auswertung der Krankengeschichte wurde durch praktische Probleme wie die z. T. unvollständige Patientenakte erschwert. Nicht bei jeder Patientin wurde ein Abstrich erstellt oder eine DL+C durchgeführt, da andere Gründe als eine durchgemachte Chlamydieninfektion für die Kinderlosigkeit eruiert werden konnten (z. B. PCO oder Endometriose), die Patientin

noch während der Zeit der Diagnosefindung schwanger wurde oder die Diagnostik auf Wunsch der Patientin hin abgebrochen wurde. Der Informationsgehalt der Patientenakten war demnach sehr unterschiedlich.

Die diagnostische Laparoskopie stellt ein wichtiges Hilfsmittel in der Diagnostik von Pathologien des kleinen Beckens dar (Lavy et al., 2004). Wie bereits erwähnt wurde sie bei 24 der 42 Patientinnen, deren Akten eingesehen wurden, durchgeführt. Die DL+C konnte in dieser Untersuchung in 8 Fällen, in denen ein bzw. beide Teste ein erhöhtes IgG und/oder IgA detektierten, zur Verifizierung einer chronischen bzw. durchgemachten Infektion beitragen, da deutliche Spuren einer Entzündung des kleinen Beckens vorlagen. In 2 Fällen zeigten sich Zeichen einer aktiven Infektion. Die DL+C wurde jedoch in anderen Fällen aus genannten Gründen nicht durchgeführt und fehlt daher als Entscheidungshilfe. Eine Einschränkung der DL+C sowie der Betrachtung der Krankengeschichte stellt der asymptomatische Verlauf bzw. die Restitutio ad Integrum einer *C.-trachomatis*-Infektion dar. Liegen keine Symptome oder klinischen Befunde vor, kann also trotzdem eine frühere oder gar aktive *C.-trachomatis*-Infektion nicht ausgeschlossen werden (Rahm et al., 1988; Logan et al., 2003; den Hartog et al., 2006). Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit der Grund, dass trotz erhöhter IgA und/oder IgG-Titer in 14 von 24 dokumentierten DL+C keine Pathologie am inneren Genitale festgestellt werden konnte.

Das letztendliche Hauptproblem einer Infektion mit *C. trachomatis* ist die tubare Infertilität. Dennoch ist die tubare Infertilität ein multifaktorielles Geschehen. Laut Rice und Schachter werden 20–25 % aller Fälle tubarer Infertilität nicht durch *C. trachomatis* verursacht (Rice and Schachter, 1991). Vom Vorliegen eines tubaren Verschlusses oder anderer Erkrankungen wie Adnexitis, Vernarbungen und Strikturen kann man also nicht pauschal auf eine Infektion mit Chlamydien schließen, hat man nicht andere Ursachen ausgeschlossen. Folglich kann die Krankengeschichte einer Patientin nicht als alleiniges Kriterium herangezogen werden, ob ein positiver bzw. negativer *C.-trachomatis*-Antikörpertiter „richtig“ oder „falsch“ ist. Auch andere Krankheitserreger wie *Neisseria gonorrhoeae* können eine Entzündung der inneren Geschlechtsorgane verursachen. Ohne weiterführende Diagnostik, das heißt ohne Bestimmung des verursachenden Keims, kann nicht zwischen einer durch *N. gonorrhoeae* oder *C. trachomatis* verursachten Infektion (z. B. Adnexitis) der inneren Geschlechtsorgane unterschieden werden (Breckwoldt und Keck, 2008). Informationen, ob die 42 Patientinnen, deren Krankenakte studiert wurde, auf das Vorliegen einer *N.-gonorrhoeae*-Infektion getestet wurden, liegen nicht vor.

Eine von Logan et al. 2003 durchgeführte Studie setzte sich das Ziel, herauszufinden, ob die Patientengeschichte, Pathologien im transvaginalen Ultraschall oder die *C.-trachomatis*-IgG-Antikörperbestimmung alleine oder in Kombination die Wahrscheinlichkeit einer Pathologie an den Eileitern voraussagen kann (Logan et al., 2003). Die Studie lieferte das Ergebnis, dass lediglich in 3 von 63 Frauen mit tubaren Pathologien, von insgesamt 207 untersuchten Frauen, die Kombination aus allen 3 Bezugspunkten vorlag. Jeder Punkt für sich allein genommen hatte lediglich eine Sensitivität von 67 % bezüglich der Vorhersagekraft einer tubaren Pathologie. Logan et al. betrachteten ihre Ergebnisse insgesamt als zu unzulänglich, um den 3 genannten Kriterien einzeln oder in Kombination eine signifikante Aussagekraft zu geben. Auch Muvunyi et al. konnten keinen Zusammenhang zwischen einem positiven IgG-Titer und dem Vorhandensein von Pathologien in der DL+C feststellen (Muvunyi et al., 2012). Wie unter 1.5 beschrieben, konnte auch in dieser Untersuchung festgestellt werden, dass die Laborbefunde nicht immer mit der Ausprägung der Symptome oder den Befunden übereinstimmen. Patientinnen wiesen durchaus eine positive Abstrich-PCR oder IgG-Titer auf ohne entsprechende klinische Befunde. Mitunter zeigten sich auch ausgeprägte klinische Befunde bzw. anamnestisch typische Erkrankungen, die auf eine durchlaufende oder aktive Chlamydieninfektion hinwiesen, jedoch mit einem nur grenzwertig nachweisbaren bzw. nicht vorhandenen Antikörpertiter begleitet wurden.

CtANILab zeigte, wie unter 5.5 beschrieben, mehr positive Ergebnisse für den Nachweis von IgA-Antikörpern. Es könnte sich um falsch positive Ergebnisse handeln. Es könnte jedoch auch daran liegen, dass der Cut-Off-Wert für IgA niedriger gewählt ist als bei Ctmedac und eine Erhöhung des IgA-Titers früher detektiert wird. Es wurde betrachtet, ob dies einen diagnostischen Vorteil darstellt oder nicht.

Clad et al. beschreiben in einer Follow-up-Studie die Antikörperkinetik mehrerer Patientinnen über 5 bis 7 Jahre und verfolgen diese Antikörperverläufe mit mehreren verschiedenen Testen. Es wurden mehrere ELISA-Teste, deren Antigenbeschichtung unter anderem auf LPS oder MOMP basierten, mit einem MIFT verglichen. Hierbei wurden Fälle aufgezeigt, bei denen nur im Chlamydia trachomatis EIA der Firma ANI Labsystems IgA positiv erschien, im MIFT und den anderen Testen jedoch negativ blieben. Insgesamt wurde der Chlamydia trachomatis EIA der Firma ANI Labsystems als der sensitivste Test für IgA-Antikörper bewertet (Clad et al., 2000). Clad et al. beschrieben weiterhin, dass erst nach einer Zeitverzögerung von einigen Wochen bis Monaten nach der Infektion eine Serokonversion stattfand. Dabei erfolgte, je nach untersuchtem Test, die IgG-Serokonversion früher oder zeitgleich zur IgA-Serokonversion. Nach einigen Wochen erreichen die Titer ein Maximum und persistieren über Jahre oder nahmen langsam ab. Clad et al. schlussfolgerten, dass das Vorliegen eines positiven Titers

lediglich zwischen einem Patienten unterscheiden kann, der jemals oder nie infiziert wurde (Clad et al., 2000).

Die gesammelten Daten zeigen, dass lediglich 2 der 21 Patientinnen, bei denen im Ctmedac und/oder CtANILab jeweils IgA und IgG erhöht waren, in der DL+C Zeichen einer akuten Infektion aufwiesen. Weitere 5 Patientinnen zeigten Befunde, die auf eine stattgehabte Infektion hinwiesen. Bei den 6 Fällen, in denen nur bei CtANILab alleinig das IgA erhöht war, konnten bei zweien laparoskopische Hinweise auf eine stattgehabte Infektion festgestellt werden. Die anderen 4 der genannten 6 Fälle zeigten keine der unter 4.4 Klinische Befunde aufgezählten Anzeichen einer Infektion. Dies könnte an einem asymptomatischen Verlauf oder einer frühen Phase der Infektion liegen bzw. auf das Vorliegen einer Seronarbe hinweisen. CtANILab zeigt in dieser Untersuchung im Vergleich zu Ctmedac mehr positive Ergebnisse für IgA. Ein diagnostischer Vorteil, bezogen auf die Vorhersagekraft eines klinischen Befundes, konnte jedoch nicht festgestellt werden. Da die Möglichkeit besteht, dass es sich um falsch positive Ergebnisse handelt, könnten Patient(inn)en mit einem singular erhöhten IgA-Titer unnötigerweise einer weiterführenden Diagnostik bzw. Therapie unterzogen werden.

Ließ sich für IgA die Tendenz zeigen, dass CtANILab häufiger einen erhöhten Titer aufweist und dieser im Vergleich zu Ctmedac höher bemessen wurde, ließ sich jedoch keine solche Tendenz für IgG feststellen.

Zusammenfassend gelang es in dieser Untersuchung nicht, die Gültigkeit der serologischen Ergebnisse bzw. die Zuordnung zu einem definitiven Krankheitsstatus anhand der Zusammenschau der Befunde festzulegen. Abgeleitet davon stimmt keiner der beiden Teste besser mit den Krankenakten überein. Eine zufriedenstellende Beantwortung der Fragen durch weitere Einsichtnahme in die Akten von Patientinnen mit übereinstimmendem Testergebnis ist nicht zu erwarten gewesen, daher wurde darauf verzichtet.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Untersuchung wurden 2 ELISA-Teste zur Chlamydiendiagnostik anhand verschiedener statistischer Mittel und klinischer Befunde von Patientinnen verglichen.

Insgesamt zeigten beide Teste in der beobachteten Übereinstimmung, Cohens Kappa  $\kappa$ , den Streudiagrammen und im Bland-Altman-Diagramm eine gute Übereinstimmung der jeweiligen Testergebnisse innerhalb eines Testes. Dies weist, in Übereinstimmung mit den vom Hersteller angegebenen Daten, auf eine gute Reproduzierbarkeit bzw. Intratestübereinstimmung hin.

In der beobachteten Übereinstimmung und Cohens Kappa  $\kappa$  zeigt sich in beiden Testen für IgG eine bessere Übereinstimmung der kategorialen Testergebnisse gegenüber IgA. CtANILab erzielt hierbei gegenüber Ctmedac insgesamt etwas bessere Ergebnisse. Die Rangkorrelationskoeffizienten  $r_s$  nach Spearman verhalten sich analog zu Cohens Kappa  $\kappa$ .

CtANILab zeigt im Vergleich zu Ctmedac mehr positive Ergebnisse in der IgA-Messung. Dies spiegelt sich in der nach Cohens Kappa  $\kappa$  lediglich „moderaten“ Übereinstimmung und der niedrigen Rangkorrelation  $r_s$  nach Spearman der beiden Teste im IgA wider. Für IgG liegt eine bessere Übereinstimmung der beiden Teste vor.

Im Streudiagramm fallen vor allem bei Ctmedac im hochpositiven Bereich einige stark voneinander divergierende Testergebnisse auf, welche das kategoriale Ergebnis an sich nicht beeinflussen. Im Bland-Altman-Diagramm spiegeln sich diese „Abweichungen“ jedoch in einem weit gefassten Übereinstimmungsbereich, (limits of agreement), der Ergebnisse wider. Dies impliziert eine schlechte Reproduzierbarkeit des Testes vor allem für IgG. Starke Abweichungen im Bereich niedriger Titer blieben aber aus. Bei CtANILab lagen die Grenzen des Übereinstimmungsbereichs im Bland-Altman-Diagramm nah beieinander.

Die vom Hersteller angegebenen Daten zeigen, dass beide Teste die Tendenz haben, im Bereich hoher Titer eine höhere Standardabweichung der Ergebnismittelwerte aufzuweisen als im Bereich niedriger Titer. Beide Teste sind sich dabei in den Variationskoeffizienten ähnlich. Damit bestätigen die Ergebnisse dieser Untersuchung eine bereits bekannte Tendenz.

Im Vergleich der beiden Teste miteinander bestand in der Darstellung der Ergebnisse im Streudiagramm für IgA im unteren und für IgG im oberen und unteren Bereich eine Plateaubildung, hervorgerufen durch den begrenzt angegebenen Messbereich von Ctmedac. Der Rangkorrelationskoeffizient  $r_s$  nach Spearman zeigt im Vergleich der Teste miteinander ein nicht zufriedenstellendes Ergebnis. Eine bessere Korrelation vor allem bezüglich IgA wäre wünschenswert gewesen. Die Korrelation der Ergebnisse von IgG ist dabei analog der besseren

Übereinstimmung nach Cohens Kappa  $\kappa$  leicht überlegen. Die errechneten Rangkorrelationen für den jeweils ersten und zweiten Ansatz der Teste verhalten sich ebenfalls analog zu der korrigierten Übereinstimmung nach Cohen mit einem geringfügig niedrigeren Wert für IgA Ctmedac.

Die Untersuchung der Patientenakten zeigt, dass bei divergierenden Testergebnissen anhand der klinischen Befunde keine eindeutige Zuordnung zu einem Krankheitsstatus gelingt bzw. keine der beiden Teste die Tendenz zeigt, besser mit den dokumentierten Befunden übereinzustimmen. Dies liegt zum einem an dem unterschiedlichen Informationsgehalt der Krankenakte an sich, zum anderen am natürlichen Verlauf der Chlamydienerkrankung, die in vielen Fällen keine klinisch sichtbaren Spuren hinterlässt. CtANILab zeigte in der Untersuchung des IgA mehr positive Ergebnisse als Ctmedac, es lässt sich jedoch nach Studie der Patientenakten daraus kein diagnostischer Vorteil bezogen auf die Vorhersagekraft eines klinischen Befundes ableiten.

Beide Teste zeigen in sich eine gute, im Vergleich miteinander jedoch vor allem für IgA eine ungenügende Übereinstimmung der Ergebnisse. CtANILab ist daher für das Labor für Virologie/Serologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Chlamydiendiagnostik keine Alternative zum Ctmedac. Aus der Untersuchung und Auswertung von Patientenakten kann nicht auf den aktuell vorliegenden Infektionsstatus mit *C. trachomatis* geschlossen werden. Weitere prospektiv randomisierte Studien sind vonnöten, um in der Infertilitätsdiagnostik valide Daten zum aktuell vorliegenden Infektionsstatus und Krankheitsverlauf der untersuchten Patientinnen zu erheben.

## 8. Literaturverzeichnis

- Altman DG: Practical statistics for medical research. 1st edn. London, Chapman & Hall, 1991, pp. 403–409.
- ANILabsystems (Hrsg): Gebrauchsanleitung: Chlamydia trachomatis IgA EIA und Chlamydia trachomatis IgG EIA. Vantaa, Ausgabedatum 12.10.2009, 2009.
- Arsovic A, Nikolov A, Sazdanovic P, Popovic S, Baskic D. Prevalence and diagnostic significance of specific IgA and anti-heat shock protein 60 Chlamydia trachomatis antibodies in subfertile women. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2014;**33**:761–766.
- Baron EJ: Classification. In: Baron S (ed.) *Medical microbiology: General concepts study guide*. 4th edn. Galveston, Tex.: Univ. of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. (via ncbi bookshelf).
- Baud D, Regan L, Greub G. Comparison of five commercial serological tests for the detection of anti-Chlamydia trachomatis antibodies. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2010;**29**:669–675.
- Bax CJ, Mutsaers, J A E M, Jansen CL, Trimbos JB, Dorr PJ, Oostvogel PM. Comparison of serological assays for detection of Chlamydia trachomatis antibodies in different groups of obstetrical and gynecological patients. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2003;**10**:174–176.
- Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. *Clinical microbiology reviews* 1997;**10**:160–184.
- Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical methods in medical research* 1999;**8**:135–160.
- Breckwoldt M, Keck C: Störungen der Fruchtbarkeit. In: Breckwoldt M, Kaufmann M, Pfeleiderer A (Hrsg): *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 5. Aufl. Stuttgart, Thieme, 2008, S. 84–100.
- Brzank M, Wollenhaupt J. Infection-induced reactive arthritis: Etiopathogenesis, clinical spectrum, therapy. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2013;**72**:977–985.
- Bush RM, Everett KD. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2001;**51**:203–220.
- Caldwell HD, Schachter J. Antigenic analysis of the major outer membrane protein of Chlamydia spp. *Infection and immunity* 1982;**35**:1024–1031.
- CDC. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010. Retrieved 20 October 2016. from <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5912a1.htm>, 2010.

- 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. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2000;**19**:932–937.
- Coggon D. *Statistik: Einführung für Gesundheitsberufe*, 1. Aufl. Bern, Huber, 2007, S. 1–128.
- Crossman SH. The challenge of pelvic inflammatory disease. *American family physician* 2006;**73**:859–864.
- Dean D, Suchland RJ, Stamm WE. Evidence for long-term cervical persistence of *Chlamydia trachomatis* by omp1 genotyping. *The Journal of infectious diseases* 2000;**182**:909–916.
- den Hartog JE, Morr  SA, Land JA. *Chlamydia trachomatis*-associated tubal factor subfertility: Immunogenetic aspects and serological screening. *Human reproduction update* 2006;**12**:719–730.
- Dieterle S, Rummel C, Bader LW, Petersen H, Fenner T. Presence of the major outer-membrane protein of *Chlamydia trachomatis* in patients with chronic salpingitis and salpingitis isthmica nodosa with tubal occlusion. *Fertility and sterility* 1998;**70**:774–776.
- Dudareva-Vizule S, Haar K, Sailer A, Hamouda O, Bremer V. Begleitevaluation zum Chlamydien-Screening in Deutschland, Endbericht, *Chlamydia trachomatis*-Laborsentinel. Retrieved 20 September 2016. from [http://www.rki.de/SiteGlobals/Forms/Suche/serviceSucheForm.html?nn=2375194&resourceId=2390936&input\\_=2375194&pageLocale=de&searchEngineQueryString=Endbericht&submit.x=0&submit.y=0](http://www.rki.de/SiteGlobals/Forms/Suche/serviceSucheForm.html?nn=2375194&resourceId=2390936&input_=2375194&pageLocale=de&searchEngineQueryString=Endbericht&submit.x=0&submit.y=0), 2013.
- ECDC. *Chlamydia control in Europe*. Retrieved 13 September 2016. from [https://www.researchgate.net/profile/Udo\\_Reischl/publication/230599685\\_Chlamydia\\_trachomatis\\_prevalence\\_genotype\\_distribution\\_and\\_identification\\_of\\_the\\_new\\_Swedish\\_variant\\_in\\_Southern\\_Germany/links/5602e7eb08ae4accfb87e4e.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Udo_Reischl/publication/230599685_Chlamydia_trachomatis_prevalence_genotype_distribution_and_identification_of_the_new_Swedish_variant_in_Southern_Germany/links/5602e7eb08ae4accfb87e4e.pdf), 2009b.
- ECDC. Factsheet for health professionals: *Chlamydia* infections (genital). Retrieved 14 September 2016. from <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/chlamydia/factsheet-health-professionals/pages/factsheet-health-professionals.aspx>, 2009a.
- Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International journal of systematic bacteriology* 1999;**49 Pt 2**:415–440.

- Falck G, Gnarp J, Hansson L-O, Svardsudd K, Gnarp H. Comparison of individuals with and without specific IgA antibodies to *Chlamydia pneumoniae*: respiratory morbidity and the metabolic syndrome. *Chest* 2002;**122**:1587–1593.
- Farlex Partner Medical Dictionary. search for: "serotype". Retrieved 10 May 2018. from <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/serovar>, 2012.
- Fidellers AAA, Land JA, Voss G, Kessels AGH, Severens JL. Cost-effectiveness of *Chlamydia* antibody tests in subfertile women. *Human reproduction (Oxford, England)* 2005;**20**:425–432.
- Findlay HE, McClafferty H, Ashley RH. Surface expression, single-channel analysis and membrane topology of recombinant *Chlamydia trachomatis* Major Outer Membrane Protein. *BMC microbiology* 2005;**5**:5.
- Forsbach-Birk V, Simnacher U, Pfrepper K, 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. *Clinical Microbiology and Infection* 2010;**16**:1237–1244.
- Friis RR. Interaction of L cells and *Chlamydia psittaci*: entry of the parasite and host responses to its development. *Journal of bacteriology* 1972;**110**:706–721.
- Gemeinsamer Bundesausschuss. Tragende Gründe zum Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Richtlinien zur Empfängnisregelung und zum Schwangerschaftsabbruch sowie der Mutterschafts-Richtlinien: Screening auf genitale *Chlamydia trachomatis* Infektionen bei Frauen. Retrieved 14 September 2016. from [https://www.g-ba.de/downloads/40-268-430/2007\\_09\\_13-Empfaengnis-Chlamydient\\_TrGr.pdf](https://www.g-ba.de/downloads/40-268-430/2007_09_13-Empfaengnis-Chlamydient_TrGr.pdf), 2007.
- 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**:2021–2025.
- Grouven U, Bender R, Ziegler A, Lange S. Der Kappa-Koeffizient. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2007;**132**:e65-e68.
- Gjuvsland AB, Vik JO, Beard DA, Hunter PJ, Omholt SW. Bridging the genotype-phenotype gap: what does it take? *The Journal of physiology* 2013;**591**:2055–2066.
- Harris SR, Clarke IN, Seth-Smith HMB, Solomon AW, Cutcliffe LT, Marsh P, Skilton RJ, Holland MJ, Mabey D, Peeling RW, et al. Whole-genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nature genetics* 2012;**44**:413-9, S1.

- Hof H: Chlamydiaceae. In: Bob A, Bob K (Hrsg): Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie: Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Immunologie, klinische Infektiologie, Hygiene. 5. Aufl. Stuttgart, Thieme, 2014, S. 446–451.
- Hogan RJ, Mathews SA, Mukhopadhyay S, Summersgill JT, Timms P. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infection and immunity* 2004;**72**:1843–1855.
- Hughes G, Alexander S, Simms I, Conti S, Ward H, Powers C, Ison C, Evans B, Fenton K, Jebbari H. Lymphogranuloma venereum diagnoses among men who have sex with men in the UK: interpreting a cross-sectional study using an epidemic phase-specific framework. *Sexually transmitted infections* 2013;**89**:542–547.
- Hybiske K, Stephens RS. Mechanisms of *Chlamydia trachomatis* entry into nonphagocytic cells. *Infection and immunity* 2007;**75**:3925–3934.
- Kaleta EF, Taday EMA. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian pathology journal of the W.V.P.A* 2003;**32**:435–461.
- Keck PCD, Clad A. Infektionen in der Reproduktionsmedizin. *Der Gynäkologe* 2004;**37**:607–620.
- Klos A: Chlamydien. In: Hahn H, Kaufmann SH, Schulz TF, Suerbaum S (Hrsg): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 6. Aufl. Heidelberg, Springer, 2009, S. 416–426.
- Kohn W, Öztürk R: Statistik für Ökonomen: Datenanalyse mit R und SPSS. 2. Aufl. Berlin Heidelberg, Springer Gabler, 2013, S. 70–72.
- Komoda T. Kinetic study of antibodies (IgG, IgA) to *Chlamydia trachomatis*: importance of IgA antibody in screening test for *C. trachomatis* infection by peptide-based enzyme immunosorbent assay. *Japanese journal of infectious diseases* 2007;**60**:347–351.
- Kwiecien R, Kopp-Schneider A, Blettner M. Teil 16 der Serie zur Bewertung wissenschaftlicher Publikationen: Konkordanzanalyse. *Dtsch Arztebl* 2011;**108**:515–521.
- Laing S, Hernandez-Santana A, Sassmannshausen J, Asquith DL, McInnes IB, Faulds K, Graham D. Quantitative detection of human tumor necrosis factor alpha by a resonance raman enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytical chemistry* 2011;**83**:297–302.
- Land JA, Evers JL, Goossens VJ. How to use *Chlamydia* antibody testing in subfertility patients. *Human reproduction (Oxford, England)* 1998;**13**:1094–1098.
- Lanjouw E, Ossewaarde JM, Stary A, Boag F, van der Meijden, W I. 2010 European guideline for the management of *Chlamydia trachomatis* infections. *International journal of STD & AIDS* 2010;**21**:729–737.
- Lavy Y, Lev-Sagie A, Holtzer H, Revel A, Hurwitz A. Should laparoscopy be a mandatory component of the infertility evaluation in infertile women with normal hysterosalpingogram or suspected unilateral distal tubal pathology? *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2004;**114**:64–68.

- Lister NA, Tabrizi SN, Fairley CK, Garland S. Validation of roche COBAS Amplicor assay for detection of *Chlamydia trachomatis* in rectal and pharyngeal specimens by an omp1 PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;**42**:239–241.
- Logan S, Gazvani R, McKenzie H, Templeton A, Bhattacharya S. Can history, ultrasound, or ELISA chlamydial antibodies, alone or in combination, predict tubal factor infertility in subfertile women? *Human reproduction (Oxford, England)* 2003;**18**:2350–2356.
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D: *Der Experimentator: Immunologie*. 3. Aufl. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 2009, S.107–119.
- Madigan MT, Martinko JM: *Brock Mikrobiologie*. 11. Aufl. München, Pearson Studium, 2006, S.286-287, 449-452, 888-930 und 1172.
- medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH (Hrsg): *Gebrauchsanleitung: Chlamydia trachomatis-IgA-ELISA plus medac und Chlamydia trachomatis-IgG-ELISA plus medac*. Wedel, Ausgabedatum 01.07.2008, 2008.
- Meyer T. Modern diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 2007;**58**:24–30.
- Meyer T. Neues zur Chlamydien Diagnostik. Vortrag: 58. Jahrestagung der deutschen STD-Gesellschaft 17.-19. September 2009 Bochum. Retrieved 20 October 2016. from <http://dstig.de/kongresse/2009-bochum.html>, 2009.
- Morré SA, Munk C, Persson K, Kruger-Kjaer S, van Dijk R, Meijer, Chris J L M, van Den Brule, Adriaan J C. Comparison of three commercially available peptide-based immunoglobulin G (IgG) and IgA assays to microimmunofluorescence assay for detection of *Chlamydia trachomatis* antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;**40**:584–587.
- Morré SA, Ossewaarde JM, Lan J, van Doornum GJJ, Walboomers JMM, MaLaren DM, Meijer CJ, van den Brule, Adriaan JC. Serotyping and Genotyping of Genital *Chlamydia trachomatis* Isolates Reveal Variants of Serovars Ba, G, and J as Confirmed by omp1 Nucleotide Sequence Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;**36**:345–351.
- Moulder JW. Characteristics of chlamydiae. *Microbiology of Chlamydia* 1988;**1**:3–19.
- Moulder JW. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiological reviews* 1991;**55**:143–190.
- Mouton JW, Peeters MF, van Rijssort-Vos JH, Verkooyen RP. Tubal factor pathology caused by *Chlamydia trachomatis*: the role of serology. *International journal of STD & AIDS* 2002;**13 Suppl 2**:26–29.
- Nettelbreker E, Zeidler H, Bartels H, Dreses-Werringloer U, Daubener W, Holtmann H, Kohler L. Studies of persistent infection by *Chlamydia trachomatis* serovar K in TPA-differentiated U937 cells and the role of IFN-gamma. *Journal of medical microbiology* 1998;**47**:141–149.

- Newhall WJ, Jones RB. Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane protein of chlamydiae. *Journal of bacteriology* 1983;**154**:998–1001.
- Nüchter H: Nachweis von *Chlamydia psittaci* in unterschiedlichen Bereichen in zwei Hähnchen- und zwei Putenschlachtereien mittels direkter Immunfluoreszenz nach Erregeranzüchtung in Buffalo-Green-Monkey-Kidney-Zellkulturen sowie der Polymerase-Ketten-Reaktion mit anschließender Restriktionsenzymanalyse. Zugl.: Gießen, Univ., Diss, 2004. 1. Aufl. Wettenberg, VVB Laufersweiler, 2004, S.10–12.
- Orgogozo V, Morizot B, Martin A. The differential view of genotype-phenotype relationships. *Frontiers in genetics* 2015;**6**:179.
- Pickett MA, Everson JS, Pead PJ, Clarke IN. The plasmids of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* (N16): accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents. *Microbiology (Reading, England)* 2005;**151**:893–903.
- Rahm VA, Gnarpe H, Odland V. *Chlamydia trachomatis* among sexually active teenage girls. Lack of correlation between chlamydial infection, history of the patient and clinical signs of infection. *British journal of obstetrics and gynaecology* 1988;**95**:916–919.
- Rice PA, Schachter J. Pathogenesis of pelvic inflammatory disease. What are the questions? *JAMA* 1991;**266**:2587–2593.
- RKI. RKI-Ratgeber für Ärzte - Chlamydiosen (Teil 1): Erkrankungen durch *Chlamydia trachomatis*. Retrieved 14 September 2016. from [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Chlamydiosen\\_Teil1.html](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Chlamydiosen_Teil1.html), 2010a.
- RKI. Sechs Jahre STD-Sentinel-Surveillance in Deutschland – Zahlen und Fakten. *Epidemiologisches Bulletin* 2010b:19–30.
- Rowley J, Toskin I, Ndowa F. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections, 2008. In: World Health Organization (Hrsg). Geneva, Switzerland, 2012, pp. 1–16.
- Schachter J, McCormack WM, Chernesky MA, Martin DH, van der Pol B, Rice PA, Hook EW3, Stamm WE, Quinn TC, Chow JM. Vaginal swabs are appropriate specimens for diagnosis of genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;**41**:3784–3789.
- Schachter J, Stephens RS. Biology of *Chlamydia trachomatis*. *Sexually transmitted diseases* 1984;**4**:555–574.

- Schaeffer A, Henrich B. Rapid detection of *Chlamydia trachomatis* and typing of the Lymphogranuloma venereum associated L-Serovars by TaqMan PCR. *BMC infectious diseases* 2008;**8**:56.
- Schoborg RV. Chlamydia persistence - a tool to dissect chlamydia-host interactions. *Microbes and infection* 2011;**13**:649–662.
- Siemer J, Theile O, Larbi Y, Fasching PA, Danso KA, Kreienberg R, Essig A. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for infertility among women in Ghana, West Africa. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2008;**78**:323–327.
- Stephens RS, Myers G, Eppinger M, Bavoil PM. Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2009;**55**:115–119.
- Su H, Watkins NG, Zhang YX, Caldwell HD. Chlamydia trachomatis-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infection and immunity* 1990;**58**:1017–1025.
- Uretsky LS. Reagents with enhanced performance in clinical diagnostic systems. Retrieved 25 October 2016. from <https://www.google.com/patents/US6150128>, 2000.
- Verkooyen RP, Peeters MF, van Rijsoort-Vos JH, van der Meijden, W I, Mouton JW. Sensitivity and specificity of three new commercially available *Chlamydia trachomatis* tests. *International journal of STD & AIDS* 2002;**13 Suppl 2**:23–25.
- Wang S-p, Grayston JT. Three new serovars of *Chlamydia trachomatis*: Da, Ia, and L2a. *Journal of Infectious Diseases* 1991;**163**:403–405.
- Ward ME. The chlamydial developmental cycle. In: Barron AL (ed): *Microbiology of chlamydia*. Boca Raton Fla.: CRC Press, 1988, pp. 71–95.
- Weiß C: *Basiswissen Medizinische Statistik: Mit Epidemiologie*. 6. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer, 2013, S. 66–78.
- WHO. Global WHO Alliance for the Elimination of Blinding Trachoma by 2020. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 2012;**87**:161–168.
- Wollenhaupt J, Zeidler H. Undifferentiated arthritis and reactive arthritis. *Current opinion in rheumatology* 1998;**10**:306–313.
- Zöfel P: *Statistik verstehen: ein Begleitbuch zur computergestützten Anwendung*. 1. Aufl. München, Addison-Wesley, 2001. S.118–132.

## 9. Anlagen

### Patienteninformation

#### Vergleich zweier Teste zum Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydia trachomatis

Ihnen wird bei dem Arztbesuch im Rahmen der Routine-Diagnostik Blut abgenommen, das auf Antikörper gegen Chlamydia trachomatis untersucht wird. Das Bakterium C. trachomatis verursacht urogenitale Infektionen, die von vielen Menschen nicht bemerkt werden. Dadurch kann es v. a. bei Frauen zu aufsteigenden Infektionen und dort zu Entzündungen kommen, die eine Unfruchtbarkeit zur Folge haben können.

Im mikrobiologischen Institut wollen wir mit dieser Blutprobe einen neuen Antikörper-Test gegen C. trachomatis ausprobieren mit der Fragestellung, ob dieser Test besser ist als der, den wir im Augenblick einsetzen. Deshalb wird Ihnen keine weitere Blutprobe entnommen und es bestehen für Sie keine weiteren Risiken. Ihnen ist bekannt, dass bei dieser Prüfung personenbezogene Daten über Sie erhoben und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über Ihre Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen. Zur Veröffentlichung der Ergebnisse werden Ihre Daten anonymisiert.

Ihre Teilnahme ist freiwillig. Ein Widerruf dieser Einwilligung ist jederzeit ohne Angaben von Gründen und ohne zu erwartende Nachteile möglich.

Prüfverantwortliche:  
Herr OA PD Dr. med. Albrecht Oehme  
Institut für medizinische Mikrobiologie, Abt. Serologie  
Magdeburger Straße 18  
06122 Halle  
Tel. 0345 - 5571610

Frau OÄ Dr. med. P. Kaltwaßer  
Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie  
Ernst – Grube Straße 40  
06097 Halle

### Einverständniserklärung

**Titel: Vergleich zweier Teste zum Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydia trachomatis.**

Ich habe die Patienteninformation über die Studie: „Vergleich zweier Teste zum Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydia trachomatis“ gelesen und bin damit einverstanden, dass mein Blut mit einem weiteren Test auf C. trachomatis – Antikörper untersucht und die Daten anonymisiert veröffentlicht werden.

Prüfungsverantwortliche:

OA PD Dr.med. Albrecht Oehme

OÄ Dr. med. P. Kaltwaßer

Patientin:.....  
Name Datum Unterschrift



Universitätsklinikum  
Halle (Saale)

Postfach | 06097 Halle (Saale)

Zentrum für  
Reproduktionsmedizin  
und Andrologie (ZRA)  
Direktor:  
Univ.-Prof. Dr. med.  
Hermann M. Behre

Hausanschrift:  
Ernst-Grube-Str. 40  
06120 Halle (Saale)

Sekretariat:  
Tel.: (0345) 557 4782  
Fax: (0345) 557 4788  
zra@uk-halle.de

Ambulanz  
Reproduktionsmedizin:  
Tel.: (0345) 557 3332  
Fax: (0345) 557 4788

Ambulanz Andrologie  
Tel.: (0345) 557 4782  
Fax: (0345) 557 4788



Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

Abbildung 18: Einverständniserklärung

Tabelle 24: Gegenüberstellung erster und zweiter Testansatz Ctmedac IgA

			Ctmedac IgA 2			
			positiv	negativ	grenzwertig	Total
Ctmedac IgA 1	positiv	Anzahl	17	0	3	20
	negativ	Anzahl	0	184	2	186
	grenzwertig	Anzahl	1	2	7	10
	Total	Anzahl	18	186	12	216

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,851	,048	15,850	,000
N of Valid Cases		216			

a. Not assuming the null hypothesis. = Ablehnen der Nullhypothese

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis. = Verwenden des asymptotischen Standardfehlers durch Annehmen der Nullhypothese

Measure of Agreement = Ausmaß der Übereinstimmung; N of Valid Cases = Anzahl der validen Fälle; Value = Wert; Asymp. Std. Error = Standardfehler; Approx. Tb = T; Approx. Sig = Signifikanz

Tabelle 25: Gegenüberstellung erster und zweiter Testansatz Ctmedac IgG

			Ctmedac IgG 2			
			positiv	negativ	grenzwertig	Total
Ctmedac IgG 1	positiv	Anzahl	47	1	2	50
	negativ	Anzahl	0	159	0	159
	grenzwertig	Anzahl	1	1	5	7
	Total	Anzahl	48	161	7	216

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,942	,025	15,536	,000
N of Valid Cases		216			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Tabelle 26: Gegenüberstellung erster und zweiter Testansatz CtANILab IgA

			CtANILab IgA 2			
			positiv	negativ	grenzwertig	Total
CtANILab IgA 1	positiv	Anzahl	27	0	1	28
	negativ	Anzahl	0	175	0	175
	grenzwertig	Anzahl	1	1	11	13
	Total	Anzahl	28	176	12	216

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,957	,024	17,546	,000
N of Valid Cases		216			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Tabelle 27: Gegenüberstellung erster und zweiter Testansatz CtANILab IgG

			CtANILab IgG 2			
			positiv	negativ	grenzwertig	Total
CtANILab IgG 1	positiv	Anzahl	45	0	1	45
	negativ	Anzahl	0	158	0	158
	grenzwertig	Anzahl	1	0	12	13
	Total	Anzahl	46	158	12	216

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,989	,011	17,465	,000
N of Valid Cases		216			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Tabelle 28: Gegenüberstellung Testergebnisse Ctmedac und CtANILab IgA

			CtANILab IgA			
			positiv	negativ	grenzwertig	Total
Ctmedac IgA	positiv	Anzahl	17	2	1	20
	negativ	Anzahl	6	170	10	186
	grenzwertig	Anzahl	5	4	1	10
	<b>Total</b>	<b>Anzahl</b>	28	176	12	216

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,543	,068	10,096	,000
N of Valid Cases		216			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Tabelle 29: Gegenüberstellung Testergebnisse Ctmedac und CtANILab IgG

			CtANILab IgG			
			positiv	negativ	grenzwertig	Total
Ctmedac IgG	positiv	Anzahl	42	3	3	48
	negativ	Anzahl	2	152	5	159
	grenzwertig	Anzahl	1	3	5	9
	<b>Total</b>	<b>Anzahl</b>	45	158	13	216

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,809	,042	14,072	,000
N of Valid Cases		216			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Tabelle 30: Reproduzierbarkeit, Chlamydia trachomatis-IgA-ELISA plus medac (medac, 2008)

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz (n = 11)		
	$\bar{\phi}$ AU/ml	S	VK %	n		$\bar{\phi}$ AU/ml	S	VK %
PK	92,1	3,3	3,6	22	PK	96,0	4,8	5,0
1	4,2	0,4	9,5	22	1	3,2	0,3	9,4
2	57,8	2,1	3,6	22	2	41,3	2,2	5,3
3	121,1	6,0	5,0	22	3	70,8	3,4	4,8
4	263,6	15,9	6,0	22	4	125,5	9,3	7,4

$\bar{\phi}$  AU/ml = Absorptionsmittelwert; S = Standardabweichung; VK % = Variationskoeffizient; n = Wiederholungen; PK = Positiv-Kontrolle; Intraassay-Varianz = Reproduzierbarkeit innerhalb eines Testansatzes; Interassay-Varianz = Reproduzierbarkeit in verschiedenen Testansätzen

Tabelle 31: Sensitivität und Spezifität, Chlamydia trachomatis-IgA-ELISA plus medac (medac, 2008)

		Chlamydia trachomatis-IgA-pELISA medac		
		negativ	grenzwertig	positiv
Chlamydia trachomatis IgA-ELISA plus medac	negativ	243	0	0
	grenzwertig	4	4	2
	positiv	3	11	63

330 Proben wurden zur diagnostischen Erprobung im Vergleich zum *C. trachomatis*-IgA-pELISA medac gemessen

Sensitivität = 97 %

Spezifität = 97 %

beobachtete Übereinstimmung = 94 %

Tabelle 32: Reproduzierbarkeit, Chlamydia trachomatis-IgG-ELISA plus medac (medac, 2008)

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz (n = 11)		
	$\bar{\phi}$ AU/ml	S	VK %	n		$\bar{\phi}$ AU/ml	S	VK %
PK	41,1	1,0	2,4	22	PK	40,5	1,4	3,5
1	4,8	0,3	6,3	22	1	9,2	0,4	4,3
2	50,7	2,5	4,9	22	2	49,8	1,6	3,2
3	90,1	4,2	4,7	22	3	97,0	4,1	4,2
4	109,7	5,4	4,9	22	4	151,3	9,2	6,1

$\bar{\phi}$  AU/ml = Absorptionsmittelwert; S = Standardabweichung; VK % = Variationskoeffizient; n = Wiederholungen; PK = Positiv-Kontrolle; Intraassay-Varianz = Reproduzierbarkeit innerhalb eines Testansatzes; Interassay-Varianz = Reproduzierbarkeit in verschiedenen Testansätzen

Tabelle 33: Sensitivität und Spezifität, Chlamydia trachomatis-IgG-ELISA plus medac (medac, 2008)

		Chlamydia trachomatis-IgA-pELISA medac		
		negativ	grenzwertig	positiv
Chlamydia trachomatis-IgA-ELISA plus medac	negativ	172	5	2
	grenzwertig	4	84	6
	positiv	2	0	128

327 Proben wurden zur diagnostischen Erprobung im Vergleich zum *C. trachomatis-IgG-pELISA medac* gemessen

Sensitivität = 94 %

Spezifität = 97 %

Beobachtete Übereinstimmung = 94 %

**Tabelle 34: Reproduzierbarkeit innerhalb eines Testansatzes, IgA, ANI Labsystems (ANILabsystems, 2009)**

Probe	n	Ø Absorption	S	VK %
1	24	1,051	0,073	4,9
2	24	1,465	0,085	5,8
3	24	1,607	0,106	6,6

n = Wiederholungen; Ø Absorption = Absorptionsmittelwert; S = Standardabweichung; VK % = Variationskoeffizient

**Tabelle 35: Reproduzierbarkeit in verschiedenen Testansätzen, IgA, ANI Labsystems (ANILabsystems, 2009)**

Probe	n	Testläufe	Ø Absorption	S/CO-MW	S von S/CO	VK %
1	4	10	1,077	1,12	0,04	3,7
2	4	10	1,204	1,25	0,07	5,7
3	4	10	1,550	1,62	0,10	6,4
4	4	10	1,909	1,99	0,16	7,7

n = Wiederholungen; Ø Absorption = Absorptionsmittelwert; S = Standardabweichung; VK % = Variationskoeffizient; S/CO = Signal/Cut-Off; S/CO-MW = Signal Cut-Off Mittelwert

**Tabelle 36: Reproduzierbarkeit innerhalb eines Testansatzes, IgG, ANI Labsystems (ANILabsystems, 2009)**

Probe	Wiederholungen	Ø Absorption	S	VK %
1	24	0,993	0,048	4,8
2	24	1,251	0,061	4,8
3	24	1,694	0,098	5,8

n = Wiederholungen; Ø Absorption = Absorptionsmittelwert; S = Standardabweichung; VK % = Variationskoeffizient

**Tabelle 37: Reproduzierbarkeit in verschiedenen Testansätzen, IgG, ANI Labsystems (ANILabsystems, 2009)**

Probe	N	Testläufe	Ø Absorption	S/CO-MW	S von S/CO	VK %
1	4	10	1,053	1,14	0,06	4,9
2	4	10	1,286	1,39	0,06	4,0
3	4	10	1,375	1,49	0,07	4,6
4	4	10	1,739	1,88	0,07	3,9

n = Wiederholungen; Ø Absorption = Absorptionsmittelwert; S = Standardabweichung; VK % = Variationskoeffizient; S/CO = Signal/Cut-Off; S/CO-MW = Signal Cut-Off Mittelwert

Bezüglich der Sensitivität und Spezifität wurde der ELISA der Firma ANI Labsystems mit 2 anderen kommerziell erhältlichen Testen verglichen. Es wurde insgesamt auf eine gute Sensitivität geschlossen. Bezüglich der Spezifität hat der Hersteller die Seren von ein- bis fünfjährigen Kindern mit dem CtANILab im Vergleich zu einem anderem spezifischen *C. trachomatis*-EIA getestet und die Ergebnisse korreliert. Aus der guten Korrelation der negativen Ergebnisse wurde auf eine gute Spezifität geschlossen (Verkooyen et al., 2002; ANILabsystems, 2009).

**Tabelle 38: Die Prävalenz von *C. trachomatis*-IgG- und -IgA-Antikörpern mittels Peptid-EIAs von ANI Labsystems und einem anderen kommerziellen Hersteller (Verkooyen et al., 2002).**

	Patienten mit PCR- bestätigter aktiver <i>C. trachomatis</i> - Infektion, n = 324	Blutspender, n = 443
	<b><i>C. trachomatis</i> = IgG positiv %</b>	
<b>Ani-Labsystems-EIA</b>	69	6
<b>Vergleichs-EIA</b>	68	6
	<b><i>C. trachomatis</i> = IgG positiv %</b>	
<b>Ani-Labsystem-EIA</b>	38	5
<b>Vergleichs-EIA</b>	48	5

n = Anzahl Proben

## 10. Thesen

- 1.) In dieser Untersuchung wurde geprüft, ob der Chlamydia trachomatis IgA- bzw. -IgG EIA der Firma ANI Labsystems Ltd. auch im klinischen Einsatz im Vergleich zum Chlamydia trachomatis-IgA- bzw. -IgG-ELISA plus medac vergleichbar gute Ergebnisse erzielt und eine Alternative zu diesem Test darstellt.
- 2.) Im Zeitraum von 19.05.2011 bis 11.07.2012 wurden 216 Blutproben von Patientinnen der Kinderwunschsprechstunde des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) gesammelt, aufgearbeitet und mit beiden Testen auf das Vorhandensein von IgA- und IgG-Antikörpern untersucht. Die Ergebnisse wurden verglichen.
- 3.) Beide Teste zeigen in der beobachteten Übereinstimmung, Cohens Kappa  $\kappa$ , den Streudiagrammen, im Rangkorrelationskoeffizient  $r_s$  nach Spearman und im Bland-Altman-Diagramm eine gute Übereinstimmung der jeweiligen Testergebnisse. In Übereinstimmung mit den vom Hersteller angegebenen Daten weist dies auf eine gute Reproduzierbarkeit bzw. Intratestübereinstimmung hin.
- 4.) In der beobachteten Übereinstimmung und Cohens Kappa  $\kappa$  zeigt sich in beiden Testen für IgG eine bessere Übereinstimmung der kategorialen Testergebnisse gegenüber IgA. CtANILab erzielt hierbei gegenüber Ctmedac insgesamt etwas bessere Ergebnisse. Die Rangkorrelationskoeffizienten  $r_s$  nach Spearman verhalten sich analog zu Cohens Kappa  $\kappa$ .
- 5.) CtANILab zeigt im Vergleich zu Ctmedac mehr positive Ergebnisse in der IgA-Messung. Dies spiegelt sich in der nach Cohens Kappa  $\kappa$  lediglich „moderaten“ Übereinstimmung und der niedrigen Rangkorrelation  $r_s$  nach Spearman der beiden Teste im IgA wider. Für IgG liegt eine bessere Übereinstimmung der beiden Teste vor.
- 6.) Die Ergebnisse der Doppelbestimmung des Ctmedac IgA und vor allem IgG zeigen wenige starke Abweichungen im hochpositiven Bereich. Sie stellen sich zwar im Streudiagramm gut dar, haben letztendlich jedoch keine Konsequenz für das kategoriale Ergebnis. Dies konnte bei CtANILab nicht festgestellt werden. Im Bland-Altman-Diagramm liegen die Grenzen des Übereinstimmungsbereichs daher nah genug beieinander.
- 7.) In 42 Fällen erbrachten die Teste unterschiedliche Ergebnisse für IgA und bzw. oder IgG. In diesen Fällen wurde Einsicht in die Patientenakte genommen, um den

tatsächlichen Krankheitsstatus zu bestimmen und die Korrelation der Teste mit der Klinik zu bewerten.

- 8.) CtANILab zeigt gegenüber Ctmedac häufiger einen erhöhten IgA-Titer. Dies ging jedoch nicht regelhaft mit entsprechenden Symptomen oder klinischen Befunden einher. Ein Vorteil bezogen auf die Vorhersagekraft von Befunden stellt dies also nicht dar.
- 9.) Es liegt keine Tendenz zur besseren Übereinstimmung eines der beiden Teste mit den in der Krankenakte dokumentierten Befunden oder Symptomen vor. Aus der retrospektiven Untersuchung und Auswertung von Patientenakten kann daher nicht auf den aktuell vorliegenden Infektionsstatus mit *C. trachomatis* geschlossen werden.
- 10.) In der vorliegenden Untersuchung zeigen CtANILab und Ctmedac eine ungenügende Übereinstimmung der Intertest-Ergebnisse vor allem bezüglich IgA. CtANILab stellt daher für das Labor für Virologie/Serologie des Instituts für Medizinischen Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg keine Alternative zur serologischen Infektionsdiagnostik von *C. trachomatis* dar.

## 11. Votum der Ethik-Kommission



MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT  
HALLE - WITTENBERG



Medizinische Fakultät  
Ethik-Kommission

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06097 Halle (Saale)

Herrn PD Dr. A. Oehme  
Institut für Medizinische Mikrobiologie  
Medizinische Fakultät der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Magdeburger Straße 18  
06097 Halle

Ihre Zeichen

Ihr Schreiben vom

Unsere Zeichen  
hm-bü

Datum  
01.12.2010

### Vergleich zweier Teste zum Nachweis von Antikörpern gegen *Chlamydia trachomatis*

Sehr geehrter Herr Dr. Oehme,

am 30.11.2010 habe Sie in der Geschäftsstelle der Ethik-Kommission eine überarbeitete Patienteninformation zur oben genannten Studie hinterlegt. Die Auflage unseres Votums vom 23.11.2010 ist erfüllt.

Ich kann Ihnen bestätigen, dass seitens der Ethik-Kommission keine ethischen Bedenken gegen die Durchführung der Studie bestehen.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. Josef N. Neumann  
Stellv. Vorsitzender der Ethik-Kommission

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg arbeitet auf der Grundlage deutschen Rechts sowie in Anlehnung an die ICH-GCP-Richtlinien.

Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Vorhabens unabhängig vom Beratungsergebnis bei den durchführenden Ärzten und Wissenschaftlern verbleibt.

Postanschrift:  
06097 Halle (Saale)

Hausanschrift:  
Magdeburger Straße 8  
06112 Halle (Saale)

Geschäftsstelle:  
Tel 0345 557-4476  
Fax 0345 557-4477  
E-Mail [ethik-kommission@medizin.uni-halle.de](mailto:ethik-kommission@medizin.uni-halle.de)  
Internet: [www.medicin.uni-halle.de/](http://www.medicin.uni-halle.de/)

Bankverbindung:  
Deutsche Bundesbank,  
Filiale Magdeburg  
Konto: 80001530  
BLZ: 81000000

IBAN:  
DE3781000000080001530  
BIC:  
MARKDEF1810

Steuernummer: 111/144/02550  
(Finanzamt Halle-Nord)

## 12. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten wie Promotionsberatern oder anderen Personen in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Bleicherode, den

Susanna Bednarzik

### **13. Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich versichere hiermit, keine früheren Promotionsversuche an einer in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät mit dieser oder einer anderen Dissertation unternommen zu haben. Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Bleicherode, den

Susanna Bednarzik

## 14. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Alexander S. Kekulé danke ich, dass ich im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg die Dissertation durchführen durfte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Dipl. biol. A. Oehme für die Überlassung des Themas und die ständige, aufbauende Betreuung und Beratung während aller Phasen meiner Dissertation. Er unterstützte mich durch viele Anregungen im Fortgang der Doktorarbeit. Außerdem danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie für die praktische Unterstützung im Labor.

Dem Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie (ZRA) unter dem Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre danke ich für die Zusammenarbeit. Insbesondere Frau Dr. med. P. Kaltwaßer gilt mein herzlicher Dank für das Rekrutieren der Patientinnen im Rahmen Ihrer Kinderwunschsprechstunde.

Meiner Familie und meinen Freunden bin ich für die fortwährende Unterstützung im Prozess der Fertigstellung dankbar. Insbesondere Carolin möchte ich für ihre konstruktive Kritik und den korrigierenden Blick auf die schriftliche Darstellung der Arbeit danken.