

Aus dem molekulargenetischen Labor, polymikrobielle Infektionen und mukosale Pathogene und der Medizinischen Poliklinik (CCM) der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der Verteilung von *Gardnerella vaginalis* - Genotypen bei Frauen mit bakterieller Vaginose mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung's (FISH) Sonden

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Luise Reißhauer

aus Berlin

Datum der Promotion: 06.03.2020

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>2</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>5</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>6</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>7</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>12</b>
1.1 Bakterielle Vaginose .....	12
1.2 Epidemiologie .....	12
1.3 Diagnostik.....	13
1.3.1 Amselkriterien.....	13
1.3.2 Nugent-Score .....	14
1.4 Symptome .....	16
1.5 Therapie .....	17
1.6 <i>Gardnerella vaginalis</i> .....	18
1.6.1 Geschichte von <i>Gardnerella vaginalis</i> .....	18
1.6.2 <i>Gardnerella vaginalis</i> Eigenschaften .....	19
1.6.3 <i>Gardnerella vaginalis</i> Pathogenitätsfaktoren.....	20
1.7 Die bakterielle Vaginose und negative gesundheitliche Auswirkungen.....	20
1.8 <i>Gardnerella vaginalis</i> Biotypen, Genotypen und Kladen .....	21
1.8.1 Biotypen.....	21
1.8.2 Genotypen.....	21
1.9 Die Rolle von <i>Gardnerella vaginalis</i> bei der bakteriellen Vaginose .....	23
1.10 Die drei Modelle der bakteriellen Vaginose .....	24
<b>2. HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG</b> .....	<b>25</b>
<b>3. METHODIK</b> .....	<b>26</b>
3.1 Proben .....	26
3.2 Verblindung .....	26

# INHALTSVERZEICHNIS

3.3 Probenpräparation.....	26
3.4 Hybridisierung-Prozess .....	27
3.4.1 Vorbereitung der Hybridisierung.....	27
3.4.2 Oligonukleotidsonden .....	27
3.4.3 Farbstoffe .....	32
3.4.4 Hybridisierung.....	33
3.5. Mikroskopaufbau und Funktionsweise .....	34
3.6 Analyse der Proben .....	36
3.6.1 Visuelle Analyse der Proben .....	36
3.7 Ausschluss von Kreuzreaktionen .....	44
3.8 Materialien und Geräte .....	45
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
4.1 Einführung .....	50
4.2 <i>Gardnerella vaginalis</i> -Sonden .....	51
4.3 Ergebnisse der Sonden .....	51
4.3.1 Gard662.....	52
4.3.2 G-I.....	52
4.3.3 G-Ia.....	52
4.3.4 G-II.....	52
4.3.5 G-III/IV .....	53
4.3.6 G-IIIa.....	53
4.3.7 G-IVa .....	53
4.3.8 G-IVb .....	53
4.4 Gegenfärbung Gard662 in Cy5 .....	53
4.5 Übersicht Verteilung der Sonden nach Abstrichlokalisation .....	54
4.6 Nicht übereinstimmende Ergebnisse der Mono-Kladen Sonden.....	54
4.7 Korrigierte Ergebnisse der G-III/IV Sonde .....	55
4.8 Prävalenz der Kladen .....	56
4.9 Prävalenz der Kladen in Abhängigkeit von der Abstrichlokalisation.....	57
4.10 Anzahl der positiven Kladen pro Probe .....	58
4.11 Kladen-Kombinationen .....	59
4.12 Bakteriengruppen .....	60
4.13 Kreuzreaktion .....	60

# INHALTSVERZEICHNIS

4.14 Zusammenfassung Ergebnisse .....	66
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>67</b>
5.1 Bewertung der FISH-Sonden .....	67
5.2 Kladen .....	69
5.3 Die Rolle von <i>Gardnerella vaginalis</i> bei der bakteriellen Vaginose .....	71
5.4 Die Multiple-Kladen-Theorie .....	73
5.5 Die Rolle der Abstrichorte.....	75
5.6 Therapeutische Schwierigkeiten.....	75
5.7 Negative Probe.....	76
5.8 Bewertung der FISH Technik .....	77
5.9 Limitationen und Ausblick.....	77
<b>6. SCHLUSSFOLGERUNG.....</b>	<b>80</b>
<b>BIBLIOGRAFIE .....</b>	<b>81</b>
<b>ANHANG .....</b>	<b>95</b>
<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....</b>	<b>96</b>
<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>97</b>
<b>EIGENE PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>97</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>99</b>

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Definition von Klade adaptiert nach Campbell, Reece und Cain et al. ....</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 2: Kladenzugehörigkeit der Sonden.....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 3: Lage der Sonden auf der rRNA .....</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines FISH Mikroskops.....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 5: Vorgehensweise bei der visuellen Probenanalyse .....</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 6: Beispielbilder und dazugehörige prozentuale Einschätzung .....</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 7: Beispiel einer Gard662-Färbung.....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 8: Darstellung verschiedener Ebenen.....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 9: Beispielfoto für einzelne Bakterien .....</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 10: Beispielfoto einer G-II und Gard662 Färbung.....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 11: Inkongruenz zwischen G-III und Gard662 Färbung.....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 12: Flow-Chart der in die Arbeit integrierten Proben .....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 13: Verteilung der positiven Ergebnisse der Sonden nach Abstrichort.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 14: Verteilung der positiven Kladen in Abhängigkeit von der Abstrichlokalisation .....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 15: Anzahl der positiven Kladen je Probe.....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 16: Probe gepoolt .....</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 17: Probe gepoolt .....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 18: Probe gepoolt .....</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 19: Probe gepoolt .....</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 20: Probe gepoolt .....</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 21: Prozentuale Verteilung der Kladen im Vergleich mit anderen Studien...</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 22: Darstellung der Multiplen-Kladen-Theorie .....</i>	<i>74</i>

# TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Amselkriterien modifiziert nach Amsel et al. (15)</i> .....	14
<i>Tabelle 2: Nugent-Score für gramgefärbte Vaginalabstriche, modifiziert nach Nugent et al. und Mendling et al. (1, 17)</i> .....	15
<i>Tabelle 3: Ermittelte Punktwert aus Tabelle 2 und dessen Bewertung</i> .....	15
<i>Tabelle 4: Gegenüberstellung der BV mit Kolpitiden, modifiziert nach Weisner und Gätje (22, 23)</i> .....	17
<i>Tabelle 5: Systematik der Bakteriums Gardnerella vaginalis</i> .....	19
<i>Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Oligonukeotidsonden</i> .....	30
<i>Tabelle 7: Sonden der großen Bakteriengruppen</i> .....	31
<i>Tabelle 8: Physikalische Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe, modifiziert nach Moter et al. und PubSpectra Datenbank (86, 87)</i> .....	33
<i>Tabelle 9: Hybridisierungslösung</i> .....	34
<i>Tabelle 10: Zusammensetzung der Pufferlösung</i> .....	36
<i>Tabelle 11: Übersetzung der visuell erhobenen Ergebnisse</i> .....	38
<i>Tabelle 12: Geräte</i> .....	45
<i>Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien</i> .....	46
<i>Tabelle 14: Reagenzien</i> .....	47
<i>Tabelle 15: Bezugsquelle der Oligonukleotidsonden</i> .....	48
<i>Tabelle 16: Verwendete Software</i> .....	49
<i>Tabelle 17: Anzahl der positiven Ergebnisse je Sonde von n = 50</i> .....	51
<i>Tabelle 18: Ergebnisse der für die Kladen korrespondierenden Sonden</i> .....	55
<i>Tabelle 19: Vergleich der Ergebnisse zwischen GIII/IV und der Sonde von Kladen 3 und 4</i> .....	56
<i>Tabelle 20: Prävalenz der Kladen</i> .....	57
<i>Tabelle 21: Anzahl der positiven Kladen je Probe n = 50</i> .....	58
<i>Tabelle 22: Kladenkombinationen</i> .....	59
<i>Tabelle 23: Ergebnisse der Bakteriengruppen</i> .....	60

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aqua dest	Destilliertes Wasser
BV	Bakterielle Vaginose
BVAB	Bakterielle Vaginose assoziierte Bakterien
CDC	Centers of Disease Control and Prevention
Cy3	Ein Cyaninfarbstoff
Cy5	Ein Cyaninfarbstoff
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GF	Gesichtsfeld
HSV 2	Herpes simplex-Virus Typ 2
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPV	Humane Papillomaviren
KOH	Kaliumhydroxid
NaCl	Natriumchlorid; Kochsalz
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
STD	Sexuell übertragbare Krankheiten
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumlaurylsulfat
Tris-HCl	Trisaminomethan-Hydrochlorid

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C                      Grad Celsius

# ZUSAMMENFASSUNG

*Titel:* Untersuchung der Verteilung von *Gardnerella vaginalis* - Genotypen bei Frauen mit bakterieller Vaginose mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung's (FISH) Sonden

*Autorin:* Anne Luise Reißhauer

*Einleitung:* Die bakterielle Vaginose (BV) stellt die weltweit häufigste mikrobiologische Störung des Scheidenmilieus dar. Die betroffenen Frauen können trotz symptomarmen Verläufen unter negativen gesundheitlichen Auswirkungen leiden. Beispiele dafür wären Infertilität oder auch die erleichterte Akquirierung von sexuell übertragbaren Erkrankungen. Bis heute gibt es trotz intensiver Forschung viele ungeklärte Fragen bezüglich der BV. Eine Frage ist der Widerspruch, dass es im Prinzip keine BV ohne *G. vaginalis* gibt, jedoch *G. vaginalis* auch im vaginalen Mikrobioms von gesunden Frauen gefunden werden kann. Um dieses mikrobiologische Paradoxon zu klären, wurden *Gardnerellen* in verschiedene Biotypen und Genotypen eingeteilt, bislang ohne Erfolg. Eine neue Genotypeneinteilung in vier Kladen bietet die Möglichkeit für Einblicke in die Rolle der *Gardnerellen* bei der BV. Diese wurden in der hier vorliegenden Arbeit untersucht.

*Methodik:* Es wurden n = 51 prämenopausalen Frauen, die nach Amselkriterien unter bakterieller Vaginose litten, untersucht. Bei den Probandinnen wurden aus vaginalen (n = 26) oder zervikalen (n = 25) Abstrichen generierte primäre Bakterienkulturen inkubiert. Von diesen wurde jeweils das konfluierend wachsende Bakterienkonglomerat entnommen und mittels FISH untersucht. Es wurden bereits etablierte, alle *Gardnerella* Genotypen anfärbende FISH-Sonden und neu entwickelte, Genotypen spezifische FISH-Sonden verwendet.

*Ergebnisse:* Von n = 51 untersuchten Proben waren n = 50 auswertbar. Die Sonden G-III/IV mit n = 44 (88%) und G-I mit n = 43 (86%) waren am häufigsten vertreten. Unterschiede zwischen den Abstrichlokalisationen Zervix und Vagina wurden nicht gefunden. Die Kladen 1 und 4 sind mit n = 46 (92%) und n = 45 (90%) am häufigsten gefunden worden. Klade 3 wurde nie ohne Klade 4 gefunden. In der Regel waren drei Kladen in einem Abstrich zu finden n = 33 (66%). Die häufigste Kombination bestand aus den Kladen 1, 2 und 4 (64%).

## ZUSAMMENFASSUNG

*Diskussion:* Die gefundenen Kladen der untersuchten primären Bakterienkulturen sind den auf Abstrichen basierten Studien ähnlich. Alle Kladen untersuchenden Arbeiten konnten zeigen, dass in der Regel multiple Kladen vorhanden waren. *Gardnerella vaginalis* scheint somit ein Teamplayer zu sein, der von der Anwesenheit verschiedener Kladen profitiert. Auch diese Arbeit lieferte Hinweise, dass es noch weitere unbekannte Kladen geben kann und weitere Grundlagenforschung bezüglich der Genotypisierung von *G. vaginalis* notwendig ist. Die hier verwendeten FISH-Sonden bieten für die Zukunft die Möglichkeit, einzelne Kladen in ihrer Morphologie und ihren räumlichen Verhältnissen zueinander zu untersuchen.

# ABSTRACT

*Introduction:* Bacterial vaginosis (BV) represents the world's most common microbiological disorder in the vagina. Women who suffer of BV may show little to no symptoms. Nevertheless, adverse health effects for example infertility and the easier acquisition of sexually transmitted diseases are possible. In the last decades thorough research was not able to shed light onto *Gardnerella* and its role in the pathophysiology in BV. *Gardnerella vaginalis* can be found in women with BV but also in the vaginal microbiome of healthy women. To clarify its role different *Gardnerella* biotypes and genotypes have been studied, so far without success. A new classification of genotypes into four clades offers the opportunity for further insights into the role of *Gardnerella* in BV. These were investigated in the present work.

*Methods:* A total of n = 51 premenopausal women who were diagnosed with BV using the Amsel criteria were investigated. Primary bacterial cultures were generated from vaginal (n = 26) or cervical (n = 25) smears. After the incubation the confluent growth of the bacteria was removed, processed and examined using the FISH technique. Established *Gardnerella* staining FISH probes and newly developed genotype specific FISH probes were used.

*Results:* Of n = 51 samples tested, n = 50 were evaluated. Probes G-III/IV with n = 44 (88%) and G-I with n = 43 (86%) were found most often. Differences between cervical and vaginal smears were not found. Clades 1 and 4 are most commonly found with n = 46 (92%) and n = 45 (90%). Clade 3 was never found without clade 4. At least three clades were found in n = 33 (66%) smears. The most common combination consisted of clades 1, 2 and 4 (64%).

*Conclusion:* The clades found in primary bacterial cultures here are surprisingly similar to the smear-based studies. All works which investigated *Gardnerella* clades showed that usually multiple clades were present. *Gardnerella* seems to be a team player benefiting from the presence of different clades. This work also hints that there are other unknown clades and that further research is needed. The FISH probes we used offer the possibility to examine individual clades in their morphology and their spatial relationships with each other in the future.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Bakterielle Vaginose

Erstmals wurde die bakterielle Vaginose (BV) auf dem internationalen Kongress 1982 in Kristiansand, Norwegen, definiert (1). Dort wurde die BV relativ unpräzise als Austausch des *Laktobazillen* - dominierten Milieus, durch Bakteriengruppen, die typischerweise bei veränderter Vaginalflora zu finden sind, definiert. Zu diesen gehören u. a. *Gardnerella*, *Atopobium*, *Prevotella*, *Megasphaera*, *Dialister*, *Mobiluncus*, *Leptotrichia*, *Sneathia*, *Peptostreptococcus*, *Clostridien* Spezies, bekannt als BV-assoziierte Bakterien 1-3 (BVAB1, BVAB2, BVAB3), und viele weitere Bakterien (1-4). Seit dieser eher unpräzisen und wenig greifbaren Definition gab es bis heute keine wesentliche Verbesserung. Ein kürzlich veröffentlichtes Review prangert diese seit Jahrzehnten bestehende Ungenauigkeit an (5). Die BV wurde bis jetzt als klassische Infektionskrankheit (6), vaginale Infektion (7), polymikrobielle Infektion (8), Dysbiose (1) oder ganz einfach als Zustand (7) beschrieben. Selbst ob die BV eine Erkrankung ist, wird in der Literatur diskutiert (5, 9). Allgemeiner wissenschaftlicher Konsens heute ist, dass es bei der BV zu einem Shift von einem durch *Laktobazillen* dominiertem Milieu zu einer vaginalen Flora kommt, welche weniger durch Döderleinstäbchen, aber dafür mehr aus einer Mischflora besteht, die durch fakultative Anaerobier geprägt ist.

Im deutschsprachigen Raum wird die BV auch Aminkolpitis oder Aminvaginose genannt.

## 1.2 Epidemiologie

Die BV ist die weltweit häufigste mikrobiologische Störung des Scheidenmilieus bei Frauen im gebärfähigem Alter (10). Somit ist sie eine sehr häufige Infektion des Reproduktionstraktes von Frauen (11) und stellt damit ein weltweites Gesundheitsproblem dar. Die Prävalenz variiert zwischen einzelnen Ländern und Ethnien erheblich und ist im Ganzen betrachtet in Afrika am höchsten, in Asien und Europa niedriger (11). In den USA sind 29,2% der Frauen von der BV betroffen. Genaue Prävalenzangaben für Deutschland gibt es nicht. In Europa schwankt die Prävalenz von

## 1. EINLEITUNG

5,9% in Irland (12) bis 24% in Norwegen (13). Wobei in dem Review von Kenyon *et al.* bis auf eine Studie (14) alle anderen Studien als statistisch nicht repräsentativ eingeschätzt wurden (11).

### 1.3 Diagnostik

Zur Diagnostik der BV haben sich zwei verschiedene Systeme in der klinischen Praxis etabliert, zum einen die Amselkriterien, zum anderen der Nugent-Score. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, Abstriche mikrobiologisch zu untersuchen.

#### 1.3.1 Amselkriterien

Die Amselkriterien, eine Übersicht ist dargestellt in Tabelle 1, wurden 1983 von Amsel *et al.* eingeführt (15). Diese Kriterien werden im Rahmen einer gynäkologischen Untersuchung erhoben und basieren u.a. auf der Evaluation von vaginalen Abstrichen. Die Diagnose der BV gilt als gesichert, wenn mindestens drei der Kriterien erfüllt werden (10, 15). Schlüsselzellen, auch Clue Cells genannt, sind Epithelzellen, an denen *G. vaginalis* Bakterien haften (16). Zur visuellen Analyse wird ein vaginaler Abstrich als Nativpräparat, gefärbt mit 0,1%iger Methylenblau-Lösung, unter einem Lichtmikroskop analysiert. Das Kriterium ist erfüllt, wenn sich auf den vaginalen Zellen ein dichter Bakterienrasen findet. Für den Amintest, im angloamerikanischen Raum auch unter Whiff-Test bekannt, wird dem Abstrich 10%ige Kaliumhydroxid-Lösung (KOH-Lösung) zugegeben. Die zugeführte KOH-Lösung führt zu einer Intensivierung des charakteristischen Geruches, falls dieser noch nicht apparent war, und demaskiert somit latenten Fischgeruch. Die pH-Bestimmung erfolgt mittels Abstrichmaterial, welches auf ein Lackmus-Papier gegeben wird.

## 1. EINLEITUNG

Tabelle 1: Amselkriterien modifiziert nach Amsel et al. (15)

<b>Amselkriterien</b>
grau-weißer, homogener Fluor
pH $\geq$ 4,5 (Normbereich 4,4 bis 3,8)
positiver Amintest (Geruchsintensivierung nach Zugabe von 10%iger KOH-Lösung)
Schlüsselzellen

### 1.3.2 Nugent-Score

Der 1991 von Nugent *et al.* entwickelte Score evaluiert die vaginale Flora mittels mikroskopischer Kriterien (17). Dafür ist eine Gramfärbung von einem vaginalen Abstrich notwendig. Anschließend werden die darin zu findenden Mikroorganismen in den Kategorien *Laktobazillen*, gramnegative und gramlabile Stäbchen und gebogene Stäbchen pro Gesichtsfeld (GF) bestimmt. Eine Übersicht ist in Tabelle 2 dargestellt. Für jedes der drei Kriterien wird ein Punktwert ermittelt, diese werden addiert und die errechnete Zahl ergibt den Nugent-Score. Eine Bewertungsübersicht des Nugent-Scores ist in Tabelle 3 dargestellt. Er gilt als das objektivere Verfahren und hat die Amselkriterien weltweit als Goldstandard, außer in Deutschland (1), abgelöst (18).

## 1. EINLEITUNG

Tabelle 2: Nugent-Score für gramgefärbte Vaginalabstriche, modifiziert nach Nugent et al. und Mendling et al. (1, 17)

<b>Punkte</b>	<b><i>Lactobacillus</i>, entspricht grampositiven Stäbchen</b>	<b><i>Gardnerella</i> und <i>Bacteroides</i> spp. Morphotypen, entspricht gramnegativen bzw. gramlabilen Stäbchen</b>	<b><i>Mobiluncus</i>, gebogene Stäbchen</b>
0	4 +	0	0
1	3 +	1 +	1 + oder 2 +
2	2 +	2 +	3 + oder 4 +
3	1+	3 +	
4	0	4 +	

0 = kein Nachweis in 5 Gesichtsfeldern (GF), 1+ = <1 Organismus pro GF, 2+ = 1-4 Organismen pro GF, 3+ = 5-30 Organismen pro GF, 4+ = >30 Organismen pro GF. Ein Gesichtsfeld (GF) entspricht einer 1000-fachen Vergrößerung.

Tabelle 3: Ermittelte Punktwert aus Tabelle 2 und dessen Bewertung

<b>Score</b>	<b>Bewertung</b>
0-3	normal
4-6	intermediär, unklar
7-10	bakterielle Vaginose

# 1. EINLEITUNG

## 1.4 Symptome

Frauen mit symptomatischer BV können unter Pruritus und vermehrt dünnflüssigem, weiß-gräulichem, homogenem Vaginalsekret leiden. Der unangenehm fischig riechende Ausfluss ist meist der Auslöser für die betroffene Frau, sich gynäkologisch vorzustellen. Er ist damit auch das Leitsymptom. Der unangenehme Geruch wird besonders während der Menses oder nach ungeschütztem Geschlechtsverkehr von den betroffenen Frauen registriert (19). Beides führt zur Alkalisierung des Sekrets und damit zur Verstärkung des fischigen Odors. Nicht alle Frauen, die die Amselkriterien oder den Nugent-Score erfüllen und damit unter BV leiden, berichten von den typischen klinischen Zeichen der BV. Die Prävalenz der sogenannten asymptomatischen Verläufe wird mit großen Schwankungen von 8,6% bis 84% angegeben (14, 19, 20). Die Kohortenstudie von Koumans *et al.*, die eine Prävalenz von 84% der asymptomatischen BV Verläufe fand, wurde in einem Review, das die weltweite Epidemiologie der BV untersucht, als die einzige Arbeit bewertet, die die untersuchte Bevölkerung repräsentativ darstellt (11). Somit kann von einer tendenziell höheren Rate an asymptomatischen BV Verläufen ausgegangen werden.

Die klassischen Entzündungszeichen nach Celsus und Galen, wie Rötung, Schwellung, Schmerzen, Überwärmung und die eingeschränkte Funktion, liegen bei der BV nicht vor (21).

Als Abgrenzung zu den typischen Infektionserkrankungen der Vagina wäre die Soorvaginitis mit weiß bröckeligem, neutral riechendem Sekret und Pruritus, die Trichomonadeninfektion mit schaumig grünlichem Sekret und punktförmigen Rötungen der Vaginalhaut, als auch die unspezifische Vaginitis, die durch einen eitriges Sekret charakterisiert ist, zu nennen (22). Eine Übersicht dieser Differentialdiagnosen ist in Tabelle 4 zu sehen.

# 1. EINLEITUNG

Tabelle 4: Gegenüberstellung der BV mit Kolpitiden, modifiziert nach Weisner und Gätje (22, 23)

	<b>Bakterielle Vaginose</b>	<b>Trichomoniasis</b>	<b>Candidamykose</b>
Ätiologie	Dysbiose	sexuell übertragen	kompromittiertes Immunsystem
Mikrobiologie	<i>G. vaginalis</i>	Parasit	Candidaarten
Fluorfarbe	gräulich-weißlich	grünlich	weiß
Fluormenge	viel	viel	variiert
Fluorkonsistenz	dünn, homogen	schaumig	bröckelig
Symptome	Fischgeruch	Juckreiz und Brennen	Juckreiz und Brennen
pH-Wert	≥ 4,5	≥ 4,5	< 4,5
Spekulum-Untersuchung	keine Inflammation der Mukosa	Erdbeer-Zervix	Inflammation der Mukosa möglich
Nativpräparat	Schlüsselzellen	<i>Trichomonas vaginalis</i> , Leukozyten	Leukozyten, Pseudomyzelien
KOH-Test Whiff-Test	positiv	negativ	Pseudomyzelien

## 1.5 Therapie

Zur Behandlung der BV gibt es mehrere Optionen, zwischen denen frei gewählt werden kann, da es bei allen zwar eine gute Kurzzeitheilung (24), aber nur eine schlechte lang anhaltende Heilung gibt (21, 25, 26). Laut der deutschen AWMF S1-Leitlinie von 2013 ist eine systemische oder lokale antibiotische Therapie möglich. Systemisch sollte das hauptsächlich gramnegativ wirkende Metronidazol 2 x 500 mg pro Tag über eine Dauer von sieben Tagen gegeben werden. Alternativ gibt es eine orale Einmaldosis mit 2 g Metronidazol. Clindamycin und Metronidazol können lokal über mehrere Tage appliziert

## 1. EINLEITUNG

werden (10). Dieses Regime entspricht der aktuellen deutschen S1-Leitlinie der BV der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) (10) und geht auch konform mit der Empfehlung des Centers of Disease Control and Prevention (CDC) (27).

### 1.6 *Gardnerella vaginalis*

#### 1.6.1 Geschichte von *Gardnerella vaginalis*

Die BV ist eine Erkrankung oder ein Befund und wird seit circa 100 Jahren intensiv erforscht. Gardner und Dukes waren die ersten, die bei Frauen mit typischen Symptomen der BV ein Bakterium isolieren konnten, dem sie den Namen *Haemophilus vaginalis* gaben. Sie haben zeigen können, dass bei an BV erkrankten Patientinnen in 92% der Fälle *H. vaginalis* nachweisbar war, dieses jedoch nicht bei Patientinnen ohne typische BV Symptome gefunden werden kann (6). Gardner und Dukes waren fähig, mit einem, aus heutiger Sicht ethisch sehr fragwürdigem Experiment, BV zu übertragen. Es gelang jedoch nicht, mittels einer Reinkultur typische Symptome hervorzurufen. Nur durch direktes Übertragen von Vaginalsekret erkrankter Frauen auf gesunde Frauen konnten BV Symptome induziert werden. Damit konnten die drei klassischen Koch'schen Postulate: 1. Auffinden des Pathogens nur bei Erkrankten, 2. Isolation des Pathogens in einer Kultur und 3. Übertragung des Pathogens führt zu Erkrankung einer vorher gesunden Person, nicht erfüllt werden. Bereits hier begann eine Orientierungslosigkeit bezüglich der BV, die bis heute anhält. Im Jahr 1969 konnte Criswell *et al.* zeigen, dass eine Übernacht-Bakterienkultur die BV bei Frauen hervorrufen kann (28). Nun schienen die Koch'schen Postulate erfüllt. Allerdings wurde schon in den darauffolgenden Jahren über eine *G. vaginalis* Positivrate von bis zu 40% bei gesunden Frauen berichtet (29). Durch die Einführung von sensitiveren molekularen Diagnostiktechniken wurde der Anteil von *G.-vaginalis*-Funden bei gesunden Frauen von 70% (30) bis zu 97% (31) noch höher.

Auch die Zuordnung des von Gardner und Dukes als *H. vaginalis* benannten Organismus blieb lange Zeit strittig. Über die Jahrzehnte kam es diesbezüglich zu mehrfachen Änderungen. 1963 haben Zinnemann und Turner *et al.* *H. vaginalis* der Gattung *Corynebacterium* zugeordnet, da es keulen-artig aussieht und es in *Corynebacterium vaginalie* umbenannt (32). 1979 haben Greenwood *et al.* aufgrund der Eigenschaften dieses Bakteriums entschieden, dass der Genus *Corynebacterium* diesem Bakterium

## 1. EINLEITUNG

nicht gerecht wird und ein neuer Genus notwendig sei. Darum wurde der Genus *Gardnerella* mit seinem einzigen Vertreter *Gardnerella vaginalis* implementiert (33, 34). Mehrere Jahrzehnte später konnte durch eine große taxonomische Studie gezeigt werden, dass *G. vaginalis* eine nahe Verwandtschaft mit der Familie der *Bifidobacteriaceae* hat (35) und wurde dieser schließlich zugeordnet.

### 1.6.2 *Gardnerella vaginalis* Eigenschaften

*Gardnerella vaginalis* ist ein kleines, nicht motiles und nicht bekapseltes, fakultativ anaerobes, pleomorphes, gram-variables Stäbchen (36). Typischerweise ist es beim Menschen im Urogenitaltrakt auffindbar. Das Bakterium ist bezüglich seiner Anzuchtbedingungen sehr anspruchsvoll. Es wächst langsam bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> auf Blut-Agar und bildet kleine Kolonien mit Hämolysezonen (37). Das Bakterium wird in die Familie der *Bifidobacteriaceae* (35) eingeordnet, ist die einzige Art der Gattung *Gardnerella* und bis jetzt beim Menschen und vielen Säugetieren gefunden worden (38).

Tabelle 5: Systematik der Bakteriums *Gardnerella vaginalis*

Systematik	
Domäne	Bakterien (Bacteria)
Abteilung	Actinobacteria
Ordnung	Bifidobacteriales
Familie	Bifidobacteriaceae
Gattung	Gardnerella
Art	Gardnerella vaginalis

## 1. EINLEITUNG

### 1.6.3 *Gardnerella vaginalis* Pathogenitätsfaktoren

*Gardnerella vaginalis* verfügt über diverse Pathogenitätsfaktoren. Zum Beispiel existieren bei *Gardnerellen* Mechanismen zur Zelladhäsion, sogenannte Fimbrien, die das Anhaften an vaginale Zellen ermöglichen (36, 39). Das porenbildende Exotoxin Vaginolysin ist ein Cholesterol-abhängiges Zytolysin, das die Endothelzellen der Vagina lysiert (40-42). Darüber hinaus sind Sialidase A und Prolidase, die von *Gardnerellen* produziert werden können, vermutlich wichtige Faktoren für die Zerstörung von Muzin (43). Bakterielle Vaginose auslösende *Gardnerellen* besitzen alle drei Virulenzfaktoren: Die Adhärenzfähigkeit, das Potential zur Biofilmbildung und die Zytotoxizität. Typische BV assoziierte Bakterien (u.a. *Atopobium*, *Prevotella*, *Mobiluncus*) und nicht BV auslösende *Gardnerella* Stämme besitzen diese Faktoren, wenn überhaupt, weniger stark ausgeprägt. Damit haben *Gardnerellen* das größte Potential, eine Schlüsselrolle in der BV zu spielen (42, 44, 45). Die genannten Eigenschaften sind der Biofilmbildung dienlich und könnten eine Erklärung für den *Gardnerellen* dominierten Biofilm mit bis zu 70-90% sein (16).

### 1.7 Die bakterielle Vaginose und negative gesundheitliche Auswirkungen

Negative gesundheitliche Folgen wurden vielfach mit der BV in Verbindung gebracht. Bei den betroffenen Frauen wurden Erkrankungen des oberen Genitaltrakts mit der BV assoziiert. Zum Beispiel konnte nach operativen Eingriffen in diesem Gebiet ein erhöhtes Risiko für Infektionen gezeigt werden (46-48). Außerdem zeigt sich ein Zusammenhang zwischen der BV und der Pelvic inflammatory disease (PID) (49, 50). Sexuell übertragbare Krankheiten (STD) werden leichter akquiriert bei bestehender BV. Eine erhöhte Suszeptibilität besteht für das *Herpes simplex-Virus Typ 2* (HSV 2) (51), *Trichomonas vaginalis* (52), *Neisseria gonorrhoeae* (52, 53), *Chlamydia trachomatis* (52, 53), das *humane Immundefizienz-Virus* (HIV) (54, 55) und die *humanen Papillomaviren* (HPV) (56). Auch im Rahmen von Schwangerschaften sind Komplikationen wie Frühgeburtlichkeit, Fehlgeburten und maternale Infektionen berichtet worden (57, 58). Ebenso konnte für asymptomatische Verläufe der BV durch eine Meta-Analyse gezeigt werden, dass sich das Risiko der Frühgeburtlichkeit verdoppelt (58). Normalerweise gehören zu einer Erkrankung Symptome, die von Patienten empfunden werden können. Der Hauptteil der Patientinnen, die an BV erkrankt sind, haben jedoch einen

## 1. EINLEITUNG

asymptomatischen Verlauf. Trotzdem gibt es Belege für negative gesundheitliche Auswirkungen, die insbesondere die Reproduktion und Schwangerschaft betreffen. Also selbst beim asymptomatischen Verlauf ist eine Behandlung notwendig, da mit negativen Folgen zu rechnen ist (58).

### 1.8 *Gardnerella vaginalis* Biotypen, Genotypen und Kladen

Um die Ambivalenz zwischen *G. vaginalis* und BV zu klären, wurden diverse Biotypen und Genotypen von den *Gardnerellen* bestimmt.

#### 1.8.1 Biotypen

Ein Biotyp beschreibt einen Erreger innerhalb einer Art, der durch konstante morphologische, biologische oder serologische Eigenschaften charakterisiert ist. Die Merkmale sind differenzierbar, reichen jedoch nicht für eine taxonomische Abtrennung. Die erste Unterteilung in Biotypen, die das Bakterium *G. vaginalis* betraf, wurde von Piot *et al.* 1984 durchgeführt. Durch enzymatische Reaktionen wurde ermittelt, ob bestimmte Enzyme vorhanden sind oder nicht (59). Dabei ergaben sich acht verschiedene Biotypen. Die Diversität stieg durch weitere Untersuchungen auf 17 (60) und bis hin zu 33 (61) verschiedenen Biotypen. Trotz Hinweisen, dass bestimmte Biotypen eher BV hervorrufen können (60, 62, 63) und *Gardnerella* Stämme, die von an BV erkrankten Patientinnen isoliert worden sind (45) tendenziell stärker ausgeprägte Virulenzfaktoren besitzen, ergab diese Art der Klassifikation bis heute keine klinische Relevanz.

#### 1.8.2 Genotypen

Verschiedene molekulare Techniken haben über Jahrzehnte zur Identifizierung von diversen Genotypen geführt (64-68). Die gefundenen Genotypen konnten nicht sicher mit der BV korreliert werden (64, 65). Selbst in Kombination mit der Biotypisierung konnte nicht eindeutig dargestellt werden, welche *Gardnerellen* Stämme eine BV hervorrufen (67).

## 1. EINLEITUNG

Eine Arbeit, die neue Türen geöffnet hat, ist die von Ahmed *et al.*. In dieser wurden 17 *G. vaginalis* Isolate mit vergleichender Genomanalyse untersucht. Vier Kladen konnten dabei unterschieden werden (69). Eine Klade ist dabei eine geschlossene Abstammungsgemeinschaft, also eine Gruppe, die nur Arten enthält, die auf eine Stammart zurückzuführen sind (70). Synonyme für den Begriff Klade sind monophyletische Gruppe, Monophylum und monophyletisches Taxon. Alle Mitglieder der Klade haben einen gemeinsamen Vorfahren, von diesem stammen alle Nachfahren ab (siehe Abbildung 1).

Da zwischen den verschiedenen Kladen kaum horizontaler Gentransfer nachweisbar war, zog die Arbeitsgruppe den Schluss, dass es sich nicht um monophylogenetische Gruppen, sondern vielmehr um vier individuelle Spezies handelt (69). Schon frühere Arbeiten stellten die Hypothese auf, dass es sich bei den entdeckten Genotypen um verschiedene Spezies handelt (64, 67). Da die Autoren der Arbeit dennoch an dem Begriff der Kladen festgehalten haben, wird in der hier vorliegenden Arbeit auch von den Kladen 1 - 4 nach Ahmed *et al.* (69) gesprochen.

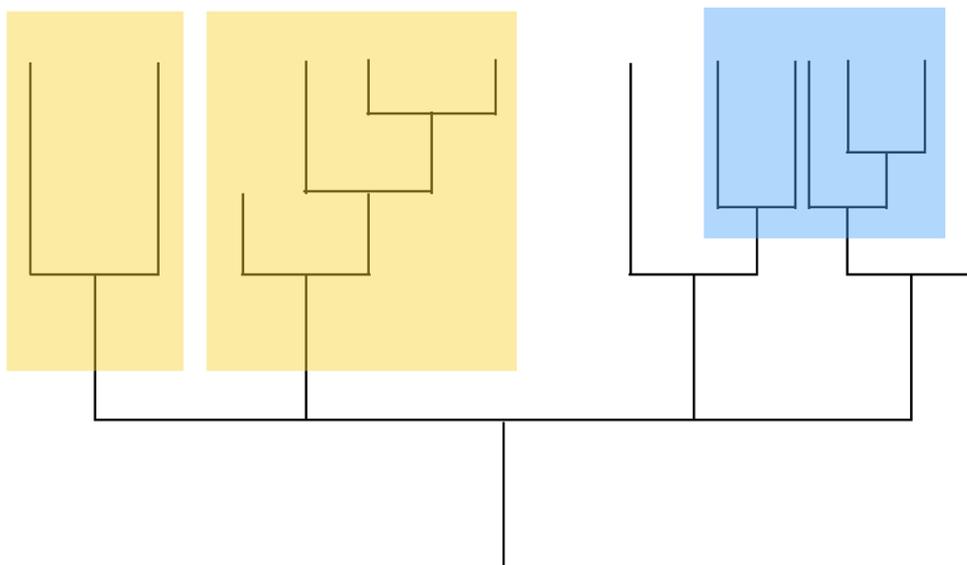


Abbildung 1: Definition von Klade adaptiert nach Campbell, Reece und Cain *et al.*

Alle gelb farbigen Vierecke stellen jeweils eine monophylogenetische Gruppe, eine sogenannte Klade dar. Die blau unterlegte Fläche stellt hingegen keine Klade da, da diese nicht einer Stammart entspringt und alle ihre Nachkommen umfasst (70).

## 1. EINLEITUNG

### 1.9 Die Rolle von *Gardnerella vaginalis* bei der bakteriellen Vaginose

Trotz seit Jahrzehnten bestehender, intensiver Forschung ist die Ätiologie der BV nicht geklärt (71). Von Interesse ist, welche Aufgabe *G. vaginalis* bei der Biofilmbildung genau übernimmt und insbesondere, ob *Gardnerellen* das einzige notwendige pathogene Agens ist, um einen Biofilm zu initiieren und zu unterhalten. Trotz der vielen Arbeiten zur Bio- und Genotypisierung kam es bis jetzt zu keiner klaren, konstant reproduzierbaren und klinisch relevanten Subtypisierung der *Gardnerellen*.

Morphologisch konnte Swidsinski *et al.* *in vivo* *Gardnerellen* mit zwei verschiedenen Wachstumsverhalten finden. Es wurde ein planktonisches und ein kohäsives und damit Biofilm-formendes Muster (72) identifiziert. Auch die morphologisch *in vivo* dargestellte massive quantitative Rolle die *G. vaginalis* im Biofilm (16) ist ein Beweis für die Rolle als Pathogen und nicht als Kommensale.

*Gardnerella vaginalis* und seine Rolle in der Pathophysiologie der BV war und ist bis heute ein kontrovers diskutiertes Thema. Dies liegt zum einen daran, dass *G. vaginalis* und die BV sich nicht wie ein Pathogen zu seiner hervorgerufenen Infektionskrankheit zueinander verhalten, sondern es sich vielmehr um ein komplexes Zusammenspiel von multiplen Faktoren handelt (6, 28, 31). Genau diese Widersprüchlichkeit zwischen dem Bakterium *G. vaginalis* und dessen Einfluss auf Gesundheit und Krankheit führt zu der bereits diskutierten Unsicherheit, welche sich z.B. in der fehlenden einheitlichen Definition der BV und der regelmäßig aufkommenden Grundsatzfrage, ob die BV überhaupt eine Erkrankung ist, zeigt (5, 9).

Viele Argumente sprechen dafür, dass *Gardnerellen* eine, wenn nicht gar die Hauptrolle in der Pathogenese spielen. Einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der BV und *G. vaginalis* konnte Swidsinski *et al.* darstellten. Es wurde anhand vaginaler Biopsien und FISH-Analyse gezeigt, dass in der normalen vaginalen Flora *Laktobazillen* nicht als dichter Rasen, sondern nur vereinzelt auf der vaginalen Schleimhaut zu finden sind. Bei an BV erkrankten Patientinnen zeigte sich ein dichter Biofilm, dessen Hauptkomponente *G. vaginalis* war. *Gardnerellen* sind die einzigen Bakterien, die immer in BV-Biofilmen vorhanden sind (3, 8, 16, 73). Das deutet auf eine entscheidende Rolle von *Gardnerellen* in der Pathophysiologie der BV hin.

## 1. EINLEITUNG

### 1.10 Die drei Modelle der bakteriellen Vaginose

Es gibt drei Modelle, die versuchen die Ätiologie der BV zu erklären. Diese wurden kürzlich in einem Review gegenübergestellt (74).

Zum einen besteht das Modell der *Laktobazillen*-Depletion. Hier wird von einem Verlust an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzierenden *Laktobazillen* ausgegangen. Dies führt zu einem pH-Anstieg, welcher nun von BV assoziierten Bakterien genutzt wird, um sich intensiv zu reproduzieren. Das Vaginalepithel wird somit von Anaerobiern überwuchert und es kommt zur BV (75).

Die anderen zwei Modelle, das Primary Pathogen Model und das Polymicrobial Pathogen Model, gehen davon aus, dass es eine *Gardnerella* Exposition der betroffenen Frau durch ungeschützten Geschlechtsverkehr gab (73, 74, 76). Obwohl die BV laut CDC offiziell keine STD ist, ist dies eine berechtigte Hypothese, da es viele Hinweise gibt, dass es sich um eine STD handelt (65, 72, 77, 78). Nach der Exposition kommt es im Anschluss zu einer Verdrängung der *Laktobazillen* und Formation eines Biofilms. Bei dem ersten Modell wird *G. vaginalis* als der Initiator der BV angesehen, da das Pathogen alle nötigen Eigenschaften hat, um BV auszulösen (42). Bei dem Polymicrobial Pathogen Model, ist nicht ein Pathogen, sondern das Zusammenspiel von mehreren BV assoziierten Bakterien notwendig, um BV zu auszulösen (8, 16, 76, 79).

# 2. HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG

Seit vielen Jahrzehnten sind diverse Fragen bezüglich der BV und der Rolle von *G. vaginalis* nicht abschließend geklärt. Eigenschaften die notwendig sind, um BV hervorzurufen, besitzt dieses Bakterium in einer stärkeren Ausprägung als andere Bakterien, die bei BV typischerweise zu finden sind (42, 73, 80). Dadurch wird die Biofilmbildung ermöglicht. Auch bei der *in vivo* gefundenen Biofilmstruktur bei Frauen mit BV konnte gezeigt werden, dass *G. vaginalis* eine Hauptrolle spielt (8, 72, 76). Die bisherige Einteilung von *Gardnerellen* in eher pathogene und eher nicht pathogene Untergruppen hat keine zufriedenstellenden Ergebnisse geliefert, die erklären können, warum bei vielen gesunden Frauen *Gardnerellen* in geringer Konzentration mittels PCR gefunden worden sind, diese jedoch keine Symptome hervorrufen.

Auf der Basis der Arbeit von Ahmed *et al.* (69), konnten durch kladenspezifische Gensequenzen FISH-Sonden entwickelt werden. Einige Arbeiten haben mittels PCR bei vaginalen Abstrichen die erwähnten Klade, in der Regel an hauptsächlich gesunden Frauen, untersucht (31, 81-83). Bis jetzt wurden die einzelnen Klade noch nie in ihrer Morphologie und ihren räumlichen Verhältnissen zueinander untersucht.

In der hier vorliegenden Arbeit werden die neu entwickelten FISH-Sonden zum ersten Mal beschrieben und die Ergebnisse der Analyse primärer Bakterienkulturen von an BV erkrankten Frauen besprochen.

Ziel ist es, die vier Klade nach Ahmed *et al.* (69) mittels FISH bei Frauen mit BV zu untersuchen. Dies ermöglicht die Untersuchung der Verteilung der Klade und eröffnet die Möglichkeit der Analyse des Wachstumsverhaltens von *Gardnerellen* bei Frauen mit BV. Damit kann auch festgestellt werden, ob primäre Bakterienkulturen eine gute Alternative für zukünftige Untersuchungen sind, da es bis heute keine adäquaten *in vitro* Modelle gibt.

## 3. METHODIK

### 3.1 Proben

Es wurden 51 Agar-Platten von primären Bakterienkulturen, welche im Zeitraum vom 07.01.2016 - 03.02.2016 gesammelt wurden, untersucht. Alle Proben entstammen dem Labor Berlin. Bei den untersuchten Proben handelt es sich um 25 Zervix- und 26 Vaginalabstriche von Frauen mit BV und positivem *G. vaginalis* Befund. Wurden mindestens drei der vier Amsel-Kriterien erfüllt, wurde die Diagnose BV gestellt und ein Abstrich für die mikrobiologische Untersuchung genommen. Es liegt ein Ethikvotum vor.

### 3.2 Verblindung

Den Proben wurde nach ihrem Eingang eine fortlaufende fünfstellige Labornummer zugewiesen und in die zum Labor zugehörige, anonymisierte, separate Datenbank aufgenommen. Diese Nummer erlaubt keinen Rückschluss auf patientenbezogene Daten. Eine Entblindung wurde nach der Datenauswertung nicht durchgeführt, da sie für die wissenschaftliche Fragestellung nicht erforderlich ist.

### 3.3 Probenpräparation

Untersucht wurden primäre Bakterienkulturen von Agar-Platten. Nach zweitägiger Anzucht unter anaeroben Bedingungen wurde mittels einer Impfschlinge durch das dickste Wachstum einer nicht ausgesuchten Kolonie gestrichen. Anschließend wurde die Schlinge in ein mit 100 µl 0,9% Natriumchlorid-Lösung (NaCl) befülltes 2 ml Eppendorf-Röhrchen getaucht und in der Flüssigkeit mehrfach gedreht, um möglichst viele Bakterien von der Impfschlinge in die Flüssigkeit zu transportieren. Anschließend wurden auf 1500 µl mit Carnoy-Lösung (Ethanol/Essigsäure/Chloroform; 6/6/1) die Proben damit fixiert und 1 Stunde stehengelassen. Um die festen Bestandteile zu trennen, wurden die Proben für 3 min bei 6000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und anschließend auf 250µl mit Carnoy-Lösung aufgefüllt. Das fixierte Material wurde in Eppendorf Röhrchen belassen und bei 8°C gekühlt gelagert.

### 3. METHODIK

#### 3.4 Hybridisierung-Prozess

##### 3.4.1 Vorbereitung der Hybridisierung

Um ein Zerlaufen der Probenflüssigkeit zu verhindern, wurden auf SuperFrost-Objektträger Plus (Langenbrinck, Emmendingen) mittels PAP-Pen (Kisker-Biotech, Steinfurt) zwei 10mm x 10mm große Felder markiert. Die Inhaltsstoffe des PAP-Pens sind temperaturstabil, verursachen kaum Autofluoreszenz und reagieren nicht mit den im Hybridisierungsprozess verwendeten Chemikalien (84). In das Markierungsfeld wurden 5 µl Carnoy-Probenflüssigkeit in jedes Feld gegeben. Vor dem Auftragen wurde mit einem Vortex-Gerät (Labinco, Breden, Niederlande) die Probe durchmischt, damit eine annähernd gleichmäßige Verteilung des Probenmaterials entsteht und ähnliche Verteilungen bei unterschiedlichen Sonden erreicht werden konnten. Anschließend wurden die mit Probenflüssigkeit versehenen Objektträger 30 min bei 50°C im Universalwärmeschrank (Memmert, Schwabach) gelagert. So trocknet die Probenflüssigkeit, die festen Inhalte haften besser am Objektträger und gehen bei der weiteren Verarbeitung nicht verloren. Für jede Sonde wurde je Probe ein Feld angelegt. Zur Vereinfachung des Arbeitsprozesses und Fehlerminimierung wurde in einem Hybridisierungsvorgang eine Oligonukleotidsonden-Färbekombination für alle Proben verwendet.

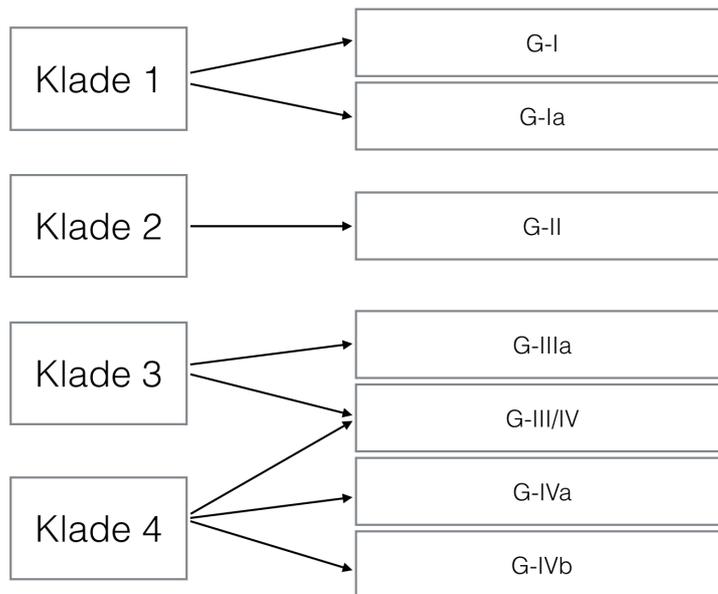
##### 3.4.2 Oligonukleotidsonden

Die verwendeten Oligonukleotidsonden markieren die ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA). Sie sind komplementär zu spezifischen rRNA-Abschnitten, binden an diese und machen sie, über einen an sie gekoppelten Farbstoff, unter einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Ahmed *et al.* (69) waren in der Lage, vier verschiedene Kladen des Bakteriums *G. vaginalis* durch vergleichende Genanalysen von 17 *G. vaginalis* Isolaten zu bestimmen. Basierend darauf wurden kladenspezifische FISH-Sonden von Guschin *et al.* entwickelt. Die Sonde G-Ia ist dabei komplementär zu 16S-rRNA, die verbleibenden Sonden G-I, G-II, G-III/IV, G-IIIa, G-IVa und G-IVb markieren 23S-rRNA. Die Zugehörigkeit von Sonden und Kladen ist in der Abbildung 2 enthalten. Es wurde jeweils eine unspezifische, alle *G. vaginalis* anfärbende Sonde und eine kladenspezifische Sonde kombiniert. In Abbildung

### 3. METHODIK

3 ist das räumliche Verhältnis der Sonden zueinander auf dem Genom dargestellt. Für jede Probe wurde eine Gegenfärbung mit 4', 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) durchgeführt, da diese Desoxyribonukleinsäure (DNA) und RNA färbt. Die verwendeten *Gardnerella* Sonden mit der entsprechenden Gensequenz sind in Tabelle 6 gezeigt.



*Abbildung 2: Kladenzugehörigkeit der Sonden*

Das Bild zeigt die Zugehörigkeit zwischen Sonden und Kladen. Bis auf Klade 2 wird jede Klade durch mindestens zwei Sonden repräsentiert. Sonde G-III/IV ist die einzige multi-Kladen Sonde, die sowohl Klade 3 und 4 markiert.

### 3. METHODIK

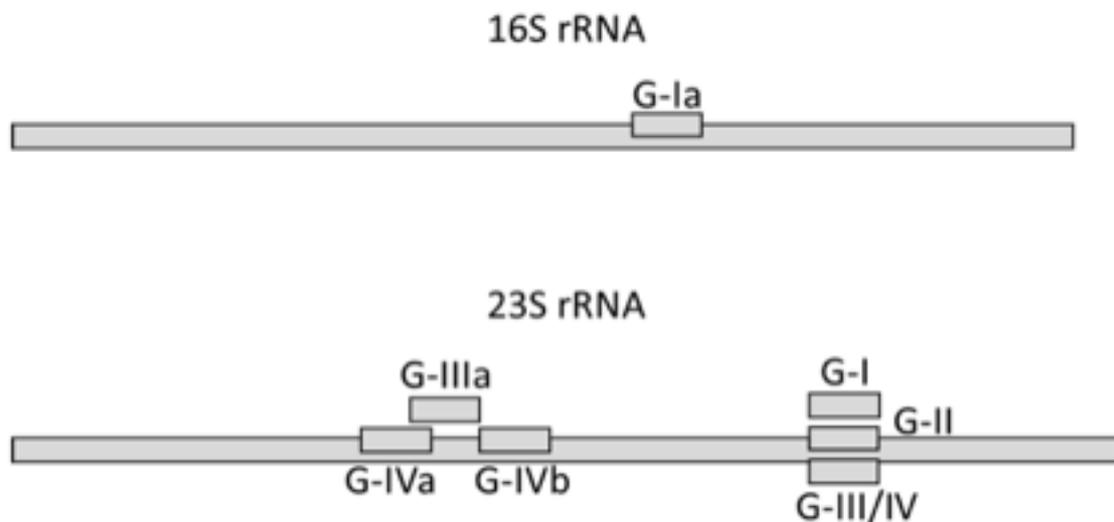


Abbildung 3: Lage der Sonden auf der rRNA

Hier dargestellt sind die Zielsequenzen der neuen Oligonukleotidsonden im räumlichen Verhältnis zueinander. Anhand dieser Abbildung wird deutlich, dass besonders für die Sonden G-I, G-II, G-III/IV ein erhöhtes Risiko für Kreuzreaktionen vorhanden ist.

Um einen Überblick zu erhalten, welche Bakterien und Bakteriengruppen in den primären Bakterienkulturen vorkommen und trotz *Gardnerellen* spezifischen Bedingungen wachsen, wurden Färbungen, die große Bakteriengruppen darstellen, gesucht. Außerdem sind diese Färbungen notwendig, um im Verlauf der Arbeit zu entscheiden, mit welchen Sonden ein Test auf Kreuzreaktion mit den neuen *Gardnerellen* Sonden möglich ist. Dieser Test ist nur dann sinnvoll, wenn das entsprechende Bakterienmaterial in den Proben auch vorhanden ist. Die Auswahl der gesuchten Bakteriengruppen erfolgte nach Erfahrungen aus vorangegangenen Arbeiten von Swidsinski *et al.* (16). Eine Übersicht der verwendeten Sonden und die dazugehörige Zielsequenz, ist in den Tabellen 6 und 7 dargestellt.

### 3. METHODIK

*Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotidsonden*

<b>Sondenname</b>	<b>Ziel-Sequenz</b>	<b>Referenz</b>
GardV	CCA CCG TTA CAC CGC GAA	Swidsinski <i>et al.</i> (16)
G-I	GCG GTA TTT CAC TGA TCG ACT C	
G-Ia	CAT GAA GCA ACC CGT TGT ACT G	
G-II	GCG GTA TTT CAC TTG TTG ACT C	
G-III/IV	GCG GTA TTT CAC CTG TCG ACT C	
G-IIIa	CAA CCC CGA AAG GAA GCC AGC	
G-IVa	AGG CAA TCA ACC AGC AAA TGA AG	
G-IVb	AGT CCC AAC ACA AAC CAG CCA AC	
DAPI	DNA- und RNA-beinhaltende Strukturen	Kapuscinski <i>et al.</i> (85) Tanius <i>et al.</i> (86)

### 3. METHODIK

Table 7: Sonden der großen Bakteriengruppen

Name	Ziel-Sequenz	Referenz
Bif164	<i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp. CAT CCG GCA TTA CCA CCC	Langendijk <i>et al.</i> (87)
Ato291	<i>Atopobium</i> cluster GGT CGG TCT CTC AAC CC	Harmsen <i>et al.</i> (88)
Cdif198	<i>Clostridium difficile</i> TCC ATC CTG TAC TGG CTC ACC	Fallani <i>et al.</i> (89)
Clit135	<i>Clostridium lituseburense</i> group including <i>C. difficile</i> GTT ATC CGT GTG TAC AGG G	Franks <i>et al.</i> (90)
Chris150	<i>Clostridium histolyticum</i> TTA TGC GGT ATT AAT CTY CCT TT	Franks <i>et al.</i> (90)
BAC303	most <i>Bacteroidaceae</i> CCA ATG TGG GGG ACC TT	Manz <i>et al.</i> (91)
Erec482	<i>Eubacterium rectale</i> , <i>Clostridium coccooides</i> group GCT TCT TAG TCA RGT ACC G	Franks <i>et al.</i> (90)
Cor653	<i>Coriobacterium</i> group CCC TCC C(A/C) TAC CGG ACC C	Franks <i>et al.</i> (90)
Lab158	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp. GGT ATT AGC A(T/C)C TGTT TCC A	Hermie <i>et al.</i> (92)
Rbro730	<i>Clostridium sporosphaeroides</i> , <i>Ruminococcus bromii</i> , <i>Clostridium leptum</i> TAA AGC CCA GYA GGC CGC	Harmsen <i>et al.</i> (93)
Cf 319a	most <i>Flavobacteria</i> , some <i>Bacteroidetes</i> TGG TCC GTG TCT CAG TAC	Manz <i>et al.</i> (91)
LGC354b	<i>Firmicutes</i> CGG AAG ATT CCC TAC TGC	Meier <i>et al.</i> (94)

### 3. METHODIK

Str450	all <i>Streptococci</i> TAG CCG TCC CTT TCT GGT	Thurnheer <i>et al.</i> (95)
Ebac1790	<i>Enterobacteriaceae</i> CGT GTT TGC ACA GTG CTG	Bohnert <i>et al.</i> (96)

#### 3.4.3 Farbstoffe

Es wurde ein direkter Nachweis mittels FISH von RNA-Sequenzen durchgeführt. Ein direkter Nachweis bedeutet, dass die Farbstoffe an den Oligonukleotidsonden befestigt sind. Zum einen wurden cyaninehaltige Farbstoffe Cy3 und Cy5 verwendet, sowie DAPI. Die verwendeten Farbstoffe sind fluoreszierend, d.h. durch die Anregung mittels Licht, generiert über das Mikroskop, werden die Farbstoffe zur spontanen Emission von Licht gebracht. Die fluoreszierenden Moleküle absorbieren bei Lichtexposition Photonen. Dadurch werden Elektroden auf ein höheres Energieniveau gebracht. Dieser Zustand ist instabil. Durch Rückkehr in das ursprüngliche Energieniveau wird Energie in Form von Licht freigesetzt. Das absorbierte Licht ist dabei mit 20 nm - 50 nm kurzwelliger als das emittierte Licht, die sogenannte Stokes-Verschiebung (97). Die verwendeten Farbstoffe erscheinen bei Cy3 gelb, bei Cy5 infrarot und DAPI blau. Bis auf Cy5 sind die hier verwendeten Farbstoffe mit dem bloßen Auge erkennbar. Cy5 ist mit seiner Emission von 650nm nicht für das menschliche Auge wahrnehmbar. Hier wird mit Hilfe von Live-Aufnahmen über einen an das Mikroskop gekoppelten Computer die Färbung sichtbar gemacht.

Durch Verwendung verschiedener Oligonukleotidsonden, an denen jeweils ein anderer Farbstoff gekoppelt ist, können unterschiedliche Sachverhalte gleichzeitig dargestellt werden. In dieser Arbeit wird damit die Differenzierung zwischen allen *Gardnerellen* und der jeweiligen Klade möglich. Eine Übersicht der verwendeten Farbstoffe und ihren physikalischen Eigenschaften ist in Tabelle 8 dargestellt.

### 3. METHODIK

*Tabelle 8: Physikalische Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe, modifiziert nach Moter et al. und PubSpectra Datenbank (86, 87)*

<b>Farbstoff</b>	<b>Absorption in nm</b>	<b>Emission in nm</b>	<b>Farbe</b>
Cy3	550	570	gelb
Cy5	650	670	infrarot
DAPI	377	447	hellblau

#### 3.4.4 Hybridisierung

Die Zusammensetzung der Hybridisierungslösung ist in Tabelle 9 dargestellt. Zur Vereinfachung des Arbeitsprozesses wurden immer 2 ml hergestellt und anschließend die Menge der Lösung an die Anzahl der Felder angepasst. Erst danach wurde Sondenflüssigkeit hinzugefügt. Es wurden 30 µl Hybridisierungslösung mit 0,3 µl Sondenflüssigkeit je markiertem Feld verwendet. Zur Vereinfachung wurde auf 16 µl Sondenflüssigkeit aufgerundet. Nach Fertigstellung der Hybridisierungslösung wurden 30 µl pro Feld aufgetragen und anschließend in einem feuchten, geschlossenen Behälter bei 50°C für 60 min in einem Hybridisierungsofen (MWG-Biotech, Ebersberg) inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit Aqua dest. abgespült und getrocknet, bevor sie mit 20 µl DAPI je Feld für 7 min eingefärbt wurden. Auch hier wurden die Proben im Anschluss mit Aqua dest. gespült und getrocknet. Während der Verwendung der Sonden wurde darauf geachtet, dass abgedunkelte Arbeitsbedingungen bestanden.

### 3. METHODIK

*Tabelle 9: Hybridisierungslösung*

<b>Menge</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Stoff</b>
360 µl	5M	NaCl
40 µl	1M	Tris-HCl
20 µl	100 %	Formamid
1570 µl	100 %	Aqua dest.
10 µl	10 %	SDS

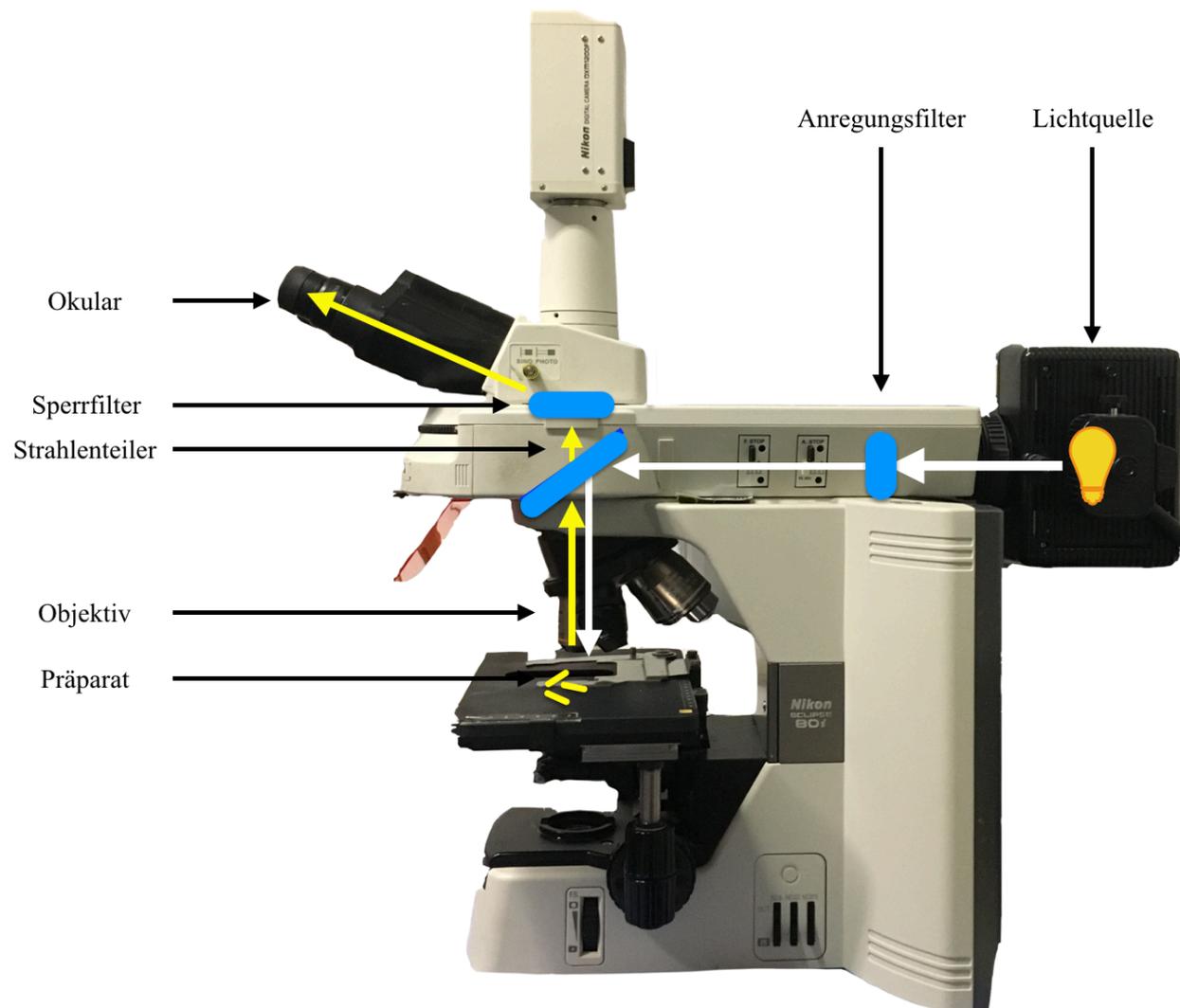
#### 3.5. Mikroskopaufbau und Funktionsweise

Bei der Fluoreszenzmikroskopie gibt es mehrere entscheidende Unterschiede zu den geläufigeren Durchlichtmikroskopen. Der für das Verständnis wichtigste Aspekt ist, dass das am Ende gesehene Bild aus Fluoreszenzlicht besteht, welches im Präparat erst nach dem Auftreffen des Anregungslichts entsteht. Das gesehene Bild ist also nicht, wie bei der Durchlichtmikroskopie, vorhanden, sondern es entsteht erst nach Auftreffen von Licht im Präparat. Da das Präparat Licht emittiert, ist es nicht wichtig, wo die Lichtquelle des Fluoreszenzmikroskops liegt. Es ist aber essentiell, dass die vom Präparat ausgehende Fluoreszenz durch Filter von dem Anregungslicht getrennt wird.

Die Funktionsweise ist wie folgt: Das Fluoreszenzmikroskop (Nikon, Tokio, Japan) besteht aus einer Lichtquelle, einem Anregungsfilter, einem Sperrfilter, einem strahlenteilenden (dichromatischen) Spiegel, einem Objektiv und einem Okular. In der Lichtquelle entsteht Licht, dieses wird durch einen Anregungsfilter geleitet, der nur bestimmte Wellenlängen durchlässt. Es wird nicht die Wellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffs durchgelassen. Das gefilterte Anregungslicht fällt nun auf einen strahlenteilenden Spiegel dieser projiziert das Anregungslicht auf das Präparat. In diesem Moment entsteht die Fluoreszenz des Präparates und somit das gewünschte Bild. Damit nun die Fluoreszenz der verwendeten Sonden sichtbar wird, wird die vom Präparat ausgehende, sich in alle Richtungen des Raumes ausbreitende Strahlung, also auch in Richtung des strahlenteilenden Spiegels, von diesem gefiltert. Der strahlenteilende Spiegel lässt nur das längerwellige Licht der zur Fluoreszenz angeregten Sonden durch. Für ein intensiveres Bild und um Ungenauigkeiten des Spiegels auszugleichen, gibt es

### 3. METHODIK

einen Sperrfilter direkt vor dem Okular. Dieser filtert störende Fluoreszenzsignale heraus; nur die gewünschten Emissionen werden durchgelassen (98).



*Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines FISH Mikroskops*

Schematischer Aufbau eines FISH Mikroskops. Die Funktionsweise ist im Text beschrieben.

### 3. METHODIK

#### 3.6 Analyse der Proben

Nach Hybridisierung wurden die Proben innerhalb von einer Woche mikroskopisch analysiert. Auf jedem Objektträger wurde vor der Analyse ein Tropfen Pufferlösung, Zusammensetzung in Tabelle 10 sichtbar, gegeben. Darauf wurde ein Objektträger-Deckglas (Menzel-Gläser Glasbearbeitungswerk, Braunschweig) gelegt und zum Abschluss einen Tropfen Immersionsöl 518 F (Carl Zeiss, Oberkochen) getropft.

*Tabelle 10: Zusammensetzung der Pufferlösung*

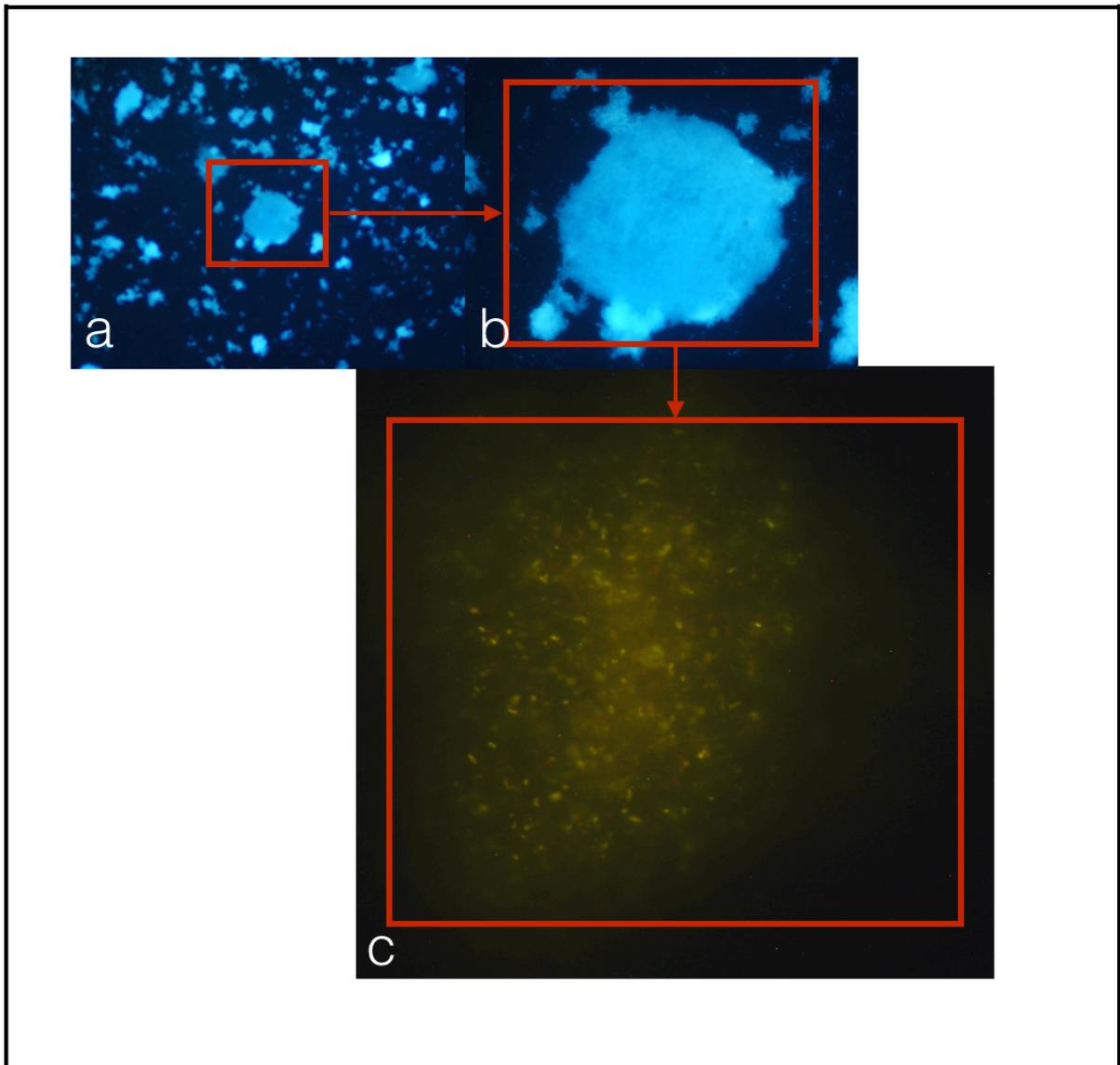
<b>Menge</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Stoff</b>
1 ml Tris	1M	Tris-HCL
1 ml	5M	NaCl
48ml	100 %	Aqua dest.

##### 3.6.1 Visuelle Analyse der Proben

Es gibt von Swidsinski *et al.* festgelegte Kriterien zur Identifikation von Bakterien mittels FISH (99). Sie müssen typische Bakterienformen haben, in der DAPI Färbung darstellbar sein, keine Kreuzreaktion mit anderen FISH-Sonden eingehen und von mindestens einer anderen gruppen- oder speziesspezifischen Sonde anfärbbar sein (99). Da es sich um die Analyse von primären Bakterienkulturen handelt und nicht um Biopsien, ist die quantitative Bestimmung der Bakterien nicht angebracht. Deshalb wurde zuerst mit der DAPI-Färbung nach Bakterienansammlungen gesucht (siehe Abbildung 5). Anschließend wurde mit der Cy3 Färbung nach den Bakterien der spezifischen Sonde gesucht und im Anschluss mit der Cy5 Färbung verglichen. Es wurde das Verhältnis des positiven Anteils der spezifischen Sonde zur Gesamtfläche des Bakterienkonglomerates in Prozent geschätzt. Dieses Prozedere wurde an mehreren Stellen eines Objektträgers durchgeführt, dann die repräsentativste Prozentzahl ermittelt und in den Gruppen 0 bis 5 zugeordnet. Die Ergebnisse wurden anschließend, wie in Tabelle 11 dargestellt, übersetzt. Beispielbilder und ihre entsprechende Übersetzung sind in Abbildung 6 dargestellt. Die Ermittlung der absoluten Quantität ist nicht sinnvoll, da sie lediglich die

### 3. METHODIK

Reaktion auf die Wachstumsbedingungen darstellt. Sich unter dem Mikroskop klar darstellende Bakterien wurden ab der Gruppe 1 als positiv gewertet.



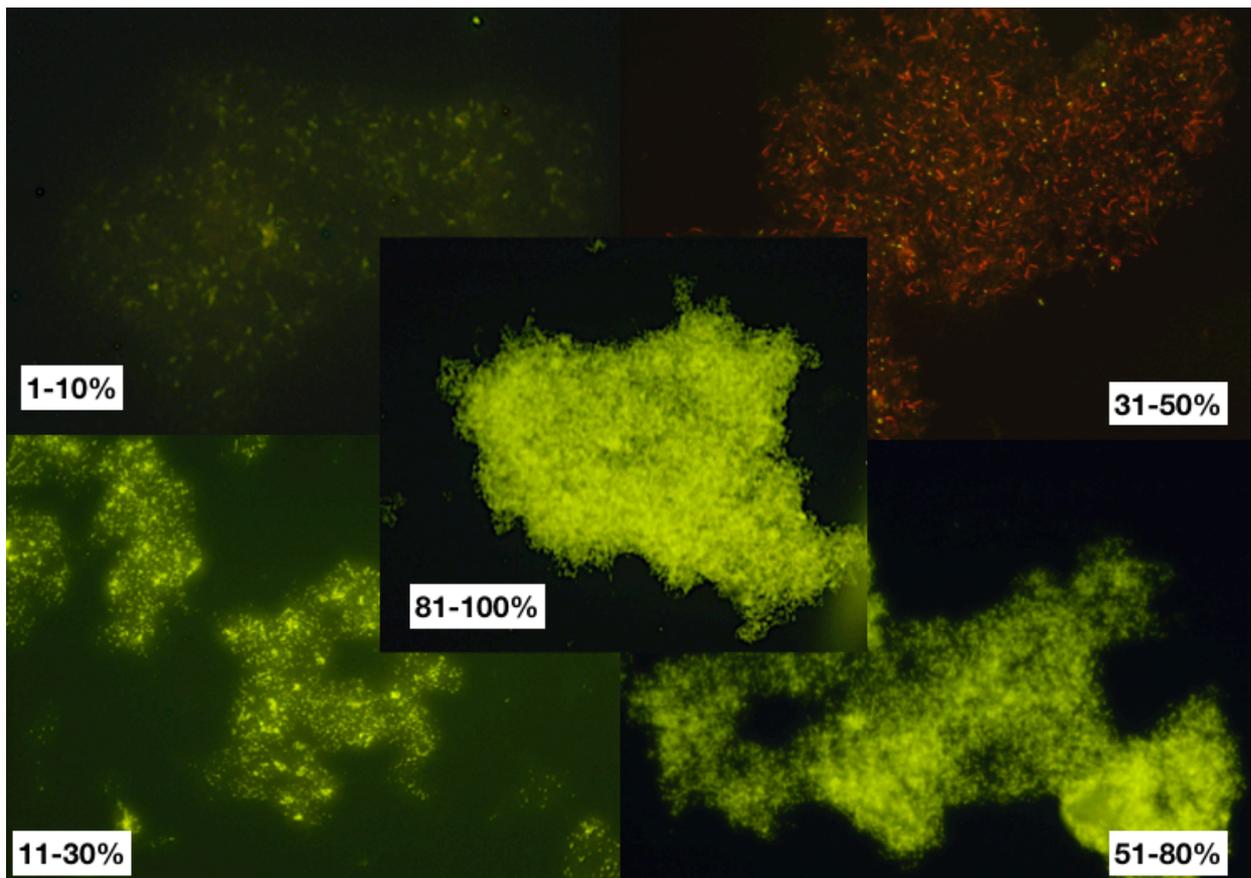
*Abbildung 5: Vorgehensweise bei der visuellen Probenanalyse*

Vorgehensweise bei der visuellen Probenanalyse. Zuerst wurde in der DAPI-Färbung mittels der 10-fachen Vergrößerung nach Bakterienkonglomeraten gesucht. Wurde eine entsprechende gefunden (a), wurde auf eine 40-fache Vergrößerung umgestellt (b). Um nun, wie in diesem Fall die G-I Färbung in Cy3 zu sehen, wurde der Filter gewechselt (c). Die abgebildete Bakterienansammlung wurde auf 5% geschätzt. Die Belichtung des Bildes (c) wurde mit dem Programm Keynote erhöht.

### 3. METHODIK

*Tabelle 11: Übersetzung der visuell erhobenen Ergebnisse*

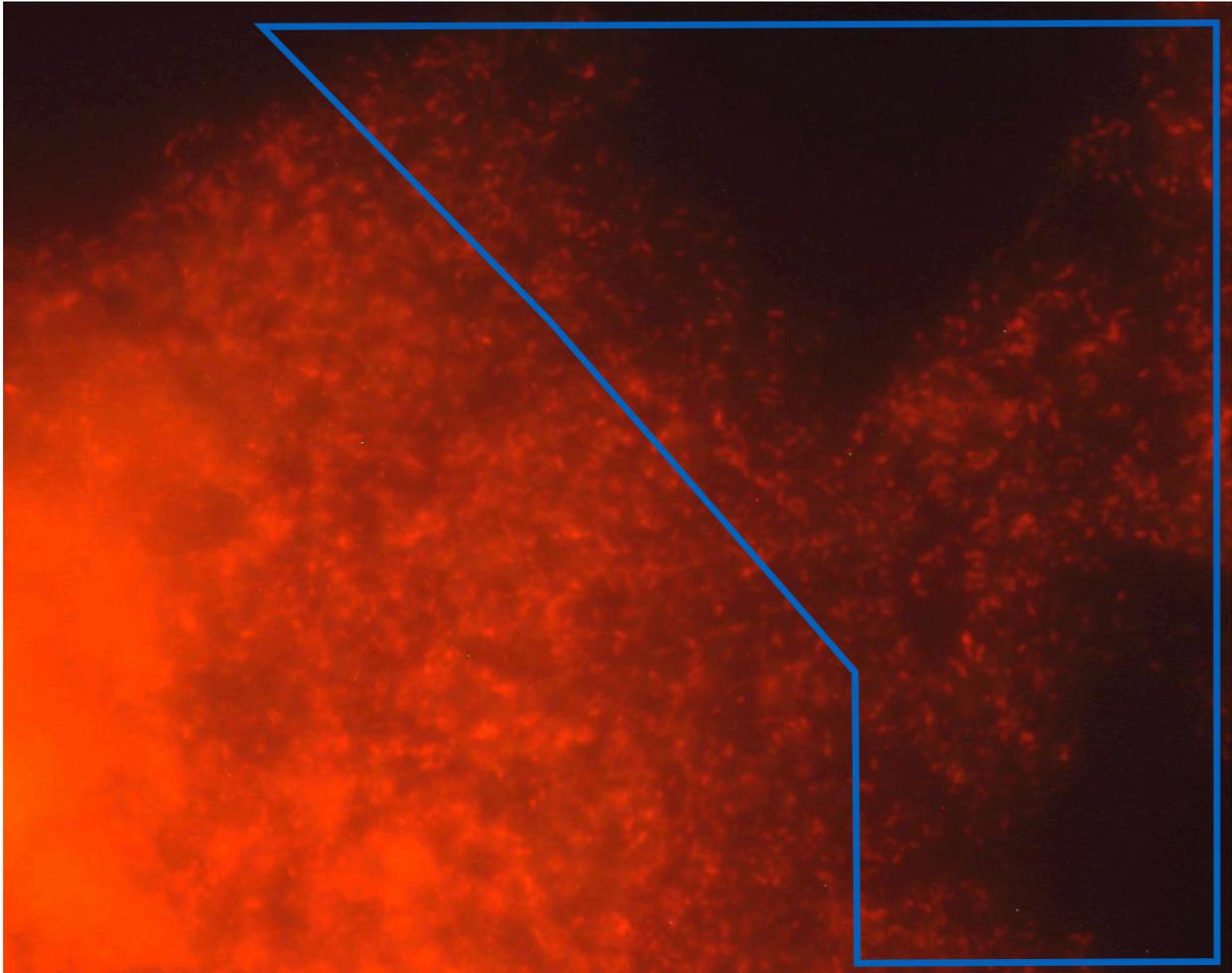
<b>Prozent</b>	<b>Übersetzung bzw. Gruppe</b>
0	0
1-10	+
11-30	++
31-50	+++
51-80	++++
81-100	+++++



*Abbildung 6: Beispielbilder und dazugehörige prozentuale Einschätzung*

Zur besseren Darstellbarkeit wurden die Belichtung der Bilder erhöht im Programm Keynote.

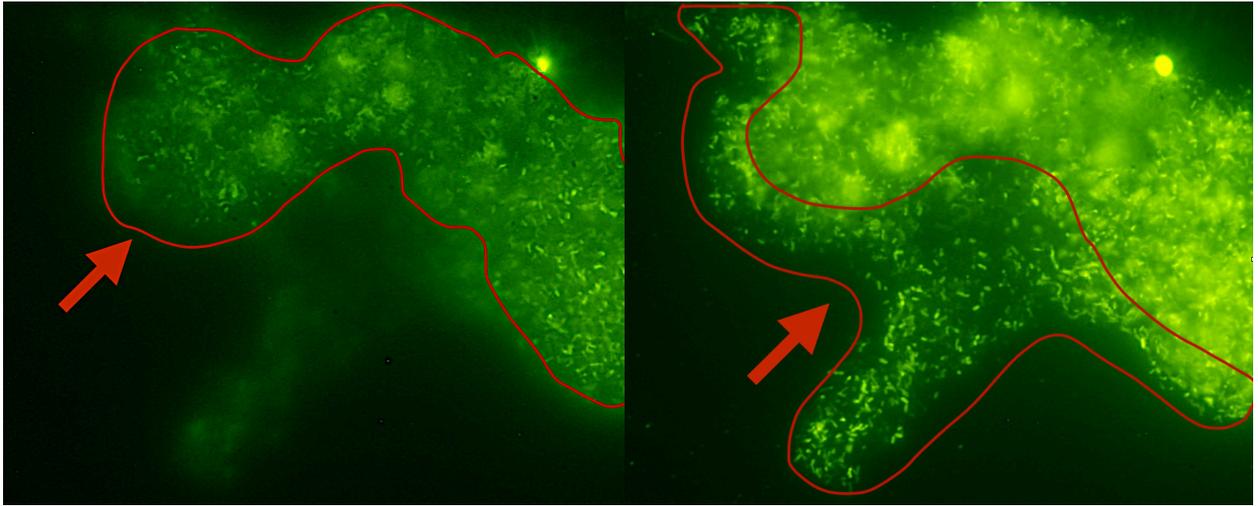
### 3. METHODIK



*Abbildung 7: Beispiel einer Gard662-Färbung*

Dargestellt ist eine Gard662-Färbung in Cy5. Deutlich wird hier die Problematik der Fotodokumentation. Da es sich um Bakterienkonglomerate handelt und nicht um 3  $\mu\text{m}$  Paraffinschnitte, ist es nicht möglich, bei dickeren Bakterienanhäufungen eine gleichmäßige Fokussierung zu erhalten. Da diese nicht in einer Ebene sondern übereinander liegen, ist ein Fokussieren für ein Foto nur in Teilabschnitten möglich, wie in dieser Abbildung nur in der blauen Box. Außerhalb dieser stellen sich die Bakterien als unscharf dar. Während der Analyse am Mikroskop wurden diese Konglomerate durch Fokussierung der verschiedenen Ebenen analysiert. Die Belichtung des Bildes wurde mit dem Programm Keynote erhöht zur besseren Darstellbarkeit.

### 3. METHODIK

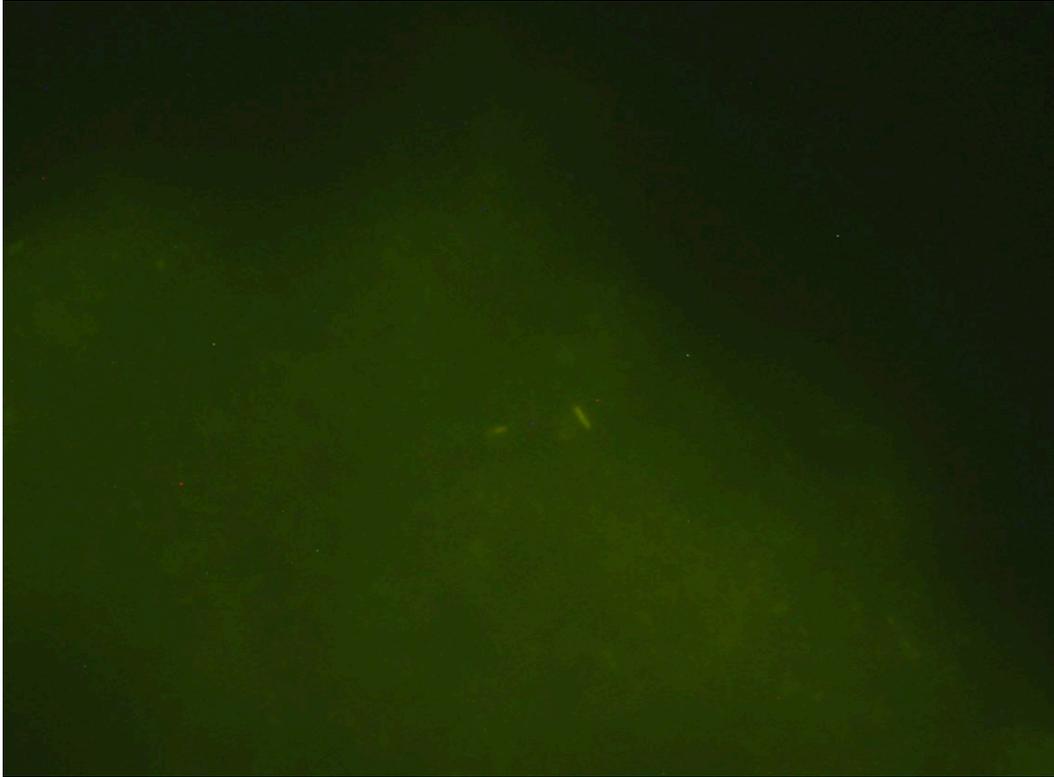


*Abbildung 8: Darstellung verschiedener Ebenen*

Auf der linken und rechten Seite ist jeweils dieselbe Bakterienanhäufung dargestellt. Das rot umrandete und mit einem Pfeil markierte Areal ist fokussiert. Durch Einstellung der Tiefenschärfe am Mikroskop können verschiedene Ebenen dargestellt werden.

Diese Durch-Fokussierung wurde, wenn nötig, immer durchgeführt. Die Dicke der Bakterienkonglomerate trägt dazu bei, dass sehr gute Fotoergebnisse schwierig zu erzielen waren, da die Fokussierung nur auf einer Ebene technisch möglich ist.

### 3. METHODIK



*Abbildung 9: Beispielfoto für einzelne Bakterien*

Beispielfoto für einzelne Bakterien. Hier sind zwei einzelne *Laktobazillen* dargestellt. Die Belichtung des Bildes wurde mit dem Programm Keynote erhöht zur besseren Darstellbarkeit.

### 3. METHODIK

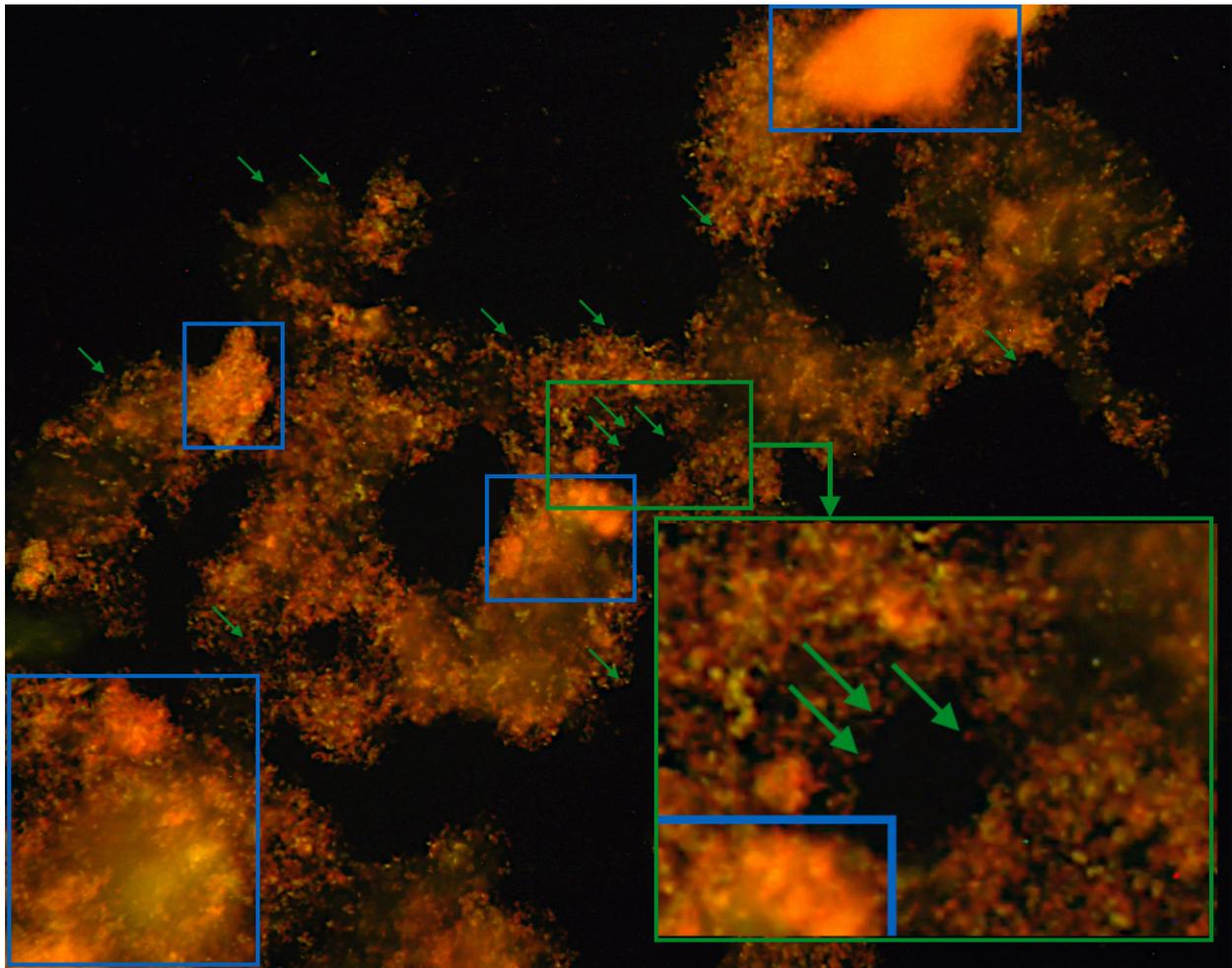
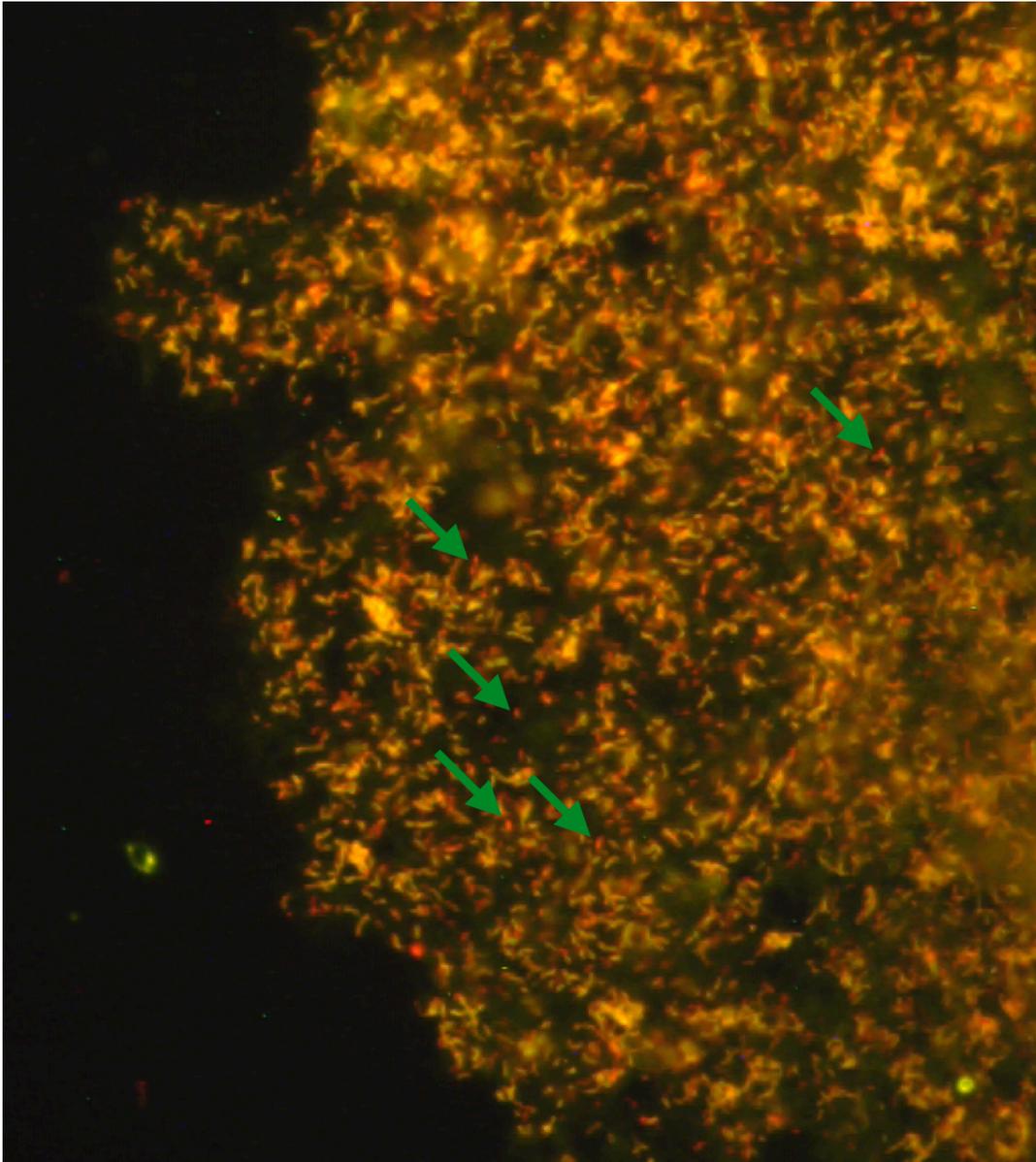


Abbildung 10: Beispielfoto einer G-II und Gard662 Färbung

Zu sehen ist eine Abbildung in 400-facher Vergrößerung, in dem die Cy3 und Cy5 Färbungen überlagernd fotografisch aufgenommen worden sind. Auffällig ist die ubiquitäre orange Färbung. Es gibt jedoch Bakterien, die hauptsächlich rot gefärbt sind (grüne Pfeile). Dies sind *Gardnerellen*, die nicht der Klade 2 zugehören. Dieses Foto stellt demnach multiple Kladen in einer Probe dar. Die blauen Kästen stellen Bereiche dar, die in der Fotodokumentation nicht scharf fokussiert dargestellt werden können, weil die Bakterienansammlungen zu dick sind.

### 3. METHODIK



*Abbildung 11: Inkongruenz zwischen G-III und Gard662 Färbung*

Hier in der 1000-fachen Vergrößerung deutlich zu sehen sind *Gardnerellen* der Klade 3 in Orange dargestellt, da Sonden mit gelblichem und rotem Farbstoff mit rRNA reagiert haben. Gleichzeitig gibt es vereinzelte Bakterien in Rot, deutlich gemacht durch die grünen Pfeile. Daraus kann geschlossen werden, dass es in dieser Probe auch *Gardnerellen* aus anderen Kladen gibt, die nicht von G-III angefärbt wurden, jedoch von der Gard662 in Cy5. Die Belichtung des Bildes wurde mit dem Programm Keynote erhöht zur besseren Darstellbarkeit.

### 3. METHODIK

#### 3.7 Ausschluss von Kreuzreaktionen

Da es sich um neu entwickelte Sonden handelt, gibt es die Wahrscheinlichkeit der Kreuzreaktion mit Bakterienspezies und Bakteriengruppen, die nicht erwünscht ist. Um zwischen gewünschter Reaktion mit der jeweiligen Gen-Sequenz und einer Kreuzreaktion zu differenzieren, wurde eine Hybridisierung mit den Sonden G-Ia, G-III-IV, G-IIIa, und G-IVa in Cy3 mit den Sonden Str405, Ato291, BAC303 und LAB158 in Cy5 oder Clit135, LGC254b und Cf319a in Cy5 als Gegenfärbung durchgeführt. Da G-I, G-II und G-III/IV auf dem gleichen Gen liegen, wurde exemplarisch die Sonde G-III/IV als Test-Sonde gewählt. Dasselbe gilt für die Sonden G-IVa und G-IVb. Auch diese liegen auf dem gleichen Gen, deshalb wurde die Sonde G-IVa als Testsonde ausgesucht. Mit den für die Cy5 Färbung gewählten Sonden wurden die wichtigsten großen Bakteriengruppen abgedeckt. Um Materialvolumen zu sparen, wurden jeweils in der chronologischen Labornummer-Reihenfolge zehn Proben zusammengemischt und somit das Material auf fünf zu untersuchende Proben gepoolt.

### 3. METHODIK

#### 3.8 Materialien und Geräte

*Tabelle 12: Geräte*

<b>Geräte</b>	<b>Typ</b>	<b>Bezugsfirma</b>
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse 80i	Nikon, Tokio, J
Hg-Hochdrucklampe	C-SHG1	Nikon, Tokio, J
Hybridisierungssofen	Hybaid Mini Oven	MWG-Biotech, Ebersberg
Kamera	DXM 1200F	Nikon, Tokio, J
Universalwärmeschrank	ULE400	Memmert, Schwabach
Vortexgerät	Labinco L24 Vortex	Labinco, Breden, NL
Pipette	Eppendorf Research Pipette 100-1000	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette	Eppendorf Research 20- 200	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette	Finnipette 5-50	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kühlschrank		Liebherr, Bulle, S
Kühltruhe		Liebherr, Bulle, S
Zentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg

### 3. METHODIK

*Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien*

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Bezugsfirma</b>
2 ml Röhrchen	Eppendorf, Hamburg
50 ml Röhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA Sarstedt, Nümbrecht
200 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
1000 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Immersionsöl 518F	Carl Zeiss, Oberkochen
PAP-Stift	Kisker-Biotech, Steinfurt
SuperFrost plus Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
0,1-20 Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser 21x26 mm	Menzel-Gläser Glasbearbeitungswerk, Braunschweig
Impfschlinge	Sarstedt, Nümbrecht

### 3. METHODIK

*Tabelle 14: Reagenzien*

<b>Reagenzien</b>	<b>Bezugsfirma</b>
Bidestilliertes Wasser	Charité, Berlin
Chloroform	PanReac AppliChem, Missouri, USA
DAB9 DAPI, min. 98 %	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100 %, Rotipuran	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, 96 %, EMSURE	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
SDS ultra pure 10%	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS	Merck, Darmstadt

### 3. METHODIK

*Tabelle 15: Bezugsquelle der Oligonukleotidsonden*

<b>Oligonukleotidsonden</b>	<b>Bezugsfirma</b>
G-I	BioTeZ, Berlin-Buch
G-Ia	BioTeZ, Berlin-Buch
G-II	BioTeZ, Berlin-Buch
G-III/IV	BioTeZ, Berlin-Buch
G-IIIa	BioTeZ, Berlin-Buch
G-IVa	BioTeZ, Berlin-Buch
G-IVb	BioTeZ, Berlin-Buch
GARD 662	BioTeZ, Berlin-Buch
DAPI	BioTeZ, Berlin-Buch
Bif164	BioTeZ, Berlin-Buch
Ato291	BioTeZ, Berlin-Buch
Clit135	BioTeZ, Berlin-Buch
Cdif198	BioTeZ, Berlin-Buch
Chris150	BioTeZ, Berlin-Buch
Rbro730	BioTeZ, Berlin-Buch
BAC303	BioTeZ, Berlin-Buch
Erec482	BioTeZ, Berlin-Buch
Cor653	BioTeZ, Berlin-Buch
Lab158	BioTeZ, Berlin-Buch
LGC354b	BioTeZ, Berlin-Buch
Str405	BioTeZ, Berlin-Buch
Ebac1790	BioTeZ, Berlin-Buch

### 3. METHODIK

*Tabelle 16: Verwendete Software*

<b>Software</b>	<b>Bezugsfirma</b>
Inkscape	Open-Source Projekt, sourceforge
MiKTeX	C. Schenk, Berlin
Mikroskopie Fotosoftware ACT-1	Nikon, Tokio, Japan
MS Excel 2003	Microsoft, Redmond, USA
MS Access 2003	Microsoft, Redmond, USA
TeXnicCenter	S. Wiegand, T. Weinkauff, Saarbrücken
Keynote	Apple, Cupertino, Kalifornien, USA

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Einführung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Analyse von insgesamt  $n = 51$  Proben, davon  $n = 26$  Vaginalabstriche und  $n = 25$  Zervixabstriche von prämenopausalen Frauen, dargestellt.

Die  $n = 26$  Vaginal- und  $n = 25$  Zervixabstriche wurden mit der alle *Gardnerellen* markierenden Sonde GARD662 mit jeweils einer der kladenspezifischen Sonde G-I - GIVb kombiniert. Eine Probe der Vaginalabstriche musste herausgenommen werden, da sich während der Analyse unter dem Mikroskop herausstellte, dass sich zu wenig Material in der Bakterien-Carnoy-Probenflüssigkeit befand.

Alle anderen Ergebnisse, insgesamt  $n = 50$ , wurden ausgewertet. Die unter dem Mikroskop sich als flau darstellenden Ergebnisse und die Resultate, die als Einzelne klassifiziert worden sind, wurden nicht gewertet. Das Prozedere ist im Flow-Chart in Abbildung 10 dargestellt.

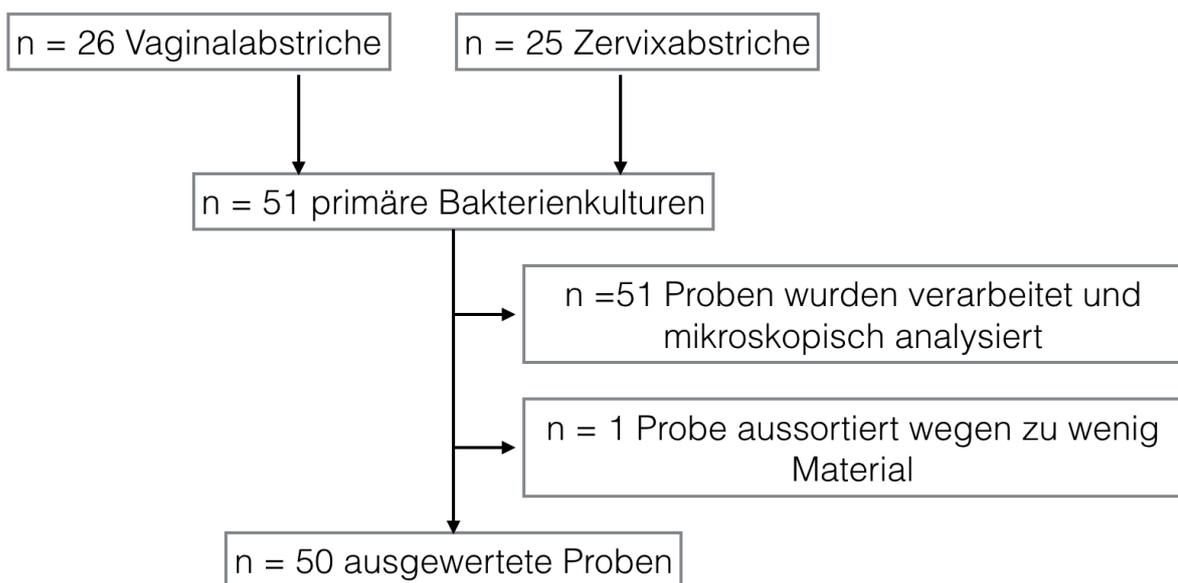


Abbildung 12: Flow-Chart der in die Arbeit integrierten Proben

## 4. ERGEBNISSE

### 4.2 *Gardnerella vaginalis*-Sonden

Die häufigsten positiven *G. vaginalis* Subtypen-spezifischen Sonden sind G-III/IV mit n = 44 (88%) und G-I mit n = 43 (86%). Bis auf die Sonden von G-IVa und G-IIIa, folgen die restlichen Sonden in der Häufigkeit von G-II mit n = 41 (82%), G-IVb mit n = 41 (82%) und G-Ia mit n = 37 (74%) in relativ geringen Abständen. Eine Übersicht der Ergebnisse der spezifischen Sonden ist in Tabelle 17 zu sehen.

Tabelle 17: Anzahl der positiven Ergebnisse je Sonde von n = 50

Sonde	Anzahl der positiven Ergebnisse (%)
G-III/IV	n = 44 (88)
G-I	n = 43 (86)
G-II	n = 41 (82)
G-IVb	n = 41 (82)
G-Ia	n = 37 (74)
G-IVa	n = 26 (52)
G-IIIa	n = 7 (14)

### 4.3 Ergebnisse der Sonden

Im Folgenden wird auf die Resultate der einzelnen Sonden eingegangen. Ein Fokus wird hier auf die Beschreibung der negativen Resultate gelegt, da diese zur Einschätzung der Ergebnisse essentiell sind. Hier muss auf die Gegenfärbung geachtet werden, da diese sicherstellt, ob *G. vaginalis*-RNA überhaupt in der Probe vorhanden war. Ist auch die Gegenfärbung negativ, ist nicht davon auszugehen. Das unter dem Mikroskop gesehene Resultat muss daher entsprechend kritisch bewertet werden.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.3.1 Gard662

Es wurde eine Färbung der Sonde Gard662 in Cy3 durchgeführt um sicherzustellen, dass in allen Carnoy-Bakterienmischungen sich ausreichend *G. vaginalis* befinden. Um mögliche Interaktionen zu vermeiden, wurde keine Gegenfärbung durchgeführt. Darüber hinaus bietet die Cy3 Färbung eine höhere Lichtstabilität und lässt ein längeres Suchen nach positiven Ergebnissen zu. In 90% (n = 45) der Fälle lag ein klar positives Ergebnis vor. In insgesamt n = 3 (6%) der Proben zeigte sich eine geringe Anzahl von Gard662 positiven Bakterien, doch mit einem sehr klaren visuellen Ergebnis. Zwei Proben wurden als flau und damit als negativ eingeordnet. Beide Proben hatten jedoch in den Kladen-spezifischen Sonden und in der jeweiligen Gegenfärbung positive Resultate.

### 4.3.2 G-I

Bei der G-I Färbung sind 86% (n = 43) der Proben positiv getestet worden. In den n = 7 Fällen, die ein negatives Resultat ergaben, war in n = 2 die Gard662 Gegenfärbung positiv, in den restlichen Fällen (n = 6) wurden flauere oder negative Ergebnisse gesehen. Diese sind somit als negativ bewertet worden, da vermutlich kein *Gardnerellen* Material auf dem Objektträger vorhanden war.

### 4.3.3 G-Ia

Eine relativ hohe Anzahl an negativen Proben ist für die Sonde G-Ia mit n = 13 negativen Resultaten zu verzeichnen. Davon haben in n = 6 Gegenfärbungen kein positives Ergebnis.

### 4.3.4 G-II

Die Sonde G-II zeigte n = 9 negative Ergebnisse. Bei n = 4 Proben zeigte sich in der Gegenfärbung kein positives Färbeergebnis. Hier zeigt sich des Weiteren ein Unterschied zwischen den untersuchten Abstrichorten.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.3.5 G-III/IV

Bei der G-III/IV Färbung waren  $n = 6$  Proben negativ. Von diesen konnte bei  $n = 3$  Gegenfärbungen ein positives Färbeergebnis gezeigt werden. Es ist zu beachten, dass es sich hier um die einzige multi-Kladen Sonde handelt. Ist nur die Sonde G-III/IV positiv, lässt sich nicht differenzieren, ob es sich um Klade 3 oder 4 oder Klade 3 und 4 handelt. Weitere Erläuterungen siehe unten im Text.

### 4.3.6 G-IIIa

Von den  $n = 43$  negativen Resultaten der G-IIIa Sonde konnten in der Gard662 Gegenfärbung in  $n = 40$  *G. vaginalis* dargestellt werden.

### 4.3.7 G-IVa

Bei der Sonde G-IVa ist etwas mehr als die Hälfte der untersuchten Kulturen positiv. Damit wurde hier das drittniedrigste Ergebnis erzielt. Hier sind bei  $n = 24$  negativen Ergebnissen  $n = 22$  Gegenfärbungen positiv.

### 4.3.8 G-IVb

Die Sonde G-IVb erzielte  $n = 9$  negative Ergebnisse, von denen in  $n = 7$  die Gegenfärbung positiv war.

## 4.4 Gegenfärbung Gard662 in Cy5

Nicht immer war die Gard662 Gegenfärbung positiv. Wenn sich jedoch die spezifische Sonde in Cy3 flau unter dem Mikroskop darstellte, wurde ein klares Bild in Cy5 mittels Gard662 sichtbar. Von den insgesamt  $n = 111$  negativen Ergebnissen der Kladen-spezifischen Sonden sind  $n = 85$  der Gard662 Cy5 Gegenfärbungen positiv gewesen, in  $n = 26$  ist auch die Gegenfärbung negativ ausgefallen. In  $n = 24$  Fällen war die spezifische Sonde positiv, die Gard662 Gegenfärbung jedoch flau oder negativ.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.5 Übersicht Verteilung der Sonden nach Abstrichlokalisation

Bei der Verteilung der positiven Sonden in Abhängigkeit von dem Abstrichort werden nur geringe Unterschiede sichtbar. Von neun Sonden sind bei vier der untersuchten Sonden die Zervixabstriche häufiger positiv. Bei  $n = 3$  Färbungen überwiegen die positiven Resultate für die Vaginalabstriche. Eine Übersicht ist in der Abbildung 14 dargestellt.

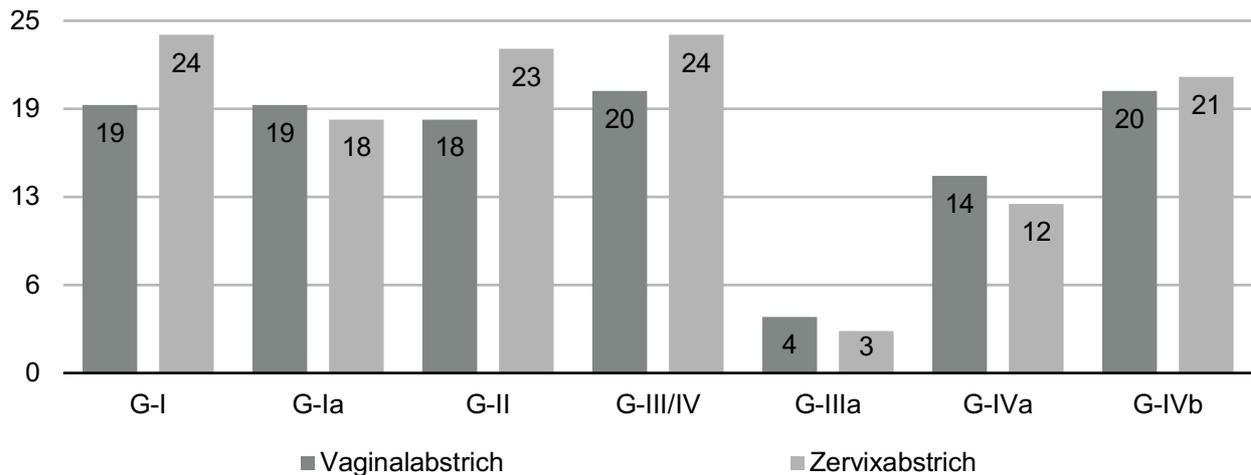


Abbildung 13: Verteilung der positiven Ergebnisse der Sonden nach Abstrichort

### 4.6 Nicht übereinstimmende Ergebnisse der Mono-Kladen Sonden

Wichtig ist zu klären, da es sich um neue Sonden handelt, ob zwei verschiedene Sonden, die für eine Klade stehen, diese auch beide darstellen. Die Abweichungen der Mono-Kladen-Sonden variieren von  $n = 7$  bis  $n = 23$ . Klade 1 wird von zwei Sonden angefärbt und ist in  $n = 34$  der Fälle doppelt positiv. Das heißt, dass in  $n = 12$  Fällen nur eine Sonde die Klade 1 darstellte. Für die Sonden G-IVa und G-IVb sieht es ähnlich aus. Dort sind insgesamt  $n = 23$  Inkongruenzen vorhanden, in  $n = 22$  Fällen wurden bei den gleichen Proben ein positives Ergebnis beider Sonden erzielt. Siehe Tabelle 18.

## 4. ERGEBNISSE

Tabelle 18: Ergebnisse der für die Klade korrespondierenden Sonden

<b>Klade 1</b>		
	G-I +	G-I -
G-Ia +	34	3
G-Ia -	9	4
<b>Klade 4</b>		
	G-IVb +	G-IVb -
G-IVa +	22	4
G-IVa -	19	5

### 4.7 Korrigierte Ergebnisse der G-III/IV Sonde

Die GIII/IV Sonde spielt eine entscheidende Rolle bei der Validierung der neu entwickelten Sonden. Die Sonde GIII/IV ist dazu ausgelegt, die Klade 3 und 4 zu markieren. Bei einem positiven GIII/IV Ergebnis ist nicht klar, für welche *G. vaginalis* Klade dieses Resultat steht. Klade 3, Klade 4 oder beide gleichzeitig könnten positiv sein. Für exakte Ergebnisse müssen Mono-Kladen-Sonden wie G-IIIa, G-IVb, G-IVa verwendet werden. Es fand sich nicht immer ein positives Signal der GIII/IV-Sonde, wenn eine der entsprechenden Mono-Kladen Sonden positiv war. In drei Fällen war GIII/IV positiv, aber keine der erwähnten Mono-Kladen Sonden zeigte ein fluoreszierendes Signal. In n = 4 Proben waren entweder G-IVa, G-IVb oder G-IIIa jeweils allein oder in Kombination positiv, jedoch zeigte die GIII/IV-Sonde hier kein positives Resultat. Die nicht übereinstimmenden Ergebnisse sind in der Tabelle 19 grau hinterlegt. Die Kombination von GIII/IV, G-IVb und G-IVa ist mit n = 18 Fällen ist die häufigste, dicht gefolgt von GIII/IV und G-IVb mit n = 15. Die Kombination von nur GIII/IV und G-IIIa ohne Klade 4 ist nicht existent. Folglich wurde Klade 3 niemals ohne Klade 4 gefunden.

## 4. ERGEBNISSE

*Tabelle 19: Vergleich der Ergebnisse zwischen GIII/IV und der Sonde von Kladen 3 und 4*

Anzahl der positiven Ergebnisse der korrespondierenden Sonden gesamt	Verschiedene Kombinationen der korrespondierenden Sonden	GIII/IV+	GIII/IV -
0	G-IIIa/G-IVa/G-IVb -	3	2
1	G-IIIa +	0	0
	G-IVa +	2	2
	G-IVb +	15	1
2	G-IIIa/G-IVa +	0	0
	G-IIIa/G-IVb +	2	1
	G-IVa/G-IVb +	18	0
3	G-IIIa/G-IVa/G-IVb+	4	0
	$\Sigma$	44	6

### 4.8 Prävalenz der Kladen

Alle vier Kladen waren in den untersuchten Kulturen vertreten. Die Kladen 1 und 4 sind mit  $n = 46$  (92%) und  $n = 45$  (90%) die am häufigsten vertretenen. Die Sonde G-IIIa ist nur in  $n = 7$  (14%) Fällen eindeutig positiv. Das macht Klade 3 zur am wenigsten vertretenen Sonde. In  $n = 38$  Fällen war GIII/IV zwar positiv, jedoch ohne G-IIIa, was zu der Schlussfolgerung führt, dass Klade 3 negativ sein muss. In  $n = 3$  Fällen war nur GIII/IV positiv. Hier kann keine eindeutige Aussage über die Klassifikation der Klade getätigt werden. Demzufolge wurde diesen Proben weder Klade 3 noch 4 zugeordnet. Dieses hat zur Folge, dass ein eigentlich höheres Ergebnis in den folgenden Angaben möglich sein könnte.

## 4. ERGEBNISSE

Tabelle 20: Prävalenz der Kladen

Kladen	Prävalenz (%)
1	46 (92)
2	41 (82)
3	7 (14)
4	45 (90)

### 4.9 Prävalenz der Kladen in Abhängigkeit von der Abstrichlokalisation

Bei der Kladenverteilung zwischen Zervix- und Vaginalabstrichen werden kleinere Unterschiede deutlich. Insgesamt haben Zervixabstriche eine etwas höhere positive Anzahl für die jeweiligen Kladen. Bei den Zervixabstrichen ist die Klade 1 zu 100% (n = 25) positiv. Die restlichen Kladen folgen mit n = 23 (Klade 2) und n = 22 (Klade 4) in einem kleinen Intervall. Klade 3 ist mit n = 3 mit großem Abstand am wenigstens vertreten.

Bei den Kulturen, die aus vaginalen Abstrichen stammen, sind die Verteilungsverhältnisse ähnlich, nur die Gesamtzahl der positiven Ergebnisse ist etwas niedriger. Klade 4 ist mit n = 23 (92%) am häufigsten, Klade 3 mit n = 4 (16%) am seltensten vertreten. Eine Übersicht der Anzahl der positiven Kladen in Abhängigkeit zur Abstrichlokalisation ist in Abbildung 14 zu sehen.

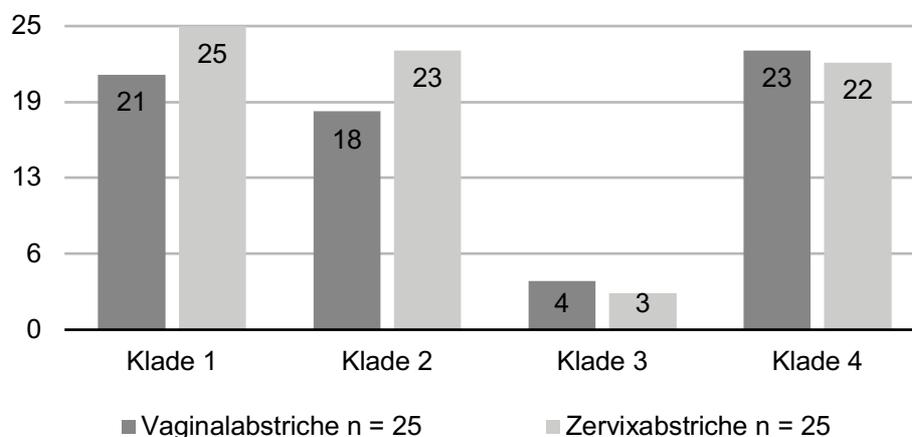


Abbildung 14: Verteilung der positiven Kladen in Abhängigkeit von der Abstrichlokalisation

## 4. ERGEBNISSE

### 4.10 Anzahl der positiven Kladen pro Probe

In der untersuchten Kohorte sind in der Regel pro Probe mehrere Kladen positiv. In n = 33 (66%) Fällen waren je Abstrich drei Kladen positiv. In n = 6 (12%) waren pro Probe vier und zwei Kladen positiv. In n = 4 (8%) war eine Klade positiv und in einem Fall war keine Probe positiv. Eine Übersicht ist in Tabelle 21 zu sehen.

*Tabelle 21: Anzahl der positiven Kladen je Probe n = 50*

<b>Anzahl der <i>G. vaginalis</i> Kladen</b>	<b>Prävalenz (%)</b>
Eine Klade	4 (8)
Zwei Kladen	6 (12)
Drei Kladen	33 (66)
Vier Kladen	6 (12)

Bei der Anzahl der Kladen je Proben in Abhängigkeit bezüglich des Abstrichortes ergeben sich ähnliche Ergebnisse und somit keine Unterschiede zwischen den Abstrichorten. Von n = 25 Zervixabstrichen sind bei n = 19 (76%) der untersuchten Proben drei Kladen vertreten. Insgesamt sind n = 3 (12%) Proben vierfach positiv. Bei den Vaginalabstrichen verhält es sich ähnlich. Bei n = 14 (56%) der Proben sind alle drei Kladen positiv. Auch hier sind in n = 3 (12%) Proben alle vier Kladen positiv. Eine genaue Übersicht ist in Abbildung 15 zu sehen.

## 4. ERGEBNISSE

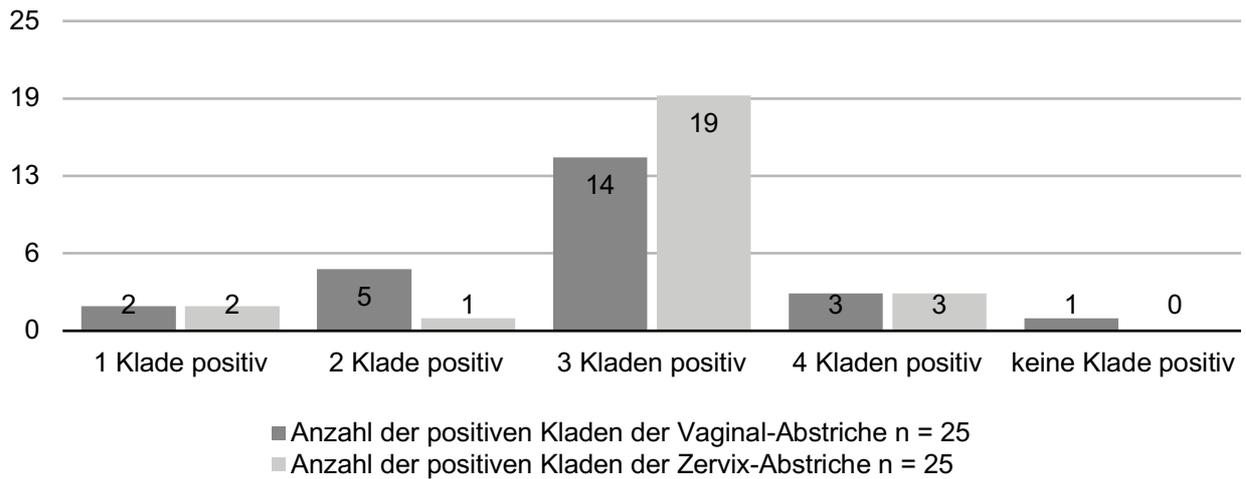


Abbildung 15: Anzahl der positiven Klade je Probe

### 4.11 Klade-Kombinationen

Wie oben dargestellt, sind bei Frauen mit BV häufig mehrere Klade positiv. Deshalb wurden häufige Kombinationen der Klade herausgearbeitet. Die mit Abstand häufigste Kombination mit 64% besteht aus den Klade 1, 2 und 4, siehe Detailübersicht in Tabelle 22.

Tabelle 22: Kladekombinationen

<b>G. vaginalis Klade</b>	<b>Prävalenz (%)</b>
Klade 1+ 2+ 4	32 (64)
Klade 1+ 2+ 3+ 4	6 (12)
Klade 1+ 4	3 (6)
Klade 1	2 (4)
Klade 4	2 (4)
Klade 1+ 2	2 (4)
Klade 2+ 4	1 (2)
Klade 1+ 3+ 4	1 (2)

## 4. ERGEBNISSE

### 4.12 Bakteriengruppen

Die primären Bakterienkulturen wurden nach typischen Bakteriengruppen gesucht. Ergebnisse siehe Tabelle 23.

*Tabelle 23: Ergebnisse der Bakteriengruppen*

<b>Bakterium</b>	<b>positiv (%)</b>	<b>negativ (%)</b>
Bif164	n = 50 (100)	n = 0
LGC354b	n = 42 (84)	n = 8 (16)
Cf319a	n = 39 (78)	n = 11 (22)
Ato291	n = 31 (62)	n = 19 (48)
Str405	n = 31 (62)	n = 19 (48)
Lab158	n = 26 (52)	n = 24 (48)
BAC303	n = 21 (42)	n = 29 (58)
Cdif198	n = 17 (34)	n = 33 (66)
Clit135	n = 12 (24)	n = 38 (76)
Chris150	n = 4 (8)	n = 46 (92)
Rbro730	n = 1 (2)	n = 49 (98)
Erec482	n = 1 (2)	n = 49 (98)
Cor653	n = 1 (2)	n = 49 (98)
Ebac1790	n = 1 (2)	n = 49 (98)

### 4.13 Kreuzreaktion

Für die Kombinationen G-Ia, G-III-IV, G-IIIa, und G-IVa in Cy3 mit den Sonden Str405, Ato291, BAC303, LAB158, Clit135, LGC254b und Cf319a in Cy5 konnten keine Kreuzreaktionen registriert werden (siehe Abbildung 16, 17, 18, 19, 20). Da wir in dem untersuchten Material die Bakteriengruppen Ebac1790, Erec482, Cor653, Rbro730 und Chris150, wenn überhaupt, dann nur mit einer sehr geringen Menge vorgefunden haben,

#### 4. ERGEBNISSE

wurden Tests auf Kreuzreaktion unterlassen. Ohne entsprechende rRNA von Bakterien kann keine Kreuzreaktionen stattfinden; fundierte Aussagen diesbezüglich sind nicht möglich.

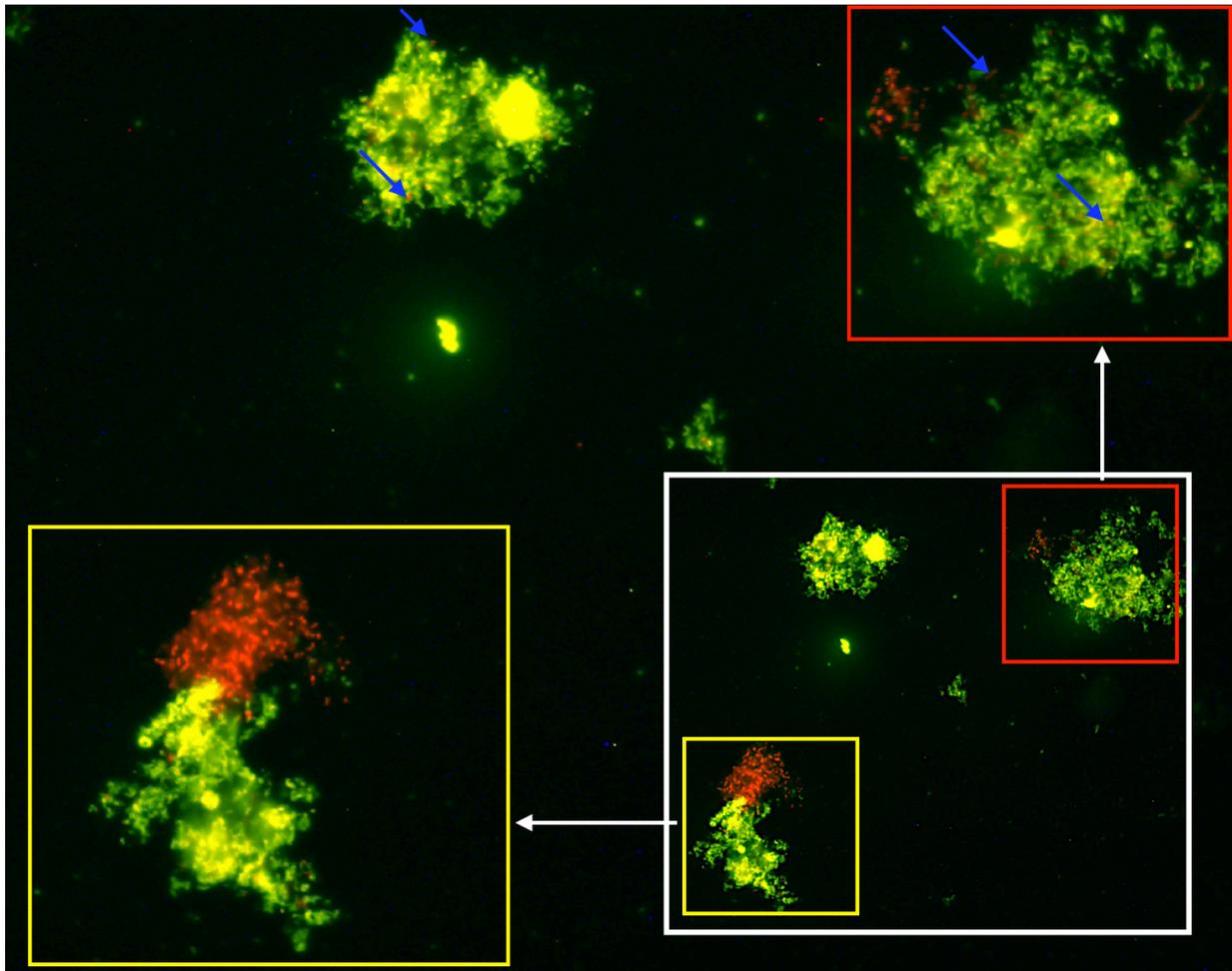
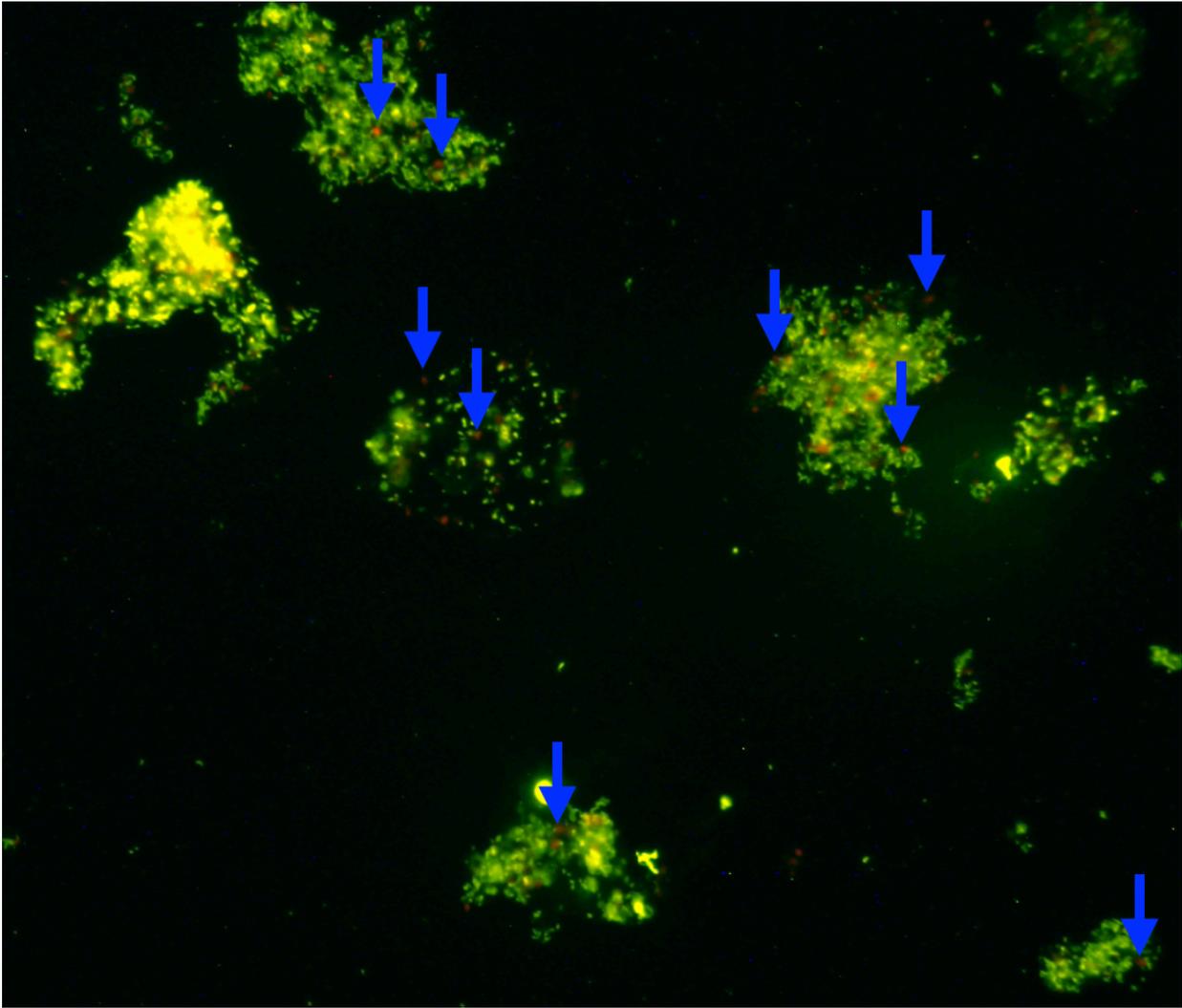


Abbildung 16: Probe gepoolt

Es liegt das visuelle Ergebnis folgender Sondenkombination vor: G-Ia, G-III-IV, G-IIIa, und G-IVa in Cy3 und Str405, Ato291, BAC303 und LAB158 in Cy5. Es wurde überlagert fotografiert. Weiß eingerahmt, zur rechten Hand liegend, ist die Übersicht des Fotos. Sehr deutlich heben sich die Färbungen der nebeneinander liegenden Bakterienkonglomerate der Sonden in Cy3 (gelb) und in Cy5 (rot) in der gelb eingerahmten Bakterienanhäufung ab. Im roten Rahmen ist links eine hauptsächlich in Cy5 gefärbte Bakterienansammlung zu sehen. Die *Gardnerellen*-Anhäufung ist durch einzelne, mit blauen Pfeilen markierte Bakterien durchsetzt. Es liegt somit ein eindeutiges Ergebnis vor, das keine Kreuzreaktion beweist.

#### 4. ERGEBNISSE



*Abbildung 17: Probe gepoolt*

Das visuelle Ergebnis der Sondenkombination von G-Ia, G-III/IV, G-IIIa, und G-IVa in Cy3 und Str405, Ato291, BAC303 und LAB158 in Cy5 liegt hier vor. Die *Gardnerellen*-Anhäufungen (gelb), sind von rot gefärbten Bakterien durchsetzt. Diese sind mit einem blauen Pfeil markiert.

#### 4. ERGEBNISSE

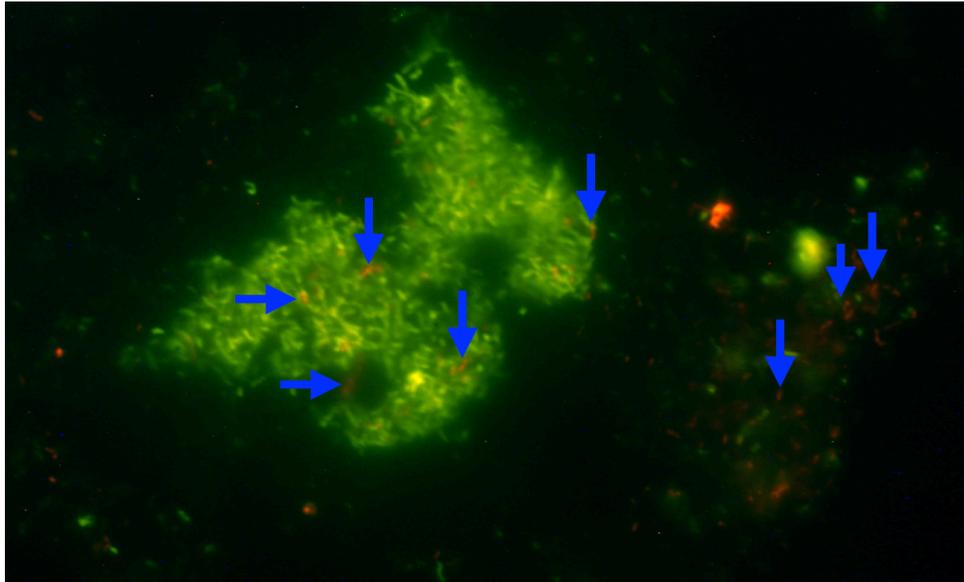


Abbildung 18: Probe gepoolt

Es liegt folgende Sondenkombination vor: G-Ia, G-III-IV, G-IIIa, und G-IVa in Cy3 mit Str405, Ato291, BAC303 und LAB158 in Cy5. Die gelbe aus *Gardnerellen* bestehende Bakterienanhäufung, mittig im Bild, ist durchsetzt mit einzelnen, nicht durch die *Gardnerella* Sonden angefärbten Stäbchen-förmigen Bakterien, markiert durch blaue Pfeile. Rechts neben dem *Gardnerellen*-Konglomerat sind mehrere stäbchen-förmige rote Bakterien, ebenfalls markiert durch blaue Pfeile, zu erkennen.

#### 4. ERGEBNISSE

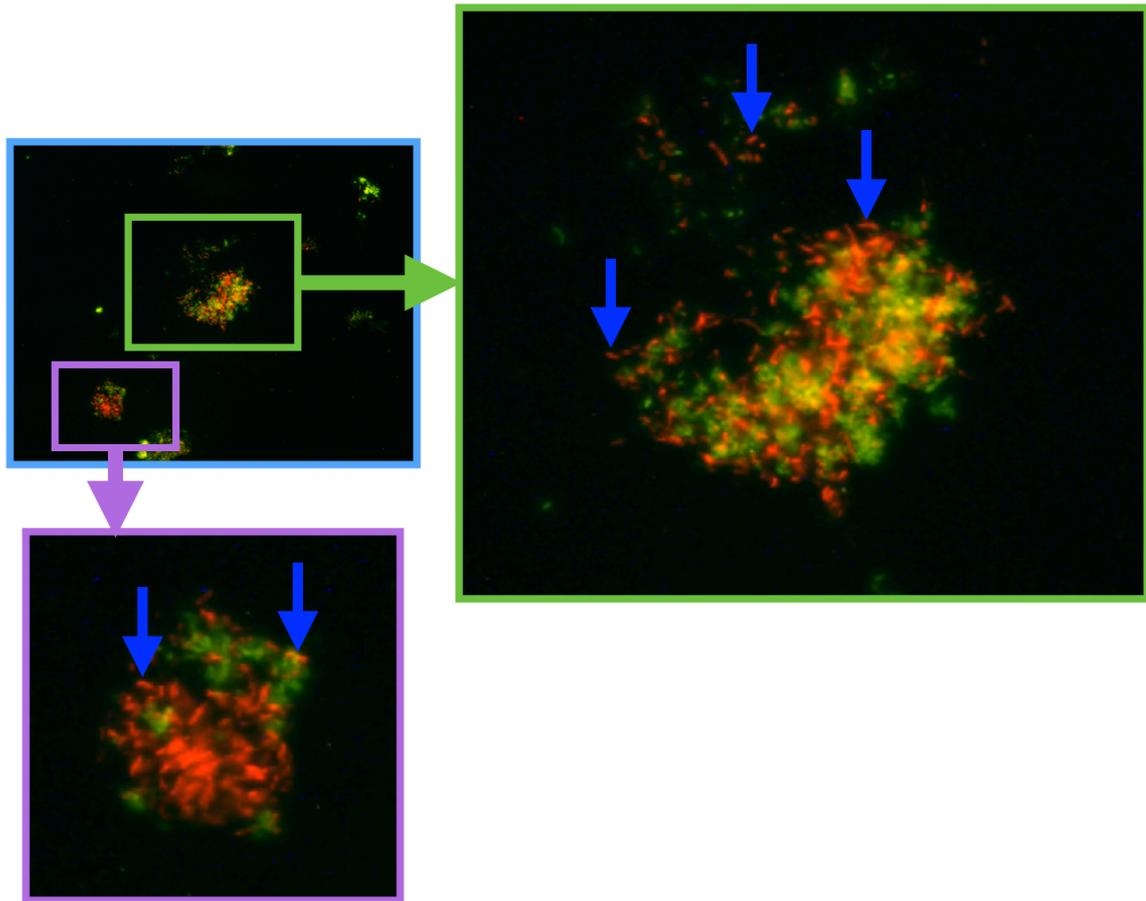
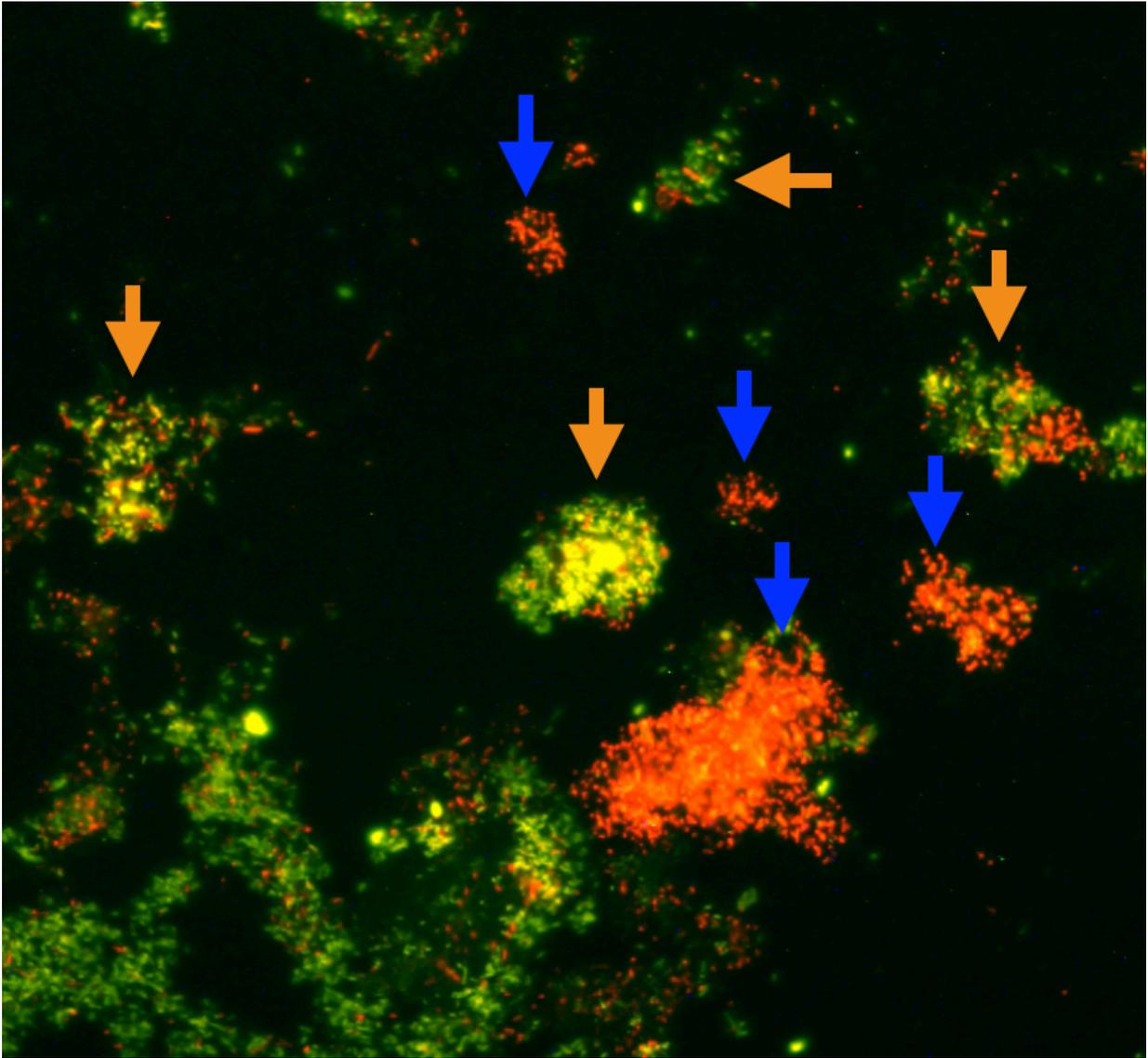


Abbildung 19: Probe gepoolt

Dargestellt ist das Ergebnis der Sondenkombination G-Ia, G-III/IV, G-IIIa und G-IVa Cy3 mit LGC, Cf319a und Clit150 in Cy5. In der Abbildung, blau umrahmt, ist eine Übersicht der fotografischen Aufnahme. Die *Gardnerella* Sonden zeigen in beiden, jeweils grün und lila umrahmten, Ausschnitten ein flaeses Färberesultat; eine Bakterienform ist nicht auszumachen. Vermutlich liegen die *Gardnerellen* in einer anderen Ebene und wurden nicht fokussiert. Die Cy5 Färbung zeigt Stäbchen-förmige Bakterien, exemplarisch sind einige mit einem blauen Pfeil hervorgehoben. Ein Anhalt für eine Kreuzreaktion der Sonden liegt nicht vor.

#### 4. ERGEBNISSE



*Abbildung 20: Probe gepoolt*

Hier wurden die G-Ia, G-III-IV, G-IIIa und G-IVa Cy3 mit LGC, Cf319a und Clit150 in Cy5 kombiniert. Blaue Pfeile markieren LGC, Cf319a und Clit150 Anhäufungen. Die *Gardnerellen* Konglomerate (orange Pfeile) sind durchsetzt von stäbchen-förmigen Bakterien, angefärbt durch Cy5. Kein Anhalt für Kreuzreaktionen.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.14 Zusammenfassung Ergebnisse

Von  $n = 51$  untersuchten Proben musste eine wegen zu wenig Material aussortiert werden. Die Sonden G-III/IV mit  $n = 44$  (88%) und G-I mit  $n = 43$  (86%) wurden am häufigsten gefunden.

Von den insgesamt  $n = 111$  negativen Ergebnissen der Kladen-spezifischen Sonden ist in  $n = 26$  ist auch die Gegenfärbung negativ ausgefallen. Es gab keine relevanten Unterschiede zwischen den Abstrichlokalisationen Zervix und Vagina. Die Mono-Kladen Soden G-I, G-Ia und G-IVa, G-IVb waren nicht immer zusammen positiv oder negativ. Auch die mehrere Kladen anfärbende Sonde G-III/IV zeigt Inkongruenzen mit den dazugehörigen Mono-Kladen Sonden. Alle vier Kladen sind vertreten gewesen. Die Kladen 1 und 4 sind mit  $n = 46$  (92%) und  $n = 45$  (90%) am häufigsten gefunden worden. Besonders ist, dass Klade 3 niemals ohne Klade 4 gefunden wurde. Pro Probe sind meistens drei Kladen gleichzeitig zu finden gewesen  $n = 33$  (66%). Die häufigste Kombination besteht aus den Kladen 1, 2 und 4 (64%).

# 5. DISKUSSION

Die Beschreibung des normalen und abnormen Mikrobioms ist essentiell für das Verständnis von komplexen mikrobiellen Erkrankungen, wie es die BV ist. Bisherige Arbeiten konnten zeigen, dass *G. vaginalis* in verschiedenen Bio- und Genotypen mit unterschiedlicher Virulenz existieren (42, 60, 62, 63, 67, 68). Keine dieser Arbeiten führte zur Klärung der Rolle von *Gardnerellen* bei Gesundheit und Krankheit. Durch die vergleichende Gen-Analyse von 17 *Gardnerella* Stämmen wurden die Verwandtschaftsverhältnisse verschiedener *Gardnerellen* zueinander untersucht und eine Einteilung in Kladen vorgenommen (69). Damit wurde das Bakterium in neue Genotypen unterteilt und verknüpft mit FISH ergibt sich die Möglichkeit, das Vorkommen der Kladen im vaginalen Mikrobiom bei gesunden und bei BV erkrankten Frauen zu beschreiben. Die Analyse der primären Bakterienkultur ermöglicht den Vergleich mit Arbeiten, die das Abstrichmaterial direkt verarbeitet haben. Damit kann erörtert werden, ob primäre Bakterienkulturen eine solide Alternative sind, um die BV zu erforschen, denn bis heute existieren keine adäquaten Tiermodelle.

### 5.1 Bewertung der FISH-Sonden

Mit den hier durchgeführten Färbungen konnte gezeigt werden, dass die Sonden funktionieren und die visuellen Ergebnisse eindeutig sind. Eine auffällig geringe Anzahl positiver Färbeergebnisse besteht für die Sonde G-IIIa mit  $n = 7$  (14%). Von  $n = 43$  negativen Resultaten bei der Cy3 Färbung mit G-IIIa ist die Cy5 Gegenfärbung in  $n = 40$  Fällen positiv. Auch bei der Sonde G-IVa kam es bei  $n = 24$  negativen Ergebnissen, in  $n = 22$  Fällen zu einem klaren Ergebnis der Gard662 Sonde in Cy5. Das ist ein Hinweis, dass bei der Sonde G-IIIa bei  $n = 3$  Objektträger-Feldern kein *Gardnerellen* Material vorhanden war. Bei der Sonde G-IVa wären es dementsprechend  $n = 2$  Fälle, bei denen keine rRNA von *Gardnerellen* präsent war. Da die Fluoreszenz der Cy5 Farbe schnell verblasst, kann ein Suchprozess, besonders bei gering positiven Ergebnissen, verfälscht werden. Geht der Fluoreszenz-Effekt zu Ende, bevor die mikroskopische Analyse abgeschlossen ist, erhält man somit falsch negative Ergebnisse für die Sonde in Cy5. Besonders apparent wird es, wenn die Gegenfärbung negativ ausfällt bei einem positiven

## 5. DISKUSSION

Ergebnis der spezifischen Sonde in Cy3. In dieser Arbeit war das bei n = 24 Proben der Fall und trat in der Regel bei niedrig prozentigen Ergebnissen auf. Hier ist von einem zeitlichen Problem auszugehen. Die Fluoreszenz-Dauer von Cy5 war vermutlich nicht lang genug. Der Suchprozess ist untersucher- und übungsabhängig. Um zu wissen, wieviel *Gardnerellen* Material sich auf einem Objektträger befindet, wurde eine Färbung von Gard662 in Cy3 durchgeführt. Gard662 in Cy3 ergab n = 48 eindeutig positiv Ergebnisse und war im Durchschnitt auf zu 36% positiv geschätzt. Damit ist sichergestellt, dass die niedrige Färberate bei G-IIIa und G-IVa nicht auf einen Fehler des Verarbeitungsprozesses zurückzuführen ist, sondern vielmehr ein Fehlen der entsprechenden rRNA darstellt. Insgesamt wurden bei n = 111 negativen Ergebnissen der Cy3 Sonde n = 25 der Gegenfärbungen in Cy5 auch negativ. In diesen Fällen kann gefolgert werden, dass nicht ausreichend Material auf dem untersuchten Objektträger war. Daher ist eine höhere Positivrate theoretisch möglich.

Die Sonden G-Ia, G-III-IV, G-IIIa, und G-IVa zeigten mit *Firmicutes*, *Flavobacteria*, Vielzahl von *Bacteroidaceae*, *Bacteroidetes*, *Atopobium*, *Streptococci*, *Lactobacillus* sp. und *Enterococcus* sp., *Clostridium lituseburense* Gruppe keine Kreuzreaktion. Für die Bakteriengruppen *Clostridium histolyticum*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium sporosphaeroides*, *Ruminococcus bromii*, *Clostridium leptum*, *Eubacterium rectale*, *Clostridium coccooides* Gruppe und *Coriobacterium* Gruppe kann keine Aussage getroffen werden, da sich insgesamt zu wenig rRNA in den Proben befand. Weitere Test z.B. mit Stuhlproben, die diese Bakteriengruppen und Spezies eher enthalten, sollten durchgeführt werden. Das Risiko für Kreuzreaktionen besteht bei neu entwickelten Sonden immer, auch wenn für bestimmte Bakteriengruppen keine unerwünschte Reaktion nachgewiesen werden konnte. Weitere Tests und das Sammeln von Erfahrungen mit den hier verwendeten Sonden sind damit notwendig. Eine kritische Bewertung der erzielten Ergebnisse ist somit auch in Zukunft essentiell.

## 5. DISKUSSION

### 5.2 Kladen

Die hier präsentierten Ergebnisse sind mit denen von Janulaitien *et al.* (82) vergleichbar. Dort wurden n = 29 BV Patientinnen untersucht. Auch hier war Klade 1 die häufigste, gefolgt von Klade 4. Klade 3 ist die am seltensten Auftretende. Wie in dieser Arbeit ist die Kladenkombination von Klade 1, 2 und 4 in einem Abstrich die häufigste Kombination (82).

In einer US-amerikanischen Studie ist zwar die Klade 2 die seltenste, Klade 4 dafür die häufigste (31). Die australische Arbeit von Vodstric *et al.* zeigte, dass bei BV die Klade 1 mit 93% am häufigsten und Klade 3 gar nicht gefunden werden konnte (83). In dieser Studie wurden jedoch nur n = 7 BV positive Frauen untersucht. Es ist damit möglich, dass auch Klade 3 in Australien vorkommt. Die Daten einer russischen Patientenkohorte von Shipitsyna *et al.* (100) mit insgesamt n = 79 BV Patientinnen war die Klade 4 mit 100% am häufigsten und Klade 3 am seltensten vertreten.

Es konnte das weltweite Vorkommen aller Kladen, bis auf Klade 3, hier mit den erwähnten Einschränkungen, bis zum heutigen Zeitpunkt nachgewiesen werden. Diese Unabhängigkeit von der geographischen Lokalisation ist ein interessanter Aspekt, da eine unterschiedliche bakterielle Kolonisierung zwischen Frauen europäischer und afro-amerikanischer Abstammung gefunden wurde (101, 102), die sich, trotz der Umsiedlung vor einem historisch langen Zeitraum, hält. Dadurch kann die Annahme aufkommen, dass *G. vaginalis* ein Teamplayer ist, der von der Anwesenheit anderer Bakterien profitiert. *Gardnerellen* sind der konstante Faktor aller BV Patientinnen weltweit. Welche weiteren Bakterien sich bei der BV beteiligen, scheint für *Gardnerellen* sekundär, Hauptsache es ergibt sich eine polymikrobielle Besiedelung. Dies deutet darauf hin, dass *Gardnerellen* eine Schlüsselfunktion in der Pathophysiologie der BV innehaben.

Zwei weitere wichtige Aspekte, die sich in Abbildung 21 zeigen, sind, dass die durch FISH erhobenen Daten aus primären Bakterienkulturen denen der PCR basierten Studien ähneln und dass Klade 1 und 4 bei BV positiven Frauen immer stark vertreten sind.

## 5. DISKUSSION

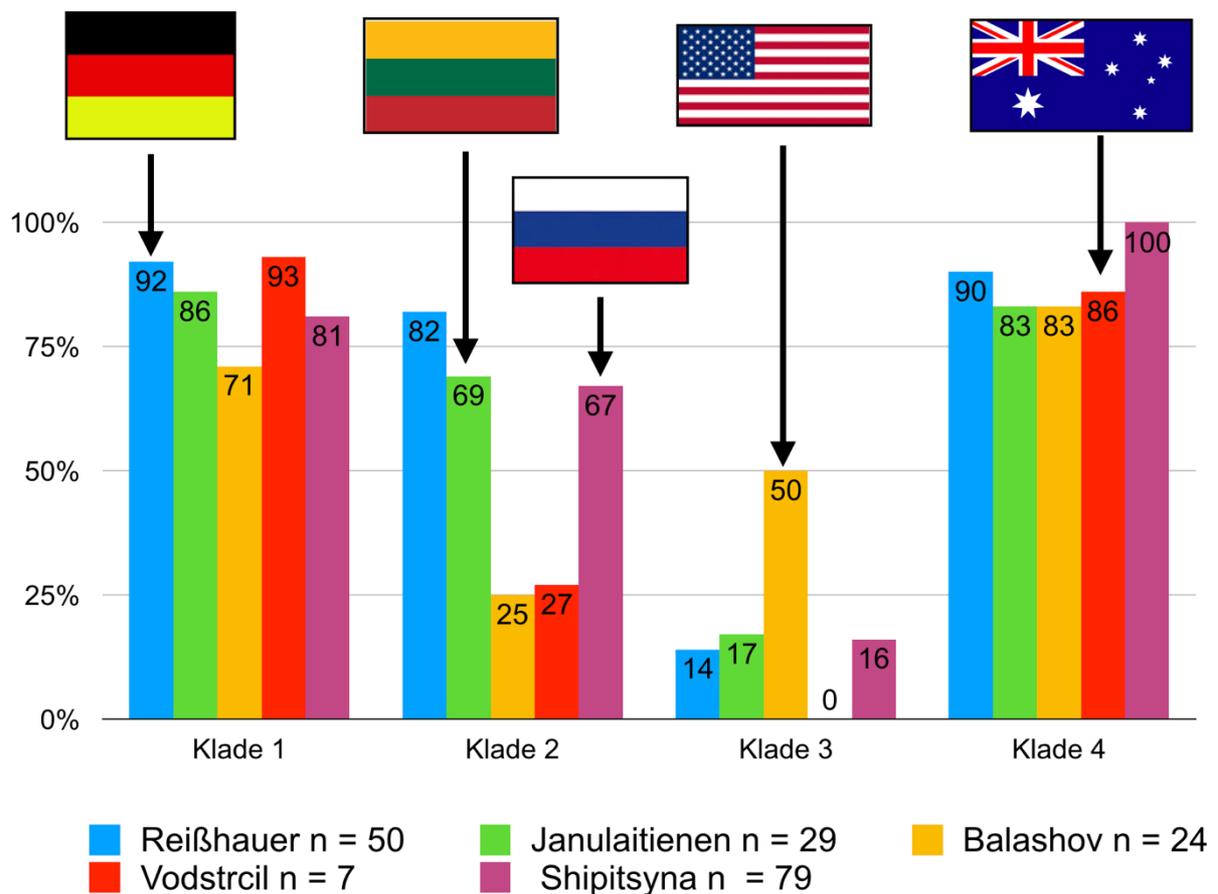


Abbildung 21: Prozentuale Verteilung der Kladen im Vergleich mit anderen Studien

Interessant ist der Vergleich mit den Ergebnissen von Hilbert *et al.* (81). In dieser US-amerikanischen, longitudinalen Arbeit, mit n = 149 prä-menopausalen Frauen von denen n = 123 an BV erkrankt waren, wurden Abstriche genommen vor und zwei Mal nach der antibiotischen Behandlung der BV. Hier zeigte sich, dass alle Kladen sehr häufig vertreten waren; keine war weniger als 86,5% positiv (81). Es handelt sich hier jedoch um eine gemischte Kohorte, mit Gesunden, an BV Erkrankten und Zustand nach antibiotischer Behandlung.

Die Arbeiten, die bewerten, welche Kladen bei Gesunden zu finden sind, zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Hilbert *et al.* (81) konnte zeigen, dass bei gesunden Frauen alle vier *G. vaginalis* Kladen zu finden sind und nicht, wie angenommen, eine Klade besonders stark vertreten ist. Balashov *et al.* (31) stellten dar, dass die Kladen 1 und 3 eine positive Assoziation mit der BV zeigten, Klade 2 im Zusammenhang mit einem intermediären Nugent Score steht und Klade 4 keinen Zusammenhang mit der

## 5. DISKUSSION

Erkrankung hat. Janulaitien *et al.* zeigten, dass 87% der gesunden Frauen *G. vaginalis* positiv waren und die Kladen 3 und 4 keine Assoziation mit hohem Nugent Score aufweisen. Ein bezüglich Klade 4 ganz anderes Ergebnis erlangte Vodstrcil *et al.* (83). Diese Arbeitsgruppe hat Klade 4 positiv mit der BV korreliert. Jedoch ist dieser Schluss kritisch und zurückhaltend zu betrachten, da die BV Kohorte mit  $n = 7$  klein war. Shipitsyna *et al.* haben  $n = 162$  nach Nugent-Score gesunde Frauen untersucht. Hier zeigte sich, dass bei 93% der untersuchten Abstriche irgendeine Klade positiv war, am häufigsten Klade 4 (90%), am seltensten Klade 3. Die Kladen 1, 2 und 4 wurden in dieser Arbeit positiv mit BV korreliert, wohingegen Klade 3 keine Assoziation mit BV hätte (100).

Bis heute kann keiner Klade eine alleinige Rolle in der Pathophysiologie der BV zugerechnet werden. Da alle Kladen-untersuchenden Arbeiten eine hohe Anzahl der vier Kladen bei gesunden und an BV erkrankten Frauen vorgefunden haben, ist es unwahrscheinlich, dass einer bestimmten Klade für die BV Diagnostik ein prädiktiver Wert zugeordnet werden kann.

### 5.3 Die Rolle von *Gardnerella vaginalis* bei der bakteriellen Vaginose

Viele Jahre waren die inkonsistenten Ergebnisse bezüglich der *G. vaginalis* positiven, jedoch gesunden Frauen ein Rätsel (80). Balashov *et al.* (31) zeigten, selbst überrascht von dem Ergebnis, dass bis zu 97% der Gruppe gesunder Frauen *G. vaginalis* positiv waren. In der Literatur wurde bis dahin über 50% der gesunden Frauen als *G. vaginalis* positiv berichtet (103). Zur Initiierung bzw. Erhaltung der BV spielt die Quantität von *G. vaginalis* eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass von an BV erkrankten Frauen die vaginalen Abstriche, die mittels quantitativer PCR eruierte Menge des genetischen Materials von *G. vaginalis* relevant höher ist als bei Gesunden (31, 104). Durch die neuen, genaueren labordiagnostischen Möglichkeiten, die schon minimale Mengen von RNA und DNA nachweisen können, müssen positive Befunde mit entsprechender Abwägung interpretiert werden. Neben der Quantität ist auch die Gesamtanzahl der *G. vaginalis* Kladen je Individuum wichtig. Wir konnten zeigen, dass bei Frauen, die unter BV leiden, in der Regel eine gleichzeitige Infektion mit multiplen Kladen bestand. Dies ist eine große Gemeinsamkeit mit allen anderen Kladen-untersuchenden Arbeiten. Egal welche Studie betrachtet wird, es sind immer mehrere Kladen bei den betroffenen Frauen gleichzeitig positiv (31, 81-83).

## 5. DISKUSSION

Dass dies der Fall ist, ist ein interessantes Ergebnis. Normalerweise besitzen Bakterien aktive Mechanismen, um andere Organismen zu unterdrücken oder zu eliminieren. Selbst innerhalb derselben Spezies versuchen Bakterien sich mit aktiven Prozessen durchzusetzen. Zum Beispiel konnte für *Escherichia coli* gezeigt werden, dass sich Stämme gegenseitig unterdrücken (105). Wettbewerb ist ein Schlüsselement für die natürliche Selektion. Wenn er fehlt, wäre der Ursprung für Innovation und Verbesserung nicht mehr vorhanden (106). *Gardnerellen* scheinen eine andere Taktik zu verfolgen. Es wirkt so, also ob durch das Vorkommen mehrerer *Gardnerella*-Kladen im selben Habitat, diese sich im gegenseitigen Wachstum fördern. Unterschiedliche Eigenschaften von *Gardnerellen* konnte auf genetischer Ebene gezeigt werden. Zum Beispiel konnte die Codierung für die Sialidase nicht bei allen Genotypen nachgewiesen werden (82). Auf *In-vitro* Ebene wurde eine Genotyp-abhängige Reaktion in Bezug auf Metronidazol dargestellt (107). Bevor die Differenzierung zwischen den vier verschiedenen Kladen technisch möglich war, wurden Unterschiede zwischen BV-assoziierten und nicht-BV-assoziierten *Gardnerellen* beschrieben (45, 72). Castro *et al.* zeigten, dass BV-assoziierte *Gardnerellen* eher an einer HeLa-Zelllinie haften. Swidsinski *et al.* konnten darstellen, dass *G. vaginalis* in einem kohäsiven Wachstumsmuster häufiger bei Patienten mit BV gefunden werden. Diese Aspekte lassen darauf schließen, dass verschiedene *Gardnerellen* Genotypen existieren, die sich gegenseitig durch ihre unterschiedlichen Eigenschaften unterstützen können.

Die bereits erwähnte Studie von Kerr *at al.* zeigte, dass Stämme einer Spezies sich nicht gegenseitig eliminieren, wenn die Umwelt, in der sie leben, in irgendeiner Form strukturiert ist. Dadurch kann jeder Stamm seine Nische finden und existieren, ohne die anderen Bakterienstämme zu eliminieren (105). Eine solche Nische stellt der Biofilm dar. *Gardnerellen* sind der Hauptbestandteil von Biofilmen bei Frauen mit BV (16). Es gibt die Annahme, dass die Bildung eines Biofilms eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von BV und dessen negativen gesundheitlichen Auswirkungen spielt (108). Die bedeutende Rolle von *Gardnerellen* in der Biofilmbildung ist sehr gut belegt. Der Organismus weist, im Vergleich zu anderen BV assoziierten Bakterien (BVAB) alle Eigenschaften auf, die zur Initiierung und Bildung eines Biofilms benötigt werden (42). Die BVAB besitzen zwar weniger stark ausgeprägte und insgesamt weniger Virulenzfaktoren, jedoch unterstützen sie die Biofilmbildung durch ihre Präsenz. In Kombination mit anderen Organismen,

## 5. DISKUSSION

insbesondere den BVAB, wächst *G. vaginalis* besser (109) und ist damit wie schon oben besprochen, ein nicht wählerischer Teamplayer.

### 5.4 Die Multiple-Kladen-Theorie

In der Gesamtschau der hier erhobenen Daten und im Vergleich mit bereits getätigten Arbeiten (31, 81-83) deuten an, dass nur eine Infektion mit mehreren Kladen gleichzeitig die BV hervorzurufen scheint. Koumans *et al.* stellten dar, dass häufiger ungeschützter Geschlechtsverkehr mit verschiedenen Partnern die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass Frauen an BV erkranken (14, 83). Es könnte daher sein, dass eine Infektion mit nur einer Klade nicht ausreicht, um an BV zu erkranken, sondern der Kontakt mit multiplen Kladen dafür notwendig ist. Warum sich die BV nicht wie eine klassische STD verhält, könnte mit Hilfe der Multiple-Kladen-Theorie erklärt werden. Es reicht demnach nicht aus, nur *G. vaginalis* positiv zu sein, sondern es ist eine Infektion mit mehreren Kladen notwendig. Ob die verschiedenen Kladen über die Zeit akkumulieren, oder ob die multiplen Kladen zugleich akquiriert werden müssen, ist dabei unklar. Beide Varianten sind vorstellbar. Dies könnte auch eine Erklärung für die hohe positive Rate von gesunden, jedoch *G. vaginalis* positiven Frauen sein.

## 5. DISKUSSION

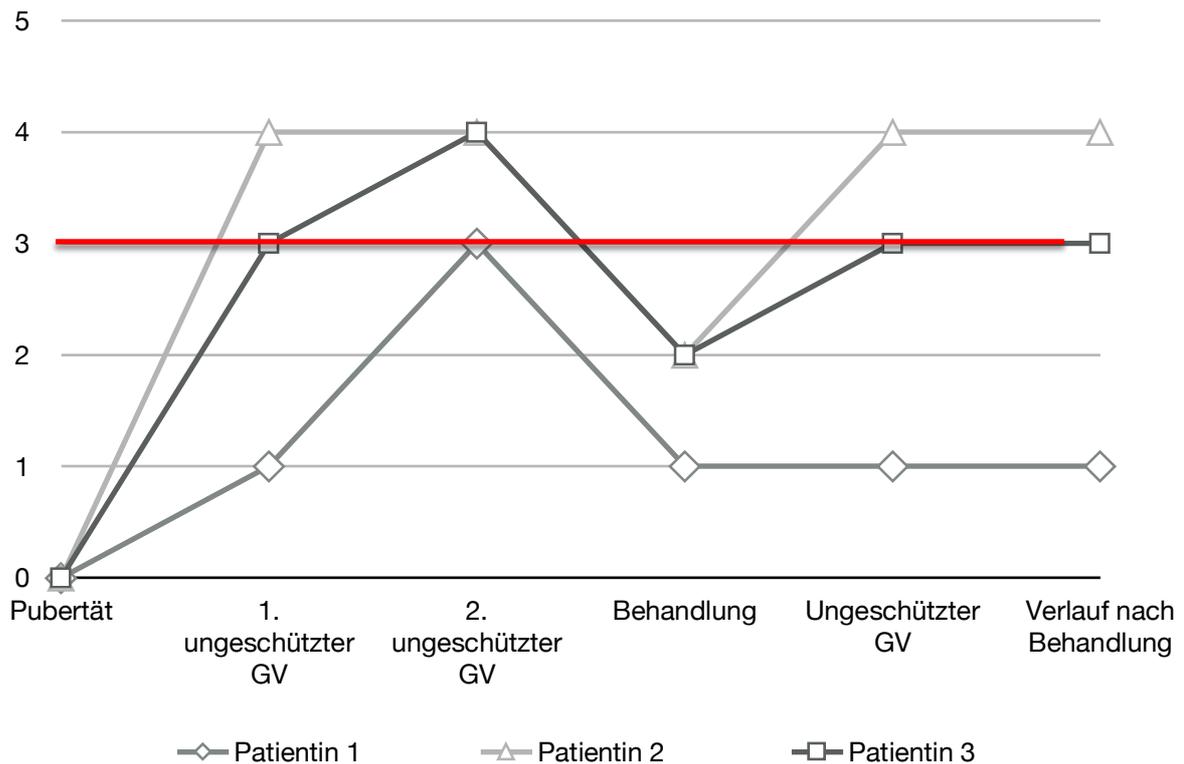


Abbildung 22: Darstellung der Multiplen-Kladen-Theorie

In der Abbildung ist die multiple Kladen Theorie und der mögliche Krankheitsverlauf von drei verschiedenen fiktiven Patientinnen dargestellt. Auf der y-Achse befindet sich die Anzahl der positiven Kladen, auf der x-Achse sind der Krankheitsverlauf und beeinflussende Ereignisse dargestellt. Das Einsetzen der symptomatischen BV wurde hier bei drei Kladen festgelegt. Nach der Pubertät hatten alle drei Patientinnen im Verlauf des Lebens ungeschützten GV. Patientin 1 steckt sich dabei mit einer Klade an, Patientin 2 mit allen vier Kladen und Patientin 3 mit drei Kladen. Nun leiden bereits zwei Patientinnen an BV. Im weiteren Verlauf und erneutem ungeschützten GV mit einem neuen Partner akquirieren Patientin 3 und Patientin 1 weitere Kladen, so dass nun alle Patientinnen an BV leiden. Durch die medikamentöse Behandlung, z.B. mit Metronidazol, kommt es zu einer Reduzierung der Kladen. Klade 3 und 4 sind resistent auf Metronidazol getestet worden (107). Deshalb wird keine der Patientinnen den Status *G. vaginalis* negativ erreichen. Im weiteren Verlauf kommt es bei Patientin 2 und 3 zu einer Zunahme an Kladen. Ob durch neue Infektionen, Re-Infektion durch den vorhandenen Partner oder Wiederaufflammen der Kladen aus dem Biofilm oder anderen Nischen ist unklar. Prinzipiell ist jede Variante dabei vorstellbar.

## 5. DISKUSSION

### 5.5 Die Rolle der Abstrichorte

Zu betrachten sind die Resultate in Abhängigkeit vom Abstrichort. Soweit bekannt, gibt es keine Studie, die die Kladenverteilung von *G. vaginalis* unter Berücksichtigung der Lokalisation untersucht hat. Eine Literaturrecherche ergab, dass es einige ältere Studien gibt, die die Mikroflora des unteren Genitaltrakts mittels Analyse von Bakterienkulturen untersucht haben. Dort wurde gezeigt, dass es zwischen vaginalen und zervikalen Abstrichen Unterschiede gab (110-114). Kim *et al.* konnten anhand 16s rRNA Gene-Clone-Libraries die aus Abstrichen, Schab-Proben und Lavage aus dem unteren Genitaltrakt von n = 8 prämenopausalen Frauen gewonnen wurden, zeigen, dass das vaginale Mikrobiom in einem Individuum zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht homogen, sondern von der Art der Probenentnahme und Lokalisation abhängig ist. Zwar wurde nur bei zwei der Patientinnen in dieser Arbeit *G. vaginalis* gefunden, jedoch konnte in einem Fall eine ungleiche Verteilung gezeigt werden. Anders als bei den hier vorgestellten Ergebnissen sind in diesem Fall im Zervixabstrich keine *Gardnerellen* zu finden (115).

In dieser Arbeit konnten häufiger bei Zervixabstrichen drei positive *G. vaginalis* Kladen je Probe nachgewiesen werden, als bei den vaginalen Abstrichen. Es ist somit zu überlegen, ob ein Zervixabstrich bevorzugt werden sollte, um die Diagnose BV zu bestätigen und um für Forschungszwecke *Gardnerellen* zu generieren

Selbstverständlich bilden PCR Methoden die bakterielle Besiedelung in Quantität und Qualität genauer ab. Da bei unklaren Fällen im klinischen Alltag die primäre Bakterienkultur das Hilfsmittel zur Diagnostik für bakterielle Dysbiosen ist, ist alles daran zu setzten, die in dem täglichen klinischen Ablauf verwendeten und möglichen Techniken zu optimieren. Weitere Forschung ist nötig, um einzuschätzen, ob sich bestimmte *G. vaginalis* Kladen bevorzugt in speziellen Nischen ansiedeln und wie weit die intraindividuellen Unterschiede gehen.

### 5.6 Therapeutische Schwierigkeiten

Die hier vorgelegten Daten zeigen eine dezent unterschiedliche Verteilung der Kladenanzahl in Abhängigkeit von der Abstrich-Lokalisation. Dies könnte eine Erklärung für die frustrane Behandlung der BV sein. Es konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass die BV häufiger bei Menschen vorkommt, die regelmäßig Oral- und Analsex

## 5. DISKUSSION

praktizieren (116, 117). Frauen, die Sex mit Frauen haben und Sexspielzeug untereinander tauschen, ohne dieses zu reinigen, haben ein erhöhtes Risiko für das Erkranken an BV (117, 118). Bei Männern konnte im Sperma und an Penis-Epithelzellen eine polymikrobielle Besiedelung u.a. mit *G. vaginalis* gezeigt werden (76). Bei den genannten Aspekten handelt es sich um Nischen, die als *G. vaginalis* Reservoir dienen könnten. Es ist durchaus möglich, dass es sich nicht nur um Rezidive handelt, die durch die evasive Wirkung des Biofilms auf die Antibiose möglich sind (3, 119), sondern auch um Re-Infektionen bzw. Neu-Infektionen nach der Behandlung. Für die Klade 3 und 4 wurde gezeigt, dass diese auf die bislang angewendete Standardbehandlung resistent sind (107). In der untersuchten Kohorte ist die Klade 4 mit 90% die zweithäufigste. Es gilt deshalb zu überlegen, ob durch die antibiotische Behandlung lediglich die Kladenanzahl reduziert und es dadurch zum Sistieren der Symptomatik kommt. Ein erneutes Aufflammen der BV wäre nach der Multiplen-Kladen-Theorie erleichtert, da bereits ein Grundbesatz an Kladen vorhanden ist. Der mögliche pathophysiologische Ablauf ist mittels der Multiplen-Kladen-Theorie in Abbildung 22 dargestellt.

### 5.7 Negative Probe

Auffällig in der hier vorgestellten Arbeit ist die Probe 50035. Alle kladenspezifischen Sonden sind negativ ausgefallen. Jedoch war die Gard662 Gegenfärbung in Cy5 in allen Fällen positiv. Um sicher zu gehen, wurde die Gard662 in Cy3 ohne Gegenfärbung durchgeführt. Auch diese zeigte ein stark positives Ergebnis. Das Ergebnis lässt folgern, dass *G. vaginalis* in diesem Abstrich vorlag, aber nicht einer der vier Kladen zugeordnet werden konnte. Dies könnte darauf hinweisen, dass es mehr als die vier von Ahmed *et al.* (69) beschriebenen Kladen gibt. Diese Vermutung liegt nahe, da die Arbeitsgruppe Abstriche von US-amerikanischen Frauen mit einer relativ hohen Quote von endometrial ansässigen *G. vaginalis* Isolaten  $n = 7$  (von insgesamt  $n = 17$ ) und nur 4 BV Patientinnen untersucht hat.

Zu einem ähnlichen Schluss kamen Janulaitiene *et al.*, die  $n = 116$  vaginale Abstriche von Frauen aller drei Nugent Scores untersucht haben. In dieser Studie wurden bei vier Proben Stämme gefunden, die nach mikrobiologischen Kriterien und 16s rRNS Nukleotid Gen-Sequenzierung klar *G. vaginales* zuzuordnen, jedoch nicht in eine Klade einzuordnen waren. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass es noch weitere

## 5. DISKUSSION

unbekannte Kladen gibt (82). Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützen somit diese Aussage.

Das vaginale Mikrobiom ist abhängig von vielen Faktoren und unterliegt dynamischen Veränderungen. Es spielen u.a. ethnische Herkunft und hormonelle Einflüsse eine Rolle (101, 102, 120-122). Möglicherweise spielt auch die Lokalisation und die Art der Probengewinnung im unteren Genitaltrakt eine Rolle. Es besteht also weiterer Forschungsbedarf bezüglich der Subgruppen des *G. vaginalis* Bakteriums.

### 5.8 Bewertung der FISH Technik

Die neu entwickelten FISH-Sonden sind eine zuverlässige und unkompliziert durchzuführende Methode, um die vier Kladen nach Ahmed *et al.* (69) zu bestimmen. In der hier vorgestellten Arbeit wurden Kulturen aus Vaginalabstrichen vor der Isolierung in einzelne Bakterien untersucht. Die aus einer Bakterienkultur stammenden Daten sind den der bereits erwähnten PCR basierten Studien (31, 81, 82) ähnlich. Deshalb kann angenommen werden, dass die Kultur von Vaginalabstrichen eine probate *in vitro* Methode ist, den Biofilm von Frauen mit BV genauer zu untersuchen. Die neuen FISH-Sonden stellen somit eine solide Alternative zur PCR dar. Die FISH eröffnet damit die Möglichkeit, strukturelle Veränderungen und räumliche Beziehung einzelner *Gardnerella* Kladen zueinander in natürlichen und *in vitro* Biofilmen zu untersuchen. Sie sind ein wertvolles Instrument zur Überwachung von Krankheiten und zur Ermittlung epidemiologischer Daten. Somit können die strukturellen Veränderungen und räumliche Beziehung einzelner *Gardnerella* Kladen von natürlichen und *in vitro* Biofilmen untersucht werden, was die PCR nicht ermöglicht.

### 5.9 Limitationen und Ausblick

Es gibt in dieser Arbeit, neben den bereits genannten, weitere Limitationen, auf die eingegangen werden muss.

Zwei wichtige Aspekte sind das Fehlen einer Kontrollgruppe und die wenigen Daten der untersuchten Patientenkohorte. Informationen, wie Leitbefund der zur gynäkologischen Vorstellung geführt hat, handelt es sich um eine BV Erstdiagnose oder bestanden schon

## 5. DISKUSSION

antibiotische Vorbehandlungen, wären zur Bewertung der erhobenen Daten interessant gewesen.

Es wurden Bakterienkulturen untersucht. In der Regel können nicht alle Bakterien angezüchtet werden, da die gewählten Wachstumsbedingungen nicht auf alle Organismen passen. Da der Fokus die Kladenverteilung der *Gardnerellen* gerichtet war, wurden die Wachstumsbedingungen auf die individuellen Bedingungen der *Gardnerellen* angepasst. Dadurch muss von einem Informationsverlust ausgegangen werden. Zum einen gibt es Bakterien, die bekanntlich BV assoziiert sind, z.B. BVAB 1 und 2, jedoch bis jetzt noch nie in einer Bakterienkultur angezüchtet werden konnten, zum anderen können Bakterien mit FISH Sonden nur markiert und eindeutig benannt werden, wenn sie bekannt sind. Unbekannte Bakterienspezies und geringe Bakterienkonzentrationen werden durch FISH nicht registriert, so dass es zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann.

Studien, die Kladen nach Ahmed *et al.* (69) untersucht haben, nutzten die PCR und haben ihre Ergebnisse nicht auf primäre Bakterienkulturen gestützt (31, 81-83). Damit sind die Ergebnisse dieser Arbeiten mit unseren nur eingeschränkt vergleichbar. Trotzdem ist die Zusammensetzung von Bakterienkulturen und Abstrichen sehr ähnlich.

Leider konnten durch die gewählte Methodik die Vorteile von FISH nicht im vollen Umfang genutzt werden. Die Untersuchung der räumlichen Beziehung der einzelnen Kladen untereinander war hier nicht möglich. In Folgearbeiten, z.B. mittels Biopsien, könnten Einblicke in die Biofilm-Zusammensetzung und dessen strukturelle Organisation bringen.

In dieser Arbeit wurden neu entwickelte FISH Sonden verwendet, mit denen es noch keine praktischen Erfahrungen gibt. Zum Beispiel müssten neu entwickelten *Gardnerellen* Sonden gegeneinander getestet werden. Dies war in dieser Arbeit nicht mehr möglich, da die dafür benötigte Probenmaterialmenge nicht mehr ausreichend war. Weitere Test, um die Sonden zu validieren, sind somit notwendig. Die Vermutung liegt nahe, dass die Sonden G-I, G-II, G-III/IV und G-IV-b miteinander eine Kreuzreaktion zeigen, da ihr gemeinsames Vorkommen am häufigsten ist. Da jedoch die Arbeitsgruppe von Janulaitenen *et al.* (82) die gleiche Kladenkombination mit ähnlicher Häufigkeit mittels PCR zeigen konnte, gehen wir davon aus, dass es sich nicht um Kreuzreaktionen handeln muss. Dennoch sind fortführende Tests notwendig, um mit den Sonden weitere Erfahrungen zu sammeln und mögliche unerwünschte Reaktionen zu finden.

## 5. DISKUSSION

Bei der auf Allem basierenden Arbeit von Ahmed *et al.* (69), wurden nur 17 *Gardnerellen* Genome analysiert. Wie bereits oben erwähnt, gibt es Hinweise, dass noch mehr Kladen existieren. Außerdem geht Ahmed *et al.* davon aus, dass es sich bei den *Gardnerellen* Kladen um verschiedene Spezies handelt, da die genetische Diversität enorm ist. Weitere Grundlagenforschung ist hier notwendig.

# 6. SCHLUSSFOLGERUNG

Es kann gefolgert werden, dass *Gardnerellen* von der Anwesenheit mehrerer Kladen profitiert und darüber hinaus der Entwicklung der BV dienlich ist. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um festzustellen, wie sich die Kladen gegenseitig unterhalten, weshalb *G. vaginalis* durch die Anwesenheit anderer Bakterien besser wächst und welche Rolle sie bei der Biofilminitiation und -unterhaltung einnehmen. Mittels PCR wurden viele Informationen über die Häufigkeit und die Menge von Bakterienarten gesammelt. Jetzt gilt es, die Beziehung und Interaktion zwischen ihnen zu bewerten. Die hier verwendeten FISH-Sonden sind eine solide Methode, um strukturelle Veränderungen in Kulturen und Biofilmen zu untersuchen.

# BIBLIOGRAFIE

- (1) Mendling W. Vaginose, Vaginitis, Zervizitis und Salpingitis: Springer Berlin Heidelberg; 2006. S. 22
- (2) Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(18):1899-911.
- (3) Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Dorffel Y, Scholze J, Lochs H, Verstraelen H. An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2007;198(1):9.e1-6.
- (4) Dols JA, Smit PW, Kort R, Reid G, Schuren FH, Tempelman H, Bontekoe TR, Korporaal H, Boon ME. Microarray-based identification of clinically relevant vaginal bacteria in relation to bacterial vaginosis. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2011;204(4):305.e1-7.
- (5) Reid G. Is bacterial vaginosis a disease? *Applied microbiology and biotechnology*. 2018;102(2):553-8.
- (6) Gardner HI, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1955(69):962-76.
- (7) Centers for Disease Control and Prevention. Bacterial Vaginosis – CDC Fact Sheet (Internet). USA 2018 (cited 24.10.2018). Available from: <https://www.cdc.gov/std/bv/stdfact-bacterial-vaginosis.htm>
- (8) Swidsinski A, Loening-Baucke V, Mendling W, Dorffel Y, Schilling J, Halwani Z, Jiang XF, Verstraelen H, Swidsinski S. Infection through structured polymicrobial *Gardnerella* biofilms (StPM-GB). *Histology and histopathology*. 2013;29(5):567-87.
- (9) Hickey RJ, Zhou X, Pierson JD, Ravel J, Forney LJ. Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*. 2012;160(4):267-82.

## BIBLIOGRAFIE

- (10) Mendling W, Martius J, Hoyme UB. S1-Guideline on Bacterial Vaginosis in Gynecology and Obstetrics: Long version – AWMF Guideline, registration no. 015/028, July 2013 Langfassung – AWMF-Register Nr.015/028, Juli 2013. Geburtshilfe und Frauenheilkunde. 2014;74(1):51-4.
- (11) Kenyon C, Colebunders R, Crucitti T. The global epidemiology of bacterial vaginosis: a systematic review. American journal of obstetrics and gynecology. 2013;209(6):505-23.
- (12) Tolosa JE, Chaithongwongwatthana S, Daly S, Maw WW, Gaitan H, Lumbiganon P, Festin M, Chipato T, Sauvarin J, Goldenberg RL, Andrews WW, Whitney CG. The International Infections in Pregnancy (IIP) study: variations in the prevalence of bacterial vaginosis and distribution of morphotypes in vaginal smears among pregnant women. American journal of obstetrics and gynecology. 2006;195(5):1198-204.
- (13) Bjornerem A, Aghajani E, Maltau JM, Moi H. [Occurrence of bacterial vaginosis among abortion seekers]. Tidsskrift for den Norske laegeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke. 1997;117(9):1282-4.
- (14) Koumans EH, Sternberg M, Bruce C, McQuillan G, Kendrick J, Sutton M, Markowitz LE. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. Sexually transmitted diseases. 2007;34(11):864-9.
- (15) Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. The American journal of medicine. 1983;74(1):14-22.
- (16) Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Ladhoff A, Swidsinski S, Hale LP, Lochs H. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. Obstetrics and gynecology. 2005;106(5 Pt 1):1013-23.
- (17) Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. Journal of clinical microbiology. 1991;29(2):297-301.

## BIBLIOGRAFIE

- (18) Nasioudis D, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin SS. Bacterial vaginosis: a critical analysis of current knowledge. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2016;124(1):61-69.
- (19) Klebanoff MA, Schwebke JR, Zhang J, Nansel TR, Yu KF, Andrews WW. Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. *Obstetrics and gynecology*. 2004;104(2):267-72.
- (20) Schwebke JR, Desmond R. Natural history of asymptomatic bacterial vaginosis in a high-risk group of women. *Sexually transmitted diseases*. 2007;34(11):876-7.
- (21) Verstraelen H, Verhelst R. Bacterial vaginosis: an update on diagnosis and treatment. *Expert review of anti-infective therapy*. 2009;7(9):1109-24.
- (22) Gätje R, Eberle C, Scholz C, Lübke M, Solbach C. *Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*: Thieme; 2015. S. 149-151.
- (23) Weisner D. Entzündungen der weiblichen Genitalorgane und der Brust. In: Diedrich K, Schultze-Mosgau A, Holzgreve W, Jonat W, Schneider K-TM, Weiss JM, editors. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007. S. 187-209.
- (24) Larsson PG, Forsum U. Bacterial vaginosis--a disturbed bacterial flora and treatment enigma. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2005;113(5):305-16.
- (25) Sobel JD, Ferris D, Schwebke J, Nyirjesy P, Wiesenfeld HC, Peipert J, Soper D, Ohmit SE, Hillier SL. Suppressive antibacterial therapy with 0.75% metronidazole vaginal gel to prevent recurrent bacterial vaginosis. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2006;194(5):1283-9.
- (26) Larsson PG, Brandsborg E, Forsum U, Pendharkar S, Andersen KK, Nasic S, Hammarstrom L, Marcotte H. Extended antimicrobial treatment of bacterial vaginosis combined with human lactobacilli to find the best treatment and minimize the risk of relapses. *BMC infectious diseases*. 2011;11:223.
- (27) Centers for Disease Control and Prevention. Bacterial Vaginosis (Internet). USA 2015 (cited 24.10.2018). Available from: <https://www.cdc.gov/std/tg2015/bv.htm>.
- (28) Criswell BS, Ladwig CL, Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis*: vaginitis by inoculation from culture. *Obstetrics and gynecology*. 1969;33(2):195-9.

## BIBLIOGRAFIE

- (29) Machado D, Castro J, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J, Cerca N. Bacterial Vaginosis Biofilms: Challenges to Current Therapies and Emerging Solutions. *Frontiers in microbiology*. 2016;6:1528.
- (30) Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(10):3270-6.
- (31) Balashov SV, Mordechai E, Adelson ME, Gygax SE. Identification, quantification and subtyping of *Gardnerella vaginalis* in noncultured clinical vaginal samples by quantitative PCR. *Journal of medical microbiology*. 2014;63(Pt 2):162-75.
- (32) Zinnemann K, Turner GC. The taxonomic position of "Haemophilus vaginalis" [*Corynebacterium vaginae*]. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1963;85(1):213-9.
- (33) Greenwood JR, Pickett MJ. Salient features of *Haemophilus vaginalis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1979(9):200-2004.
- (34) Piot P, van Dyck E, Goodfellow M, Falkow S. A taxonomic study of *Gardnerella vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*) Gardner and Dukes 1955. *Journal of General Microbiology*. 1980 ;119(2):373-96.
- (35) van Esbroeck M, Vandamme P, Falsen E, Vancanneyt M, Moore E, Pot B, Gavini F, Kersters K, Goossens H. Polyphasic approach to the classification and identification of *Gardnerella vaginalis* and unidentified *Gardnerella vaginalis*-like coryneforms present in bacterial vaginosis. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1996(46):675-82.
- (36) Onderdonk AB, Delaney ML, Fichorova RN. The Human Microbiome during Bacterial Vaginosis. *Clinical microbiology reviews*. 2016;29(2):223-38.
- (37) Leopold S. Heretofore undescribed organism isolated from the genitourinary system. *US Armed Forces Medical Journal* 1953(4):263-6.
- (38) Darai G, Handermann M, Sonntag HG, Zöller L. *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen: Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe*: Springer Berlin Heidelberg; 2012. S. 331.

## BIBLIOGRAFIE

- (39) Scott TG, Curran B, Smyth CJ. Electron microscopy of adhesive interactions between *Gardnerella vaginalis* and vaginal epithelial cells, McCoy cells and human red blood cells. *Journal of general microbiology*. 1989;135(3):475-80.
- (40) Cauci S, Monte R, Ropele M, Missero C, Not T, Quadrifoglio F, Menestrina G. Pore-forming and haemolytic properties of the *Gardnerella vaginalis* cytolysin. *Molecular microbiology*. 1993;9(6):1143-55.
- (41) Gelber SE, Aguilar JL, Lewis KL, Ratner AJ. Functional and phylogenetic characterization of Vaginolysin, the human-specific cytolysin from *Gardnerella vaginalis*. *Journal of bacteriology*. 2008;190(11):3896-903.
- (42) Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, Jefferson KK. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology*. 2010;156(Pt 2):392-9.
- (43) Cauci S, Culhane JF, Di Santolo M, McCollum K. Among pregnant women with bacterial vaginosis, the hydrolytic enzymes sialidase and prolidase are positively associated with interleukin-1beta. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 198(1):132.e1-.e7.
- (44) Harwich MD, Jr., Alves JM, Buck GA, Strauss JF 3rd, Patterson JL, Oki AT, Girerd PH, Jefferson KK. Drawing the line between commensal and pathogenic *Gardnerella vaginalis* through genome analysis and virulence studies. *BMC genomics*. 2010;11:375.
- (45) Castro J, Alves P, Sousa C, Cereija T, Franca A, Jefferson KK, Cerca N. Using an in-vitro biofilm model to assess the virulence potential of bacterial vaginosis or non-bacterial vaginosis *Gardnerella vaginalis* isolates. *Scientific reports*. 2015;5:11640.
- (46) Watts DH, Krohn MA, Hillier SL, Eschenbach DA. Bacterial vaginosis as a risk factor for post-cesarean endometritis. *Obstetrics and gynecology*. 1990;75(1):52-8.
- (47) Soper DE. Bacterial vaginosis and postoperative infections. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1993;169(2 Pt 2):467-9.
- (48) Persson E, Bergstrom M, Larsson PG, Moberg P, Platz-Christensen JJ, Schedvins K, Wolner-Hanssen P. Infections after hysterectomy. A prospective nation-wide

## BIBLIOGRAFIE

- Swedish study. The Study Group on Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology within the Swedish Society of Obstetrics and Gynecology. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 1996;75(8):757-61.
- (49) Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Amortegui AJ, Heine RP, Landers DV, Sweet RL. Lower genital tract infection and endometritis: insight into subclinical pelvic inflammatory disease. *Obstetrics and gynecology*. 2002;100(3):456-63.
- (50) Ness RB, Kip KE, Hillier SL, Soper DE, Stamm CA, Sweet RL, Rice P, Richter HE. A cluster analysis of bacterial vaginosis-associated microflora and pelvic inflammatory disease. *American journal of epidemiology*. 2005;162(6):585-90.
- (51) Chernes TL, Meyn LA, Krohn MA, Lurie JG, Hillier SL. Association between Acquisition of Herpes Simplex Virus Type 2 in Women and Bacterial Vaginosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(3):319-25.
- (52) Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, Yu KF, Andrews WW, Zhang J, Schwebke JR. Bacterial Vaginosis Assessed by Gram Stain and Diminished Colonization Resistance to Incident Gonococcal, Chlamydial, and Trichomonal Genital Infection. *The Journal of infectious diseases*. 2010;202(12):1907-15.
- (53) Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL. Bacterial Vaginosis Is a Strong Predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* Infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;36(5):663-8.
- (54) Martin JHL, Richardson BA, Nyange PM, Lavreys L, Hillier SL, Chohan B, Mandaliya K, Ndinya-Achola JO, Bwayo J, Kreiss J. Vaginal Lactobacilli, Microbial Flora, and Risk of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Sexually Transmitted Disease Acquisition. *The Journal of infectious diseases*. 1999;180(6):1863-8.
- (55) Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS*. 2008;22(12):1493-501.
- (56) Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, Broeck DV. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC infectious diseases*. 2011(11):10-6.

## BIBLIOGRAFIE

- (57) Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA, Krohn MA, Gibbs RS, Martin DH, Cotch MF, Edelman R, Pastorek JG, 2nd, Rao AV, McNellis D, Regan JA, Carey JC, Klebanoff M. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *The New England journal of medicine*. 1995;333(26):1737-42.
- (58) Leitich H, Kiss H. Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate flora as risk factors for adverse pregnancy outcome. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2007;21(3):375-90.
- (59) Piot P, Van Dyck E, Peeters M, Hale J, Totten PA, Holmes KK. Biotypes of *Gardnerella vaginalis*. *Journal of clinical microbiology*. 1984;20(4):677-9.
- (60) Benito R, Vazquez JA, Berron S, Fenoll A, Saez-Neito JA. A modified scheme for biotyping *Gardnerella vaginalis*. *Journal of medical microbiology*. 1986;21(4):357-9.
- (61) Pedraza-Aviles AG, Inzunza-Montiel AE, Ortiz-Zaragoza MC, Morales-Espinosa MR, Ponce-Rosas ER. [*Gardnerella vaginalis* biotypes: modification of a proposed system]. *Revista latinoamericana de microbiologia*. 1995;37(1):19-26.
- (62) Briselden AM, Hillier SL. Longitudinal study of the biotypes of *Gardnerella vaginalis*. *Journal of clinical microbiology*. 1990;28(12):2761-4.
- (63) Aroutcheva AA, Simoes JA, Behbakht K, Faro S. *Gardnerella vaginalis* isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal ecosystems. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2001;33(7):1022-7.
- (64) Ingianni A, Petruzzelli S, Morandotti G, Pompei R. Genotypic differentiation of *Gardnerella vaginalis* by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS immunology and medical microbiology*. 1997;18(1):61-6.
- (65) Eren AM, Zozaya M, Taylor CM, Dowd SE, Martin DH, Ferris MJ. Exploring the diversity of *Gardnerella vaginalis* in the genitourinary tract microbiota of monogamous couples through subtle nucleotide variation. *PloS one*. 2011;6(10):e26732.
- (66) Santiago GL, Deschaght P, El Aila N, Kiama TN, Verstraelen H, Jefferson KK, Temmerman M, Vaneechoutte M. *Gardnerella vaginalis* comprises three distinct

## BIBLIOGRAFIE

- genotypes of which only two produce sialidase. American journal of obstetrics and gynecology. 2011;204(5):450.e1-7.
- (67) Paramel Jayaprakash T, Schellenberg JJ, Hill JE. Resolution and characterization of distinct cpn60-based subgroups of *Gardnerella vaginalis* in the vaginal microbiota. PloS one. 2012;7(8):e43009.
- (68) Schellenberg JJ, Paramel Jayaprakash T, Withana Gamage N, Patterson MH, Vaneechoutte M, Hill JE. *Gardnerella vaginalis* Subgroups Defined by cpn60 Sequencing and Sialidase Activity in Isolates from Canada, Belgium and Kenya. PloS one. 2016;11(1):e0146510.
- (69) Ahmed A, Earl J, Retchless A, Hillier SL, Rabe LK, Cherpes TL, Powell E, Janto B, Eutsey R, Hiller NL, Boissy R, Dahlgren ME, Hall BG, Costerton JW, Post JC, Hu FZ, Ehrlich GD. Comparative genomic analyses of 17 clinical isolates of *Gardnerella vaginalis* provide evidence of multiple genetically isolated clades consistent with subspeciation into genovars. Journal of bacteriology. 2012;194(15):3922-37.
- (70) Campbell NA, Reece JB, Kratochwil A. Biologie: Pearson Studium; 2009. S. 720-730.
- (71) Muzny CA, Schwebke JR. Pathogenesis of Bacterial Vaginosis: Discussion of Current Hypotheses. The Journal of infectious diseases. 2016;214 Suppl 1:S1-5.
- (72) Swidsinski A, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Verstraelen H, Vaneechoutte M, Lemm V, Schilling J, Mendling W. *Gardnerella* biofilm involves females and males and is transmitted sexually. Gynecologic and obstetric investigation. 2010;70(4):256-63.
- (73) Muzny CA, Schwebke JR. *Gardnerella vaginalis*: Still a Prime Suspect in the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. Current infectious disease reports. 2013;15(2):130-5.
- (74) Jung HS, Ehlers MM, Lombaard H, Redelinghuys MJ, Kock MM. Etiology of bacterial vaginosis and polymicrobial biofilm formation. Critical reviews in microbiology. 2017;43(6):651-67.

## BIBLIOGRAFIE

- (75) Srinivasan S, Fredricks DN. The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*. 2008;2008:750479.
- (76) Swidsinski A, Dorffel Y, Loening-Baucke V, Mendling W, Verstraelen H, Dieterle S, Schilling J. Desquamated epithelial cells covered with a polymicrobial biofilm typical for bacterial vaginosis are present in randomly selected cryopreserved donor semen. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2010;59(3):399-404.
- (77) Schwebke JR, Desmond R. Risk factors for bacterial vaginosis in women at high risk for sexually transmitted diseases. *Sexually transmitted diseases*. 2005;32(11):654-8.
- (78) Fethers KA, Fairley CK, Hocking JS, Gurrin LC, Bradshaw CS. Sexual risk factors and bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;47(11):1426-35.
- (79) Srinivasan S, Hoffman NG, Morgan MT, Morgan MT, Matsen FA, Fiedler TL, Hall RW, Ross FJ, McCoy CO, Bumgarner R, Marrazzo JM, J.M. M, Fredricks DN. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. 2012(7):e37818.
- (80) Schwebke JR, Muzny CA, Josey WE. Role of *Gardnerella vaginalis* in the pathogenesis of bacterial vaginosis: a conceptual model. *The Journal of infectious diseases*. 2014;210(3):338-43.
- (81) Hilbert DW, Schuyler JA, Adelson ME, Mordechai E, Sobel JD, Gyax SE. *Gardnerella vaginalis* population dynamics in bacterial vaginosis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2017;36(7):1269-1278.
- (82) Janulaitiene M, Paliulyte V, Grinceviciene S, Zakareviciene J, Vladisauskiene A, Marcinkute A, Pleckaityte M. Prevalence and distribution of *Gardnerella vaginalis* subgroups in women with and without bacterial vaginosis. *BMC infectious diseases*. 2017;17(1):394.

## BIBLIOGRAFIE

- (83) Vodstrcil LA, Twin J, Garland SM, Fairley CK, Hocking JS, Law MG, Plummer EL, Fethers KA, Chow EP, Tabrizi SN, Bradshaw CS. The influence of sexual activity on the vaginal microbiota and Gardnerella vaginalis clade diversity in young women. *PloS one*. 2017;12(2):e0171856.
- (84) Stift für Lichtmikroskopie und Immunchemie, PAP PEN (Internet). D 2018. (cited 24.10.2018). Available from: <http://www.kiskerbiotech.com/frontoffice/product/pdf?productId=KIOA-04-39>.
- (85) Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission*. 1995;70(5):220-33.
- (86) Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry*. 1992;31(12):3103-12.
- (87) Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, Wilkinson MH, Welling GW. Quantitative fluorescence in situ hybridization of Bifidobacterium spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Applied and environmental microbiology*. 1995;61(8):3069-75.
- (88) Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Grijpstra J, Knol J, Degener JE, Welling GW. Development of 16S rRNA-based probes for the Coriobacterium group and the Atopobium cluster and their application for enumeration of Coriobacteriaceae in human feces from volunteers of different age groups. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(10):4523-7.
- (89) Fallani M, Rigottier-Gois L, Aguilera M, Bridonneau C, Collignon A, Edwards CA, Corthier G, Dore J. Clostridium difficile and Clostridium perfringens species detected in infant faecal microbiota using 16S rRNA targeted probes. *Journal of microbiological methods*. 2006;67(1):150-61.
- (90) Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and environmental microbiology*. 1998;64(9):3336-45.

## BIBLIOGRAFIE

- (91) Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology*. 1996;142 (Pt 5):1097-106.
- (92) Harmsen HJM, Elfferich P, Schut F, Welling GW. A 16S rRNA-targeted Probe for Detection of Lactobacilli and Enterococci in Faecal Samples by Fluorescent In Situ Hybridization. *Microbial ecology in health and disease*. 1999;11(1):3-12.
- (93) Harmsen HJ, Raangs GC, He T, Degener JE, Welling GW. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Applied and environmental microbiology*. 2002;68(6):2982-90.
- (94) Meier H, Amann R, Ludwig W, Schleifer KH. Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G + C content. *Systematic and applied microbiology*. 1999;22(2):186-96.
- (95) Thurnheer T, Gmur R, Giertsen E, Guggenheim B. Automated fluorescent in situ hybridization for the specific detection and quantification of oral streptococci in dental plaque. *Journal of microbiological methods*. 2001;44(1):39-47.
- (96) Bohnert J, Hubner B, Botzenhart K. Rapid identification of Enterobacteriaceae using a novel 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *International journal of hygiene and environmental health*. 2000;203(1):77-82.
- (97) Fritsche O. *Physik für Biologen und Mediziner*: Springer Berlin Heidelberg; 2014. S. 102.
- (98) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Häcker B. *Molekularbiologie der Zelle*: Wiley-VCH-Verlag; 2011. S. 7-10.
- (99) Swidsinski A. Standards for bacterial identification by fluorescence In situ hybridization within eukaryotic tissue using ribosomal rRNA-based probes. *Inflamm Bowel Disease*. 2006;12(8):824-6; author reply 826-7.
- (100) Shipitsyna E, Krysanova A, Khayrullina G, Shalepo K, Savicheva A, Guschin A, Unemo M. Quantitation of all Four Gardnerella vaginalis Clades Detects Abnormal Vaginal Microbiota Characteristic of Bacterial Vaginosis More Accurately than Putative G. vaginalis Sialidase A Gene Count. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2019.(Online-Vorabveröffentlichung).

## BIBLIOGRAFIE

- (101) Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108 Suppl 1:4680-7.
- (102) Fettweis JM, Brooks JP, Serrano MG, Sheth NU, Girerd PH, Edwards DJ, Strauss JF, 3rd, Jefferson KK, Buck GA. Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry. *Microbiology*. 2014;160(Pt 10):2272-82.
- (103) Livengood CH. Bacterial Vaginosis: An Overview for 2009. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*. 2009;2(1):28-37.
- (104) Menard JP, Fenollar F, Henry M, Bretelle F, Raoult D. Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;47(1):33-43.
- (105) Kerr B, Riley MA, Feldman MW, Bohannan BJ. Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature*. 2002;418(6894):171-4.
- (106) Schluter D. Ecological Causes of Adaptive Radiation. *The American Naturalist*. 1996;148:S40-S64.
- (107) Schuyler JA, Mordechai E, Adelson ME, Sobel JD, Gyax SE, Hilbert DW. Identification of intrinsically metronidazole-resistant clades of *Gardnerella vaginalis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2016;84(1):1-3.
- (108) Swidsinski A, Verstraelen H, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Mendling W, Halwani Z. Presence of a polymicrobial endometrial biofilm in patients with bacterial vaginosis. *PloS one*. 2013;8(1):e53997.
- (109) Machado A, Jefferson KK, Cerca N. Interactions between *Lactobacillus crispatus* and bacterial vaginosis (BV)-associated bacterial species in initial attachment and biofilm formation. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(6):12004-12.

## BIBLIOGRAFIE

- (110) Slotnick IJ, Hildebrandt RJ, Prystowsky H. Microbiology of the femal genital tract. IV. Cervical and vaginal flora during pregnancy. *Obstetrics and gynecology*. 1963;21:312-7.
- (111) Bartlett JG, Moon NE, Goldstein PR, Goren B, Onderdonk AB, Polk BF. Cervical and vaginal bacterial flora: ecologic niches in the female lower genital tract. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1978;130(6):658-61.
- (112) MacDonald SW, Manuel FR, Embil JA. Localization of group B beta-hemolytic streptococci in the female urogenital tract. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1979;133(1):57-9.
- (113) Ross JM, Needham JR. Genital flora during pregnancy and colonization of the newborn. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 1980;73(2):105-10.
- (114) Bartlett JG, Polk BF. Bacterial flora of the vagina: quantitative study. *Reviews of infectious diseases*. 1984;6 Suppl 1:S67-72.
- (115) Kim TK, Thomas SM, Ho M, Sharma S, Reich CI, Frank JA, Yeater KM, Biggs DR, Nakamura N, Stumpf R, Leigh SR, Tapping RI, Blanke SR, Slauch JM, Gaskins HR, Weisbaum JS, Olsen GJ, Hoyer LL, Wilson BA. Heterogeneity of vaginal microbial communities within individuals. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(4):1181-9.
- (116) Brotman RM, Erbeding EJ, Jamshidi RM, Klebanoff MA, Zenilman JM, Ghanem KG. Findings associated with recurrence of bacterial vaginosis among adolescents attending sexually transmitted diseases clinics. *Journal of pediatric and adolescent gynecology*. 2007;20(4):225-31.
- (117) Chernes TL, Hillier SL, Meyn LA, Busch JL, Krohn MA. A delicate balance: risk factors for acquisition of bacterial vaginosis include sexual activity, absence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli, black race, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sexually transmitted diseases*. 2008;35(1):78-83.
- (118) Marrazzo JM, Koutsky LA, Eschenbach DA, Agnew K, Stine K, Hillier SL. Characterization of vaginal flora and bacterial vaginosis in women who have sex with women. *The Journal of infectious diseases*. 2002;185(9):1307-13.

## BIBLIOGRAFIE

- (119) Swidsinski A, Dorffel Y, Loening-Baucke V, Schilling J, Mendling W. Response of *Gardnerella vaginalis* biofilm to 5 days of moxifloxacin treatment. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2010;61(1):41-6.
- (120) Eschenbach DA, Thwin SS, Patton DL, Hooton TM, Stapleton AE, Agnew K, Winter C, Meier A, Stamm WE. Influence of the Normal Menstrual Cycle on Vaginal Tissue, Discharge, and Microflora. *Clinical Infectious Diseases*. 2000;30(6):901-7.
- (121) Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, Fiedler TL, Thomas KK, Agnew KJ, Marrazzo JM, Fredricks DN. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PloS one*. 2010;5(4):e10197.
- (122) Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Romero R. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2011;118(5):533-49

ANHANG

# ANHANG

# EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Anne Luise Reißhauer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der Verteilung von *Gardnerella vaginalis* - Genotypen bei Frauen mit bakterieller Vaginose mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung's (FISH) Sonden“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

CURRICULUM VITAE

# CURRICULUM VITAE

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## EIGENE PUBLIKATIONEN

**Reißhauer AL**, Jarmer J, Tsokos M, Buschmann CT. Akzidentielle Handverletzungen nach Messersuizid. 2018;28(5):434-7.

Swidsinski A, Dorffel Y, Loening-Baucke V, Gille C, Goktas O, **Reißhauer AL**, Neuhaus J, Weylandt KH, Guschin A and Bock M. Reduced Mass and Diversity of the Colonic Microbiome in Patients with Multiple Sclerosis and Their Improvement with Ketogenic Diet. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:1141.

Swidsinski A, Dorffel Y, Loening-Baucke V, Gille C, **Reißhauer AL**, Goktas O, Kruger M, Neuhaus J and Schrodل W. Impact of humic acids on the colonic microbiome in healthy volunteers. *World journal of gastroenterology*. 2017;23:885-890.

# DANKSAGUNG

Mein Dank gilt an erster Stelle Frau Prof. Dörffel und Herr Dr. Swidsinski für die Überlassung des Themas. Ohne die Betreuung und die konstruktiven Anregungen wäre diese Promotion nicht möglich gewesen. Über die gesamte Zeit waren Sie mir eine kritische dabei aber auch warmherzige Unterstützung. Meinen herzlichen Dank dafür.

Auch möchte ich mich herzlich bei Herr Prof. Guschin und seiner Arbeitsgruppe für die Entwicklung der FISH-Sonden und die Erlaubnis der Verwendung von Abbildungen bedanken. Einen besonderen Dank möchte ich Frau Dr. Anvarovna für die gute Zusammenarbeit aussprechen.

Außerdem würde ich gerne einen Dank an die Teilnehmer des Expertengruppentreffens im Frühjahr 2018 aussprechen und mich hier nochmals für die kollegiale Kritik und die Anregungen bedanken.

Einen ganz herzlichen Dank möchte ich Frau Schlien aussprechen. Sie hat mir mit viel Geduld im Labor alles erklärt und im Verlauf der Arbeit bei Fragen immer kurzfristig geholfen.