

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtsmedizin  
Vivantes Klinikum Am Urban/Berlin

DISSERTATION

Nachweis bakterieller Biofilme im oberen Genitaltrakt der Frau

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité- Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Univ. Damaskus Zaher Halwani

aus Damaskus

Datum der Promotion: 22.06.2014

# **Inhaltverzeichnis**

## **1. Einleitung**

- 1.1 Normale Vaginalflora
- 1.2 Bakterielle Vaginose (BV)
- 1.3 Aerobe Vaginitis (AV)
- 1.4 Bakterielle Vaginose und ascendierende Genitalinfektionen
  - 1.4.1 Zervizitis
  - 1.4.2 Endometritis
  - 1.4.3 Salpingitis (Adnexitis, pelvic inflammatory disease PID)
  - 1.4.4 Tubovarialabszess
- 1.5 Bakterielle Biofilme in der Medizin
- 1.6 Bakterielle Biofilme in der Frauenheilkunde

## **2. Ziel der Arbeit**

## **3. Hypothesen**

## **4. Material und Methoden**

- 4.1 Patientinnen
  - 4.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien
- 4.2 Bestimmung des pH- Wertes
- 4.3 Nugent- Score
- 4.4 Urinentnahme und Fixierung
- 4.5 Gewebeproben
- 4.6 Fluoreszenz- *in situ* -Hybridisierung (FisH)
- 4.7 Datenerhebung
  - 4.7.1. Erhebungsbogen

## **5. Ergebnisse**

- 5.1 Patientinnen
- 5.2 Operationsindikationen
- 5.3 pH- Wert

#### 5.4 Nugent- Scores

#### 5.5 Bakterieller Biofilm im Urin

##### 5.5.1 Gardnerella- Biofilm im Urin und Alter der Patientinnen

##### 5.5.2 Gardnerella Biofilm im Urin und Nugent-Score

#### 5.6 Gardnerella-Biofilme im Gewebe des oberen Genitaltraktes

##### 5.6.1 Gardnerella- Biofilm im Endometrium

##### 5.6.2 Gardnerella- Biofilm im Abortabradat

##### 5.6.3 Gardnerella- Biofilm im Eileiter

#### 5.7 Gardnerella- Biofilm im Urin und im oberen Genitaltrakt von Schwangeren

#### 5.8 pH- Wert und Nachweis eines Gardnerella- Biofilms im oberen Genitaltrakt

#### 5.9 Nugent-Score und Gardnerella-Biofilm im oberen Genitaltrakt

### **6. Diskussion**

### **7. Zusammenfassung**

### **8. Literaturverzeichnis**

### **9. Eidesstattliche Erklärung**

### **10. Lebenslauf**

### **Abstrakt:**

Es wurde bei 68 Frauen , bei denen medizinisch indizierte fraktionierte Abrasionen, Hysterektomien, Abortabrasiones, missed abortion oder einer Salpingektomie/Adnexektomie durchgeführt wurde, der vaginale pH- Wert und der Nugent – Score bestimmt. An den Epithelzellen ihres Urins wurden für bakterielle Vaginose typische Biofilme ermittelt.

Das operativ entnommene Gewebe (Endometrium, Abort- Abradat oder Tuben-Schleimhaut) wurde ebenfalls auf solche Biofilme untersucht.

Im Urin von 18 der 68 Frauen (26,5%) wurde ein für BV typischer Gardnerella-Biofilm an Epithelzellen identifiziert.

In 8 der 68 Gewebeproben (11,8%) aus dem oberen Genitaltrakt wurde ein für BV typischer Biofilm gefunden (2 von 27 am Endometrium, 5 von 19 im Abortabradat, 1 von 22 am Tubenepithel)

Der Nachweis eines strukturierten Biofilmes könnte von größerer Bedeutung für die infektiöse Morbidität der entsprechenden Patientinnen sein.

### **Abstract:**

We investigated in 68 women with medically indicated curettage, hysterectomies, missed abortion or a salpingectomy / adnexectomy , the vaginal pH and Nugent - score.

And to the epithelial cells of their urine were determined typical biofilms for bacterial vaginosis.

The surgically removed tissue (endometrium or tubal mucosa) was also investigated in such biofilms.

In 18 urines of 68 women (26.5%) was identified in epithelial cells typical of BV Gardnerella biofilm.

In 8 of the 68 tissue samples (11.8%) from the upper genital tract was found for a typical BV biofilm (2 of 27 in the endometrium, 5 of 19 in Abortabradat, one of 22 on Tubenepithel).

Evidence of a structured biofilm could be of greater importance for the infectious morbidity of the corresponding patients.

## Abkürzungsverzeichnis

AV	Aerobe Vaginitis
BV	Bakterielle Vaginose
CT	Chlamydia trachomatis
E. coli	Escheria coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FisH	Fluoreszenz in- situ Hybridisierung
G	Gauge
GB	Gardnerella Biofilm
GF	Gesichtsfeld
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
NaCl	Natriumchlorid
NG	Neisseria gonorrhoeae
SSW	Schwangerschaft
TNF	Tumornekrosefaktor

# 1. Einleitung

## 1.1 Normale Vaginalflora

Die Vagina des neugeborenen Mädchens ist praktisch steril. Schon am dritten Lebenstag hingegen ist die Scheide von Laktobazillen, koagulasenegativen Staphylokokken und von Enterokokken besiedelt (49).

Die gesunde Vaginalflora der östrogenisierten Frau wird von Laktobazillen dominiert, die ab dem ersten Lebenstag von der Mutter (hauptsächlich *L. gasseri* aus der Muttermilch) kommend den kindlichen Darm und die Scheide kolonisieren, aber aufgrund des fehlenden Östrogens zunächst keine passenden Lebensbedingungen vorfinden.

Während der Pubertät werden Laktobazillen zu den zahlenmäßig bedeutendsten Bakterien in der Vagina.

Albert Döderlein hat als erster die Bedeutung von Laktobazillen für die gesunde Scheidenflora erkannt (47). Durch moderne Techniken zur Identifizierung werden jedoch in den letzten Jahren neue Erkenntnisse gewonnen, die auch neue Fragen aufwerfen.

Kürzlich wurde bekannt, dass kaukasische, schwarze, hispanische und asiatische Frauen signifikant unterschiedliche pH- Werte in der Scheide aufweisen, und dass ihre Vaginalflora je nach ethnischer Herkunft von vier unterschiedlichen Laktobazillusarten dominiert wird und 5-30% aller Frauen gar keine Laktobazillen in der gesunden Scheide haben (29).

Unter 400facher Vergrößerung ist die Beurteilung der Vaginalflora klinisch einfach, allerdings ist die Unterschied zwischen „guten“ und weniger „guten“ Laktobazillen nicht möglich und nötig, andere Bakterien dort zu differenzieren. Laktobazillen bilden verschiedene antibakterielle Substanzen (56).

Sie produzieren:

- Milchsäure
- Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Bakteriozine
- Biosurfactants
- und Koaggregationsmoleküle

So soll verhindert werden, dass aufsteigende Infektionen das biologische Ziel der Fortpflanzung gefährden. Von besonderer Bedeutung ist dabei die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Bildung (18).

In der gesunden Vaginalflora befinden sich auch verschiedene aerobe und anaerobe Bakterienarten, die meistens beim üblichen Nativpräparat nicht auffallen (51) weil sie in geringer Keimzahl unter etwa 10<sup>2-6</sup> ml vorliegen.

Bei kultureller Untersuchung werden verschiedene Aerobier und Anaerobier wie z.B. Staphylokokken, Streptokokken, Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Peptostreptokokken, Prevotellaarten sowie Gardnerella (G.) vaginalis, Candidaarten und Mykoplasmen nachgewiesen, die auch zur transienten Normalflora gehören.

Bei Verwendung der Polymerase- Chain- Reaction (PCR) werden viele weitere Bakterienarten in der Scheide gefunden, die teilweise noch namenlos und in ihrer Bedeutung unklar sind. Ihr Vorkommen und Ihre Anzahl kann täglich wechseln. So ist das vaginale Mikrobiom ein dynamisches Auf und Ab in einem individuellen Wechselspiel zwischen genetischem und ethnischen Hintergrund mit immunologischen und äußeren Einflüssen (29).

Eine gesunde Vaginalflora ist insbesondere bei Kinderwunsch und in der Schwangerschaft von großer Bedeutung, da eine pathologische bakterielle Besiedlung das Früh- und Fehlgeburtrisiko erhöht (14, 32, 35).

Hefepilze der Gattung Candida gehören zwar nicht zur physiologischen Flora des Körpers, sind jedoch bei Gesunden häufig im Gastrointestinaltrakt und bei Frauen in der Vagina- abhängig vom östrogenbedingten Glykogen bzw. Zuckergehalt zu finden (49).

## 1.2 Bakterielle Vaginose.

Gardner und Dukes (24) beschrieben 1995 erstmals die von ihnen „Haemophilus vaginalis- Vaginitis“ genannte Störung der Vaginalflora so wie die charakteristischen „clue cells“ (Schlüsselzellen), mit Bakterien bedeckten Epithelzellen im Nativpräparat des Vaginalsekrets.

Gardner war überzeugt, dass er eine weitere sexuell übertragbare Erkrankung entdeckt hatte, die bisher nur „unspezifische Vaginitis“ genannt worden (23, 24, 48, 50).

Seit der ersten Internationalen Konferenz über Vaginosis in Kristiansand (Norwegen) im Jahr 1982 und folgenden Konsensusmeetings wurde die bakterielle Vaginose (BV) als „replacement of the lactobacilli of the vagina by characteristic groups of bacteria accompanied by changed properties of the vaginal fluid“ definiert (71).

Subjektives Leitsymptom ist der übelriechende vaginale Ausfluss.

Die BV wird üblicherweise nach den „Amsel- Kriterien“ diagnostiziert (1).

**Tab2.1 Kriterien für die BV Diagnose (1)**

<b>Kriterien</b>
1. > 20% Schlüsselzellen
2. pH über 4.5
3. positiver Amintest
4. grau-weißer Fluor

- Drei der vier Kriterien müssen für die Diagnose einer BV erfüllt sein

Man nimmt an, dass durch Abnahme von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – bildenden Laktobazillen eine pH- Wert- Erhöhung und eine Zunahme von Gardnerella vaginalis, Prevotella-, Pophyromonas-, Peptostreptococcus- und Mobiluncusarten sowie Mykoplasmen auftritt.

Die Entstehung des unangenehmes Geruches erfolgt durch Bildung von

Putreszin, Cadaverin und Methylamin der anaeroben Flora (49).

Eine reproduzierbare Beurteilung der Vaginalflora am fixierten Grampräparat mit 1000facher Vergrößerung ermöglicht der Nugent- Score (9, 53) (Tab. 2.2)

**Tab. 2.2: Score zur Beurteilung der Vaginalflora (52)**

Score	Grampositive Stäbchen (Laktobazillen)	Gramnegative Stäbchen (Gardnerella, Prevotella, Porphyromonas)	Gramlabile, gebogene Stäbchen (Mobiluncus)
0	4+ (>30/GF)	0(0)	0
1	3+(5-30/GF)	1+ (<1/GF)	1+ oder 2+
2	2+ (1-5/GF)	2+ (1-5/GF)	3+ oder 4+
3	1+ (<1/GF)	3+ (5-30/GF)	Punkte wie gramnegative Stäbchen)
4	0(0)	4+ (>30/GF)	

**Bewertung:**

0-3 Punkte: normal

4-6 Punkte: intermediär

7-10 Punkte: bakterielle Vaginose

Die BV ist nicht nur ein ästhetisches Problem, sondern auch von medizinische Bedeutung. Sie führt zu aufsteigenden Infektionen (Tab. 2.3) und zu Frühgeburten (Tab 2.4)

**Tab. 2.3: Gynäkologische Risiken, die aus einer bakterielle Vaginose entstehen können (49)**

Endogen und iatrogen	Zervizitis Endomyometritis Salpingitis Tubovarialsabszeß Bartholinitis Vulvitis
Nach Abort oder Geburt	Endometritis Salpingitis
Nach vaginaler Hysterektomie	Scheidenstumpfinfektion

Es ist schon seit mindestens 25 Jahren bekannt, dass die BV das Risiko für Frühgeburten erhöht und zu vorzeitigen Wehen, vorzeitigem Blasensprung, sowie Amnionitis, Bauchdeckenabszess nach Sectio und Sekundärheilung einer Episiotomie oder Dammverletzung, perinatalen und neonatalen Infektionen (19, 22, 26, 27, 35, 37, 46, 51) (Tab. 2.4) führen kann.

Donders wies darauf hin, dass eine differenziertere Betrachtung der vaginalen Flora auch differenziertere Risiken für Frühgeburtslichkeit aufdeckt. So ist des Risiko besonders hoch, wenn eine " partielle" BV, eine aerobe Vaginitis oder das Fehlen von Laktobazillen vorliegen (11, 13, 14, 17).

**Tab. 2.4: Zusammenhang zwischen Frühgeburt und bakterieller Vaginose im Nativpräparat (46).**

	Nativ- und Gram- Präparat					
	Normal		BV		Total	
	n	%	n	%	n	%
Total	88	77,8	25	22,1	113	100
Geburten nach 38. SSW ohne vorzeitigen Blasensprung	61	80,2	15	19,7	76	67,2
Alle nach 38. SSW	78	82,1	17	17,8a	95	84
Vorzeitige Blasensprung vor 38. SSW	5	-	6	-	11	9,7
Vorzeitige Wehen vor 38. SSW (2- mal Gemini)	5	-	2	-	7	6,1
Alle vor 38. SSW	10	55,5	8	44,4a	18	15,9

a. Exakter Fisher- Test:  $p < 0.03$

Die Indikation zur Therapie einer bakteriellen Vaginose mit Metronidazol oder Clindamycin besteht bei Beschwerden oder bei den o.g. Risiken.

Der bakteriologische Nachweis von *Gardnerella vaginalis* oder anaeroben Bakterien ist keine Therapieindikation (41).

Ein besonderes Problem trotz leitliniengerechter Therapie ist die hohe Rezidivrate von über 30% nach drei Monaten und bis 70% nach sechs bis neun Monaten (38).

### 1.3 Aerobe Vaginitis

Gardner beschrieb 1968 eine „desquamative inflammatory vaginitis“ und empfahl als Therapie Corticoide (25).

Auch Sobel (60) gebrauchte 1994 diesen Namen und behandelte mit Clindamycin.

Petersen nannte 2004 die Erkrankung „Plasmazell-Vaginitis“ (zitiert in 49).

Donders hat 2002 den Begriff „Aerobe Vaginitis“ (AV) eingeführt und die Erkrankung ausführlich charakterisiert (12, 17).

Die Patientinnen klagen über verstärkten gelbgrünen und dünnen Fluor ohne Amingeruch, oft auch über Dyspareunie mit gelegentlichem Jucken oder Brennen im Genitalbereich. Die Scheide ist deutlich entzündet und der pH ist über fünf bis sechs im Nativpräparat sieht man „toxische“ Leukozyten, keine Laktobazillen, Parabasalzellen und eine kokkoide Flora (12, 49).

Ein bakterieller Biofilm besteht nicht (Swidsinski, persönl. Mitteilung 2011).

In der Gramfärbung findet man grampositive Kokken.

Kulturell werden oft B-Streptokokken nachgewiesen, aber auch andere Aerobier.

Als Differentialdiagnose sollen Trichomoniasis, Lichen ruber und andere Kolpitiden ausgeschlossen werden.

Die Therapie dieser Erkrankung ist schwierig und mit einer starken Rezidivrate von 29% der Fälle trotz prolongierter Clindamycin-Gabe belastet (60). Deshalb empfiehlt Donders eine lokale Creme aus Hydrocortison, Estriol und Clindamycin für mindestens drei Monate, ähnlich wie es vorher Gardner riet (Mendling, persönl. Mitteilung 2011).

Interessant sind Hinweise auf einen möglichen Mangel an Vitamin D3 in einigen Fällen (55).

## **1.4 Bakterielle Vaginose und ascendierende Genitalinfektionen**

### **1.4.1 Zervizitis**

Die BV erhöht signifikant das Risiko für ascendierende bakterielle Infektionen (41). Man hat sich darauf geeignet, dass bei einem Nachweis von mehr als 25 Leukozyten/ Gesichtsfeld bei 400 facher Vergrößerung im Nativpräparat des Zervikalsekretes eine Zervizitis vorliegt.

Außerdem sollte eine Zervizitisdiagnostik erfolgen bei (49):

- zervikalem Fluor
- Urethritis des Partners
- Verdacht auf Salpingitis
- bei der Sterilitätsabklärung
- vor Einlage eines Intrauterinpeessars

Typische Erreger einer Zervizitis sind Chlamydia trachomatis D - K, Neisseria gonorrhoeae und die aerob- anaerobe Mischflora der BV (34, 49, 61).

### **1.4.2 Endometritis**

Die Symptome einer akuten Endometritis sind meistens uncharakteristisch (dysfunktionelle Blutung, Druckgefühl).

Die sichere Diagnose einer Endometritis ist histologisch durch ein Abradat aus dem Uterus möglich (30).

### **1.4.3 Salpingitis (Adnexitis,“pelvic inflammatory disease“/ PID)**

Die Salpingitis ist fast immer eine ascendierende Erkrankung, mit Ausnahme der seltenen hämatogenen tuberkulösen Salpingitis. Man schätzt, dass etwa 15% aller Frauen bis zum Alter von 30 Jahren einmal eine Adnexitis erleiden. Etwa 15% der Frauen, die an einer nichtgonorrhoeischen Salpingitis leiden, werden infertil. Frauen bekommen nach einer Salpingitis

6 - bis 10 - mal häufiger eine ektopische Gravidität als andere Frauen, und etwa

20% von ihnen leiden später an chronischen Unterbauchbeschwerden (34, 70).

Hoyme hat nachgewiesen, dass bei PID Chlamydien als Ursache nur an den Tuben, nicht aber in der Zervix gefunden werden können, was ein Grund mehr für eine laparoskopische Diagnostik ist (Tab. 2.5) (20, 34, 54, 70).

**Tabelle 2.5. Laparoskopisch gesicherte Fälle von Salpingitis in Erfurt (34)**

Nachweis von (CT) und (NG) bei 363 Frauen mit laparoskopisch gesicherter Salpingitis/PID in Erfurt.				
363=100%	CT		NG	
	n	%	n	%
Nur positiv in der Zervix	55	15,2	5	1,4
Nur positiv in den Tuben	47	12,9	1	0,3
Positiv in Zervix, Urethra und/oder Tube	103	28,4	6	1,6

#### 1.4.4 Tuboovarialabszess

Eine Adnexitis kann in 5-10% aller Fälle zu einem Tuboovarialabszess werden.

Meistens sind die Frauen etwa 10- 20 Jahre älter als Frauen mit einer akuten Salpingitis (49)

Die Therapie ist meist kombiniert chirurgisch und antibiotisch.

## 1.5 Bakterielle Biofilme in der Medizin

In der Natur sind Biofilme aus Bakterien seit Langem bekannt. In der Medizin hingegen wurden Biofilme um das Jahr 2000 erstmals bei chronischen Infektionen und an Kunststoffimplantaten beobachtet (3, 8), sowie in vitro untersucht (6, 21).

So können zentrale Venenkatheter, Herzklappen, Herzunterstützungssysteme, Koronarstents, neurochirurgische ventrikuläre Shunts, implantierbare neurologische Stimulatoren, Arthro-Prothesen, Bruch-Fixierungsvorrichtungen, aufblasbare Penis-Implantate, Brust-Implantate, Cochlea-Implantate, Intraokularlinsen, Zahnimplantate etc. von bakteriellen oder auch Pilzbiofilmen (44), besiedelt sein und somit chronische Infektionen unterhalten, die nur durch Entfernung des Implantates heilbar sind. Biofilme spielen auch bei chronischen Darmerkrankungen eine Rolle (63).

Bakterielle Adhärenz und Biofilm-Produktion erfolgen in mehreren Schritten (8):

- Verbindung zu einer Oberfläche
- Zell-zu-Zell-Adhäsion (Synthese intrazellulärer Matrix) mit Vermehrung von Bakterien auf der künstlichen Oberfläche

Der erste Schritt erfordert die Vermittlung durch bakterielle Oberflächenproteine. Biofilmbildung wird teilweise durch „Quorum Sensing“ im planktonischen Vorkommen, einem interbakteriellen Mechanismus für die Kommunikation ab einer kritischen Besiedlungsdichte, dem „Quorum“, gesteuert (8).

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FisH) ist eine Methode, mit der Bakteriengattungen oder – arten mit Hilfe spezifischer Marker charakteristisch angefärbt und in räumlicher Anordnung am Gewebe mikroskopisch dargestellt werden können. So ist es möglich, Biofilme zu sehen und zu charakterisieren. Im tierischen Verdauungstrakt konnte mittels einer FisH Biofilmbildung durch Laktobazillusarten dokumentiert werden (38).

## 1.6 Bakterielle Biofilme in der Frauenheilkunde

Bei systematischen Untersuchungen von Scheidenbiopsien prä- und postmenopausaler gesunder und an bakterieller Vaginose erkrankter Frauen konnte erstmals auch ein bakterieller Biofilm in der Frauenheilkunde gezeigt werden (64).

Der bei Frauen mit bakterieller Vaginose gefundene Biofilm ist folgendermaßen charakterisiert:

- er besteht in bis zu 90% seiner Masse aus *Gardnerella vaginalis*
- in 10- 40% seiner Masse aus *Atopobium (A) vaginae*
- bis zu 10% seiner Masse stellen andere Bakterien dar, u. a. überraschenderweise auch Laktobazillen. Aufgrund von Untersuchungen anderer könnte es sich dabei um *L. iners* handeln (10).

Der bakterielle Biofilm ist durch die leitliniengerechte Therapie mit Metronidazol nicht zu beseitigen. Er wird zwar in seiner „Vitalität“ geschwächt, erholt sich aber innerhalb von vier Wochen zur alten Stärke und könnte somit die Ursache für die häufigen Rezidive der bakterielle Vaginose sein (64).

Auch beim Sexualpartner von Frauen mit bakteriellen Vaginosen (BV) konnte der gleiche Biofilm an Epithelzellen, die sich im Urin beider Partner in gleicher Weise befinden, wie auch an der Vaginalhaut der erkrankten Patientin nachgewiesen werden (69). Auch im kryokonservierten Sperma von Samenspendern wurden vereinzelt *Gardnerella*- Biofilme an Zellen nachgewiesen (68).

In einer Therapiestudie, bei der zusätzlich zur leitliniengerechten Metronidazol-Therapie eine fünftägige Behandlung mit 400mg Moxifloxacin pro Tag erfolgte, konnte dieser Biofilm bei Frauen mit bakterieller Vaginose nicht beseitigt werden, sondern war in 40% der Fälle 10- 20 Wochen nach Ende der Therapie trotz klinischer Besserung der Amsel- und Nugent- Kriterien nachweisbar (66).

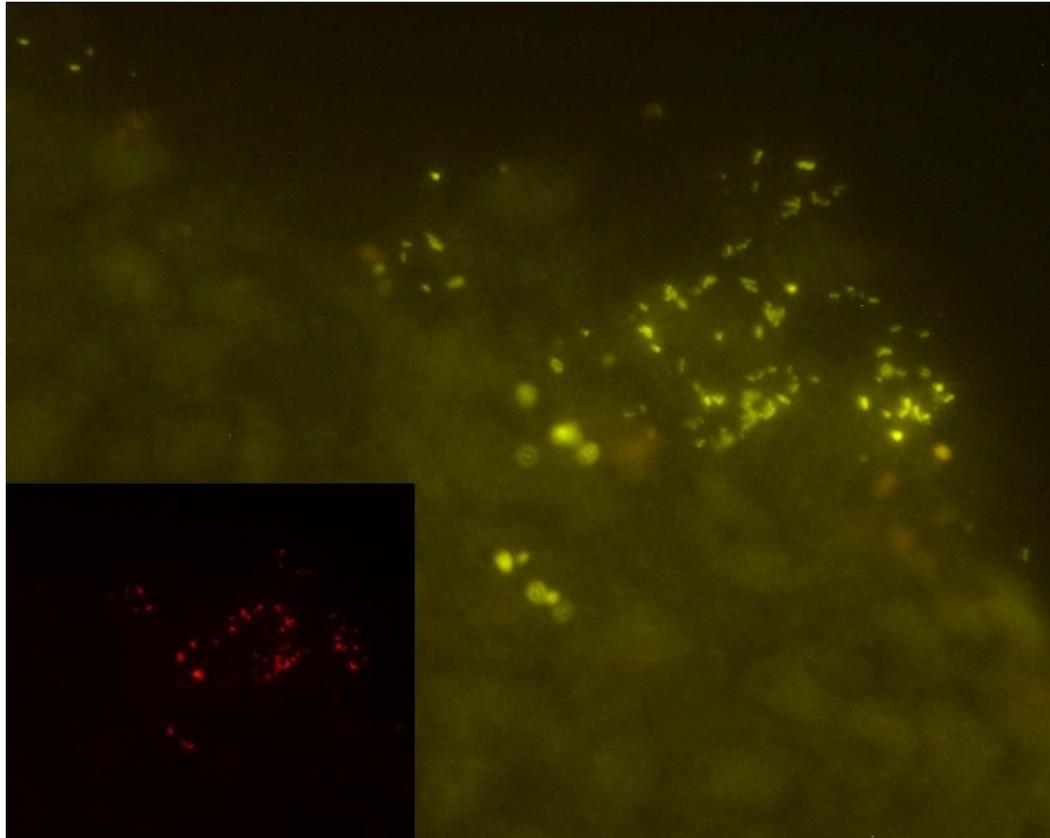
Es ist somit zusammenfassend festzustellen, dass Frauen mit bakterieller Vaginose mit der leitliniengerechten Behandlung zwar anfänglich symptomfrei

werden, nach drei bis sechs Monaten aber in etwa zwei Drittel der Fälle ein Rezidiv erleiden, das seine Ursache offensichtlich in dem nicht beseitigten

bakteriellen Biofilm von *Gardnerella vaginalis* und *Atopobium vaginae* hat (53,64) (Bild 1).

**Bild 1**

Eine desquamierte vaginale Epithelzelle im Urinsediment bedeckt mit einem *Gardnerella* Biofilm (rote Fluoreszenz, Gard C5 Sonde, x 1000). Der Ausschnitt zeigt Laktobazillen im gleichen Mikroskopiefeld (Lab C3 Sonde, orange Fluoreszenz, x 1000) (aus 67).



Bei Frauen mit chronisch rezidivierender Vaginalkandidose wurde ein *Candida*-Biofilm an einem Intrauterinpeessar nachgewiesen (4).

## **2. Ziele der Arbeit**

Mit der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, den bisher nur bei Frauen mit bakterieller Vaginose nachgewiesenen bakteriellen Biofilm an der Vaginalwand auch im oberen Genitaltrakt darzustellen. Da nicht bekannt ist, ob bakterielle Biofilme überhaupt im Uterus oder in den Eileitern vorkommen können, sollen ungezielt im Rahmen einer Pilotstudie symptomatische und asyptomatische Frauen untersucht werden.

## **3. Hypothesen**

Der Gardnerella- Biofilm ist bei der bakteriellen Vaginose mit den bisher üblichen Therapien offensichtlich nicht zu beseitigen und stellt somit die wahrscheinliche Ursache für die häufigen Rezidive der bakterielle Vaginose dar. Es ist bekannt, dass Frauen mit bakterieller Vaginose ein signifikant erhöhtes Risiko für ascendierende Infektionen (Endometritis, Salpingitis) haben. Weiterhin ist bekannt, dass trotz schnell einsetzender und adäquater antibiotischer Therapie einer Salpingitis etwa 10% der Frauen dennoch Defekte an den Tuben behalten (70).

Deshalb wäre es interessant zu wissen, ob bakterielle Biofilme im oberen Genitaltrakt vorkommen (und möglicherweise wie bei der BV bisher nicht antibiotisch zu beseitigen sind).

Es soll außerdem versucht werden, eine mögliche Korrelation zwischen bakteriellen Biofilmen im unteren und oberen Genitaltrakt der Frau zu finden und darüber hinaus auch untersucht werden, ob Frauen mit Verlust der Schwangerschaft im ersten Trimenon oder einer Tubargravidität auch eine auffällige Häufung solcher Biofilme aufweisen.

Deshalb sollen Biopsien aus dem Endometrium, den Eileitern sowie Abortgewebe auf des Vorhandensein von bakteriellen Biofilmen untersucht werden. Dies sollte mit Erststrahlurin und den darin evtl. nachweisbaren Biofilmen aus dem Scheiden- Milieu bzw. dem pH- Wert und dem Nugent-Score verglichen werden.

## 4. Material und Methoden

Es handelt sich um eine Pilotstudie, bei der Patientinnen mit geplanten medizinisch indizierten Eingriffen wie fraktionierter Abrasio, Abortabrasio, Hysterektomie, Salpingektomie oder Adnektomie nach entsprechender Aufklärung über das geplante Vorgehen untersucht wurden. Dazu wurde von dem medizinisch indiziert entnommenen Gewebe ein winziger Teil von 1- 5 mm Größe separiert und der geplanten Untersuchung zugeführt.

Weiterhin wurden der pH- Wert der Scheide und der Nugent- Score bestimmt (9, 52) sowie Erststrahlurin zur Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung entnommen. Da bei vielen Patientinnen der Studie die Aufnahmeuntersuchung nicht vom Autor selbst durchgeführt werden konnte, wurden von anderen Untersuchern evtl. beurteilte Nativpräparate wegen der fehlendem diagnostischen Sicherheit nicht in der Studie verwendet und stattdessen bei allen Patientinnen der reproduzierbare Nugent- Score beurteilt.

Alle Patientinnen waren mündlich und schriftlich über die geplanten Untersuchungen aufgeklärt worden und hatten ihre schriftliche Zustimmung gegeben. Die Zustimmung der Ethikkommission der Charité lag vor (Nummer: EA4/083/11, Votum vom 27.10.2011)

Alle Untersuchungen wurden auf einem, für diese Studie entworfenen, Untersuchungsbogen dokumentiert und digitalisiert erfasst. Die statistische Bearbeitung erfolgte mit SPSS- Statistics 17.0.

Die Studie wurde in der Amtszeit von Chefarzt Prof. Dr. med. Werner Mendling bis 31.10.2011 konzipiert und vorbereitet.

## **4.1 Patientinnen**

Es wurden 80 Patientinnen primär über die Studie aufgeklärt und aufgenommen. Die Aufnahmeuntersuchung der Frauen wurde routinemäßig von verschiedenen Klinikärztinnen durchgeführt.

Die Aufnahme in die Studie, die Aufklärung, die Operationen und die damit verbundenen Gewebeentnahme wurden vom gleichen Untersucher (Zaher Halwani) in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtsmedizin des Vivantes-Klinikums Am Urban (Chefarzt Prof. Dr. med. Werner Mendling, bis 31.10.2011) bis zum Jahresende 2011 durchgeführt.

### **4.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien**

Da es sich um eine Pilotstudie handelt, wurden nur solche Patientinnen ausgeschlossen, die kein Einverständnis zur Teilnahme an der Studie erklärt hatten.

## **4.2 Bestimmung des pH- Wertes**

Der pH-Wert wurde bei der Aufnahmeuntersuchung mit Lackmuspapier der Firma Merck aus dem mittleren Scheidendrittel entnommen und gemessen, sofern die Patientin prämenopausal war.

## **4.3 Nugent- Score**

Bei der Aufnahmeuntersuchung wurde vaginaler Fluor von den prämenopausalen Frauen mit einem Wattestäbchen aus dem unteren Drittel der Vagina entnommen und auf einen Objektträger aufgebracht, ca. fünf Minuten luftgetrocknet und später vom Autor modifiziert nach Gram (Merck Diagnostika) in vier Schritten in folgender Weise gefärbt:

1. Gentianaviolett wird auf das Präparat gegeben und nach ca. einer Minute Einwirkzeit mit Wasser abgespült.
2. Lugol'sche Lösung wird aufgegeben und nach ca. einer Minute Einwirkzeit abgespült.
3. Entfärbung des Präparates mit 96%igem Alkohol, bis deutlich keine

Entfärbung mehr stattfindet.

4. Gegenfärbung des Präparates durch kurze Beschichtung mit Fuchsin, anschließend wird noch einmal mit Wasser abgespült getrocknet.

Danach wurden die Mikroorganismen mit Ölimmersion bei 1000facher Vergrößerung nach dem Nugent-Score eingruppiert (Tab 2).

Der Nugent- Score wurde ausschließlich vom Autor beurteilt.

#### **4.4 Urinentnahme und Fixierung**

Der Erststrahlurin der Patientin wurde bei der morgentlichen Aufnahme in der Klinik in einem Gefäß gewonnen. Davon wurden 2 ml sofort in ein Eppendorf-Röhrchen abgefüllt, das 2 ml Carnoy- Lösung enthielt (6 Teile Ethanol 95-100 %; 6 Teile konzentrierte Essigsäure; 1 Teil Chloroform) (66) und zeitnah ins Labor für bakterielle Biofilme der Charité Campus Mitte, Klinik für Innere Medizin, Gastroenterologie (Dr. med. Alexander Swidsinski) zur weiteren Untersuchung gebracht.

Dieser Urin wurde bei 6000 G (G= Beschleunigung in der Zentrifuge = 6000fache Erdbeschleunigung) für 6 Minuten zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge) und der Überstand abgegossen. Das Sediment wurde mit 1000 µl= 1 ml Carnoy-Lösung bedeckt und bis zur Untersuchung im Labor dunkel und bei Raumtemperatur gelagert (64).

#### **4.5 Gewebeproben**

Im Falle von medizinisch indizierter fraktionierter Abrasio wurde nach der Operation ein kleines Gewebestück des Endometrium mit der sterilen Pinzette separiert und in Carnoy- Lösung gebracht. Bei Abortabrasio wurde entsprechend vorgegangen.

Im Falle einer medizinisch indizierten Tubektomie oder Adnektomie wurde auf dem Op- Tisch ein 1- 2 mm großer Anteil Tubenschleimhaut (Tubenmitte, Fimbrien) entfernt und in Carnoy- Lösung gebracht.

Die Präparate wurden mit dem Urin der Patientin ebenfalls ins Labor für bakterielle Biofilme (Dr. Alexander Swidsinski) transportiert. Dort erfolgte die Vorbereitung nach Verkleinern der großen Probestücke.

Das Gewebe kann bis zu drei Monate lang in Carnoy-Lösung gelagert werden. Alle Präparate wurden entnommen, bevor die Patientinnen, falls indiziert, eine antibiotische Therapie erhalten hatten.

#### **4.6 Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung (FisH)**

Die Urin- und Gewebeproben der Patientinnen wurden im Labor für Molekulare Genetik, Polymikrobielle Infektionen und bakterielle Biofilme der Humboldt Universität Berlin, Charité, Campus Mitte von Dr. med. Alexander Swidsinski untersucht.

Mit der FisH können spezifische Nukleinsäuren bekannter Sequenzen, von in diesem Fall Mikroorganismen in Gewebeproben, sichtbar gemacht werden. Hierfür binden generierte Sonden mit einer der gesuchten Nukleinsäuresequenz gegenläufiger Sequenz an ihre Zielsequenz. Die Fluoreszenz der gebundenen Sonden nach Entfernen der nicht-gebundenen Sonden kann anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop quantifiziert werden. So lassen sich je nach Sonde Gattungen und Arten verschiedener Bakterien identifizieren und in ihrer räumlichen Zuordnung an Zellen (im vorliegenden Fall des Urins) oder an Gewebeproben sichtbar machen (62 und Swidsinski, persönliche Mitteilung 2012).

Zur Quantifizierung des Biofilms wurde die Konzentration der Epithelzellen je Milliliter Urin evaluiert. Die Anzahl adhärenter Bakterien je Epithelzelle wurde gezählt und anschließend auf die Gesamtmilliliter des Urins hochgerechnet (64, 67).

#### **4.7 Datenerhebung**

Es wurde zu jeder der Patientinnen ein für diese Studie entworfener Untersuchungsbogen mit allen klinischen Daten und den Studienergebnissen erstellt und digital gespeichert.

## 4.7.1 Erhebungsbogen

ID	Alter	Derzeitige Erkrankung	Operation	pH Scheide	Biofilm Urin	Biofilm Biopsat	Nugent Score	Prä-/Postmenopausal	Besonderheiten	
----	-------	-----------------------	-----------	------------	--------------	-----------------	--------------	---------------------	----------------	--

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Patientinnen

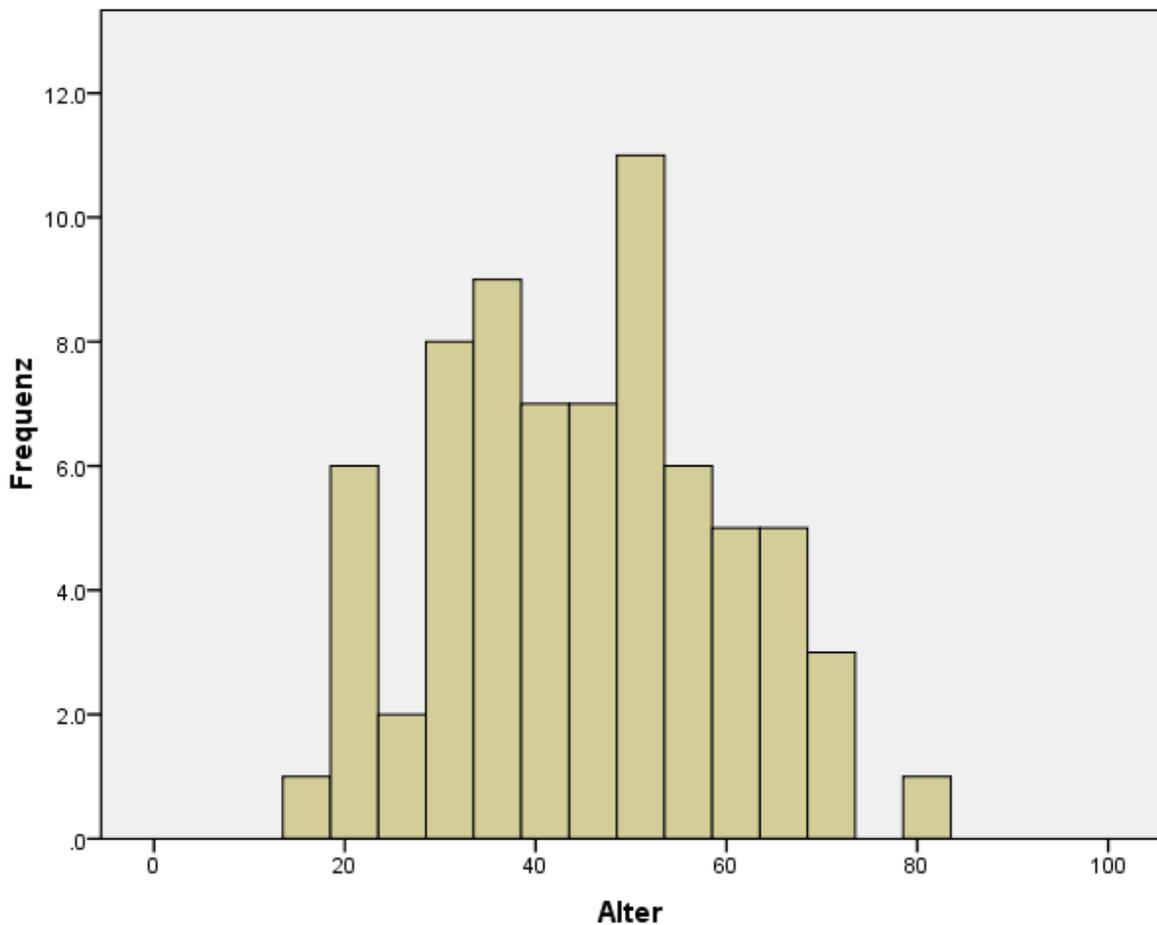
Es wurden 80 Patientinnen kaukasischer Abstammung primär in die Studie aufgenommen. Vollständige Daten liegen allerdings nur von 68 Patientinnen vor, da Urin auf dem Transport verlorengegangen ist.

Keine der Patientinnen hatte innerhalb der letzten zwei Wochen vor Studienbeginn Antibiotika eingenommen.

Das Alter der Frauen lag zwischen 20 und 80 Jahren mit einem mittleren Alter von 45 Jahren (Abbildung 1).

36 Patientinnen waren prämenopausal und 32 Patientinnen waren postmenopausal.

Abbildung 1: Altersverteilung



## 5.2 Operationsindikation

Es wurden bei den 68 auswertbaren Patientinnen fraktionierte Abrasione, Abortabrasione, Hysterektomie oder Adnexoperationen vorgenommen.

Bei keiner Patientin erfolgte eine Doppeloperation (Tab.5.1).

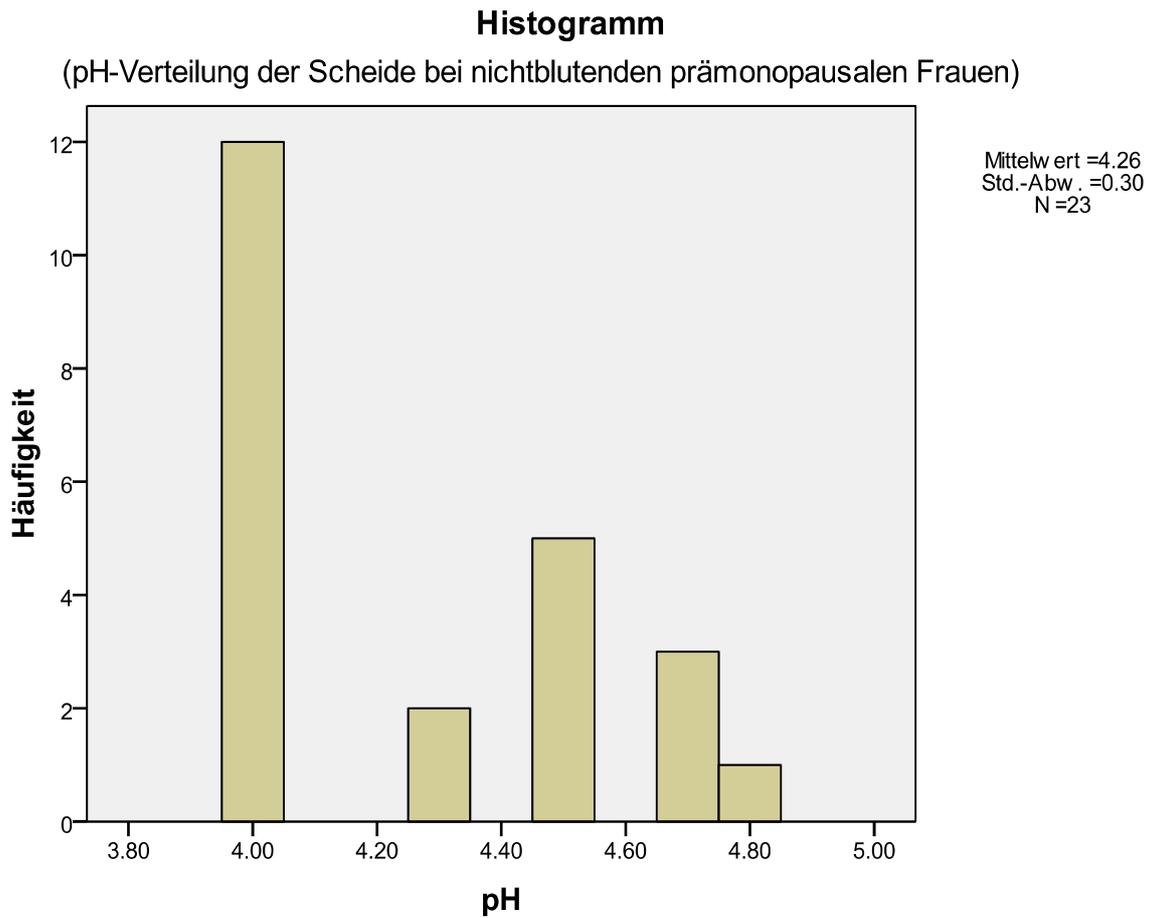
**Tab. 5.1: Art und Anzahl der Operationen**

<b>Eingriffe</b>	<b>Häufigkeit</b>
Fraktionierte Abrasio	27
Abortabrasio	19
Adnektomie, Tubektomie	16
Hysterektomie mit Adnektomie	6
<b>Gesamt</b>	<b>68</b>

### 5.3 pH- Werte

Es wurden vaginale pH- Werte zwischen 4.0 und 4.8 gemessen. Da bei blutenden oder postmenopausalen Frauen kein pH- Wert bestimmt worden war, liegen pH- Werte nur von 23 Patientinnen vor (Abbildung 2).

Abbildung 2: pH- Werte aus der Vagina der Frauen



## **5.4 Nugent- Scores**

36 der 68 Frauen waren prämenopausal, 9 dieser 36 Frauen hatten einen Nugent- Score von 0-3 (normal), 17 Frauen einen Nugent- Score von 4-6 (intermediär) und 9 Frauen einen Nugent- Score von 7-10 (bakterielle Vaginose).

## **5.5 Bakterieller Biofilm im Urin**

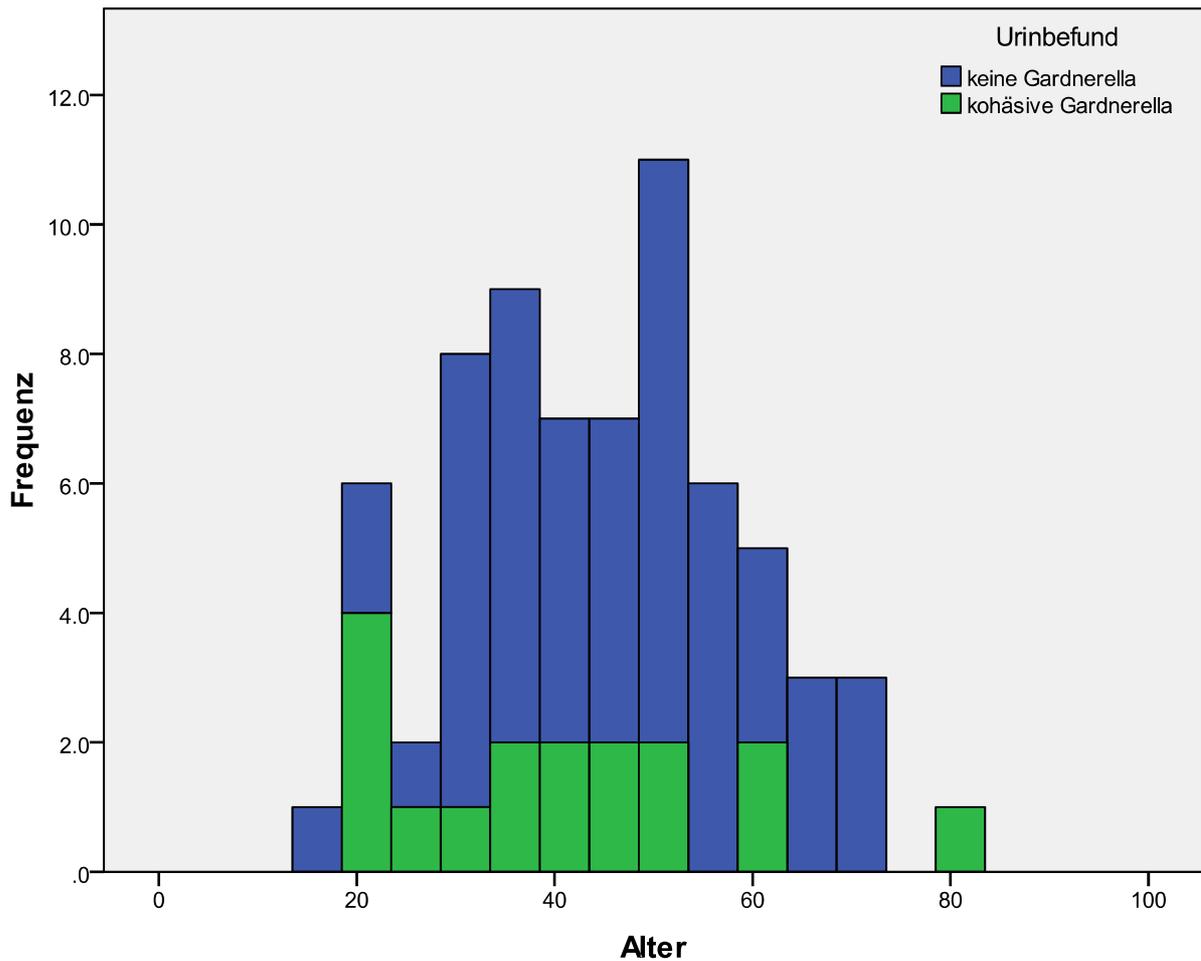
Es konnte der Urin aller 68 Frauen mit FisH untersucht werden. Bei 50- Patientinnen wurden keine bakteriellen Biofilme und bei 18 Patientinnen die für eine BV typische Gardnerella- Biofilme an Epithelzellen identifiziert.

### **5.5.1 Gardnerella- Biofilm im Urin und Alter der Patientinnen**

Die 18 Patientinnen mit einem im Urin diagnostizierten Gardnerella- Biofilm hatten ein mittleres Alter von 40 Jahren.

Bei Frauen ohne Nachweis eines Gardnerella- Biofilms im Urin lag das mittlere Alter bei 46 Jahren (Abb.3).

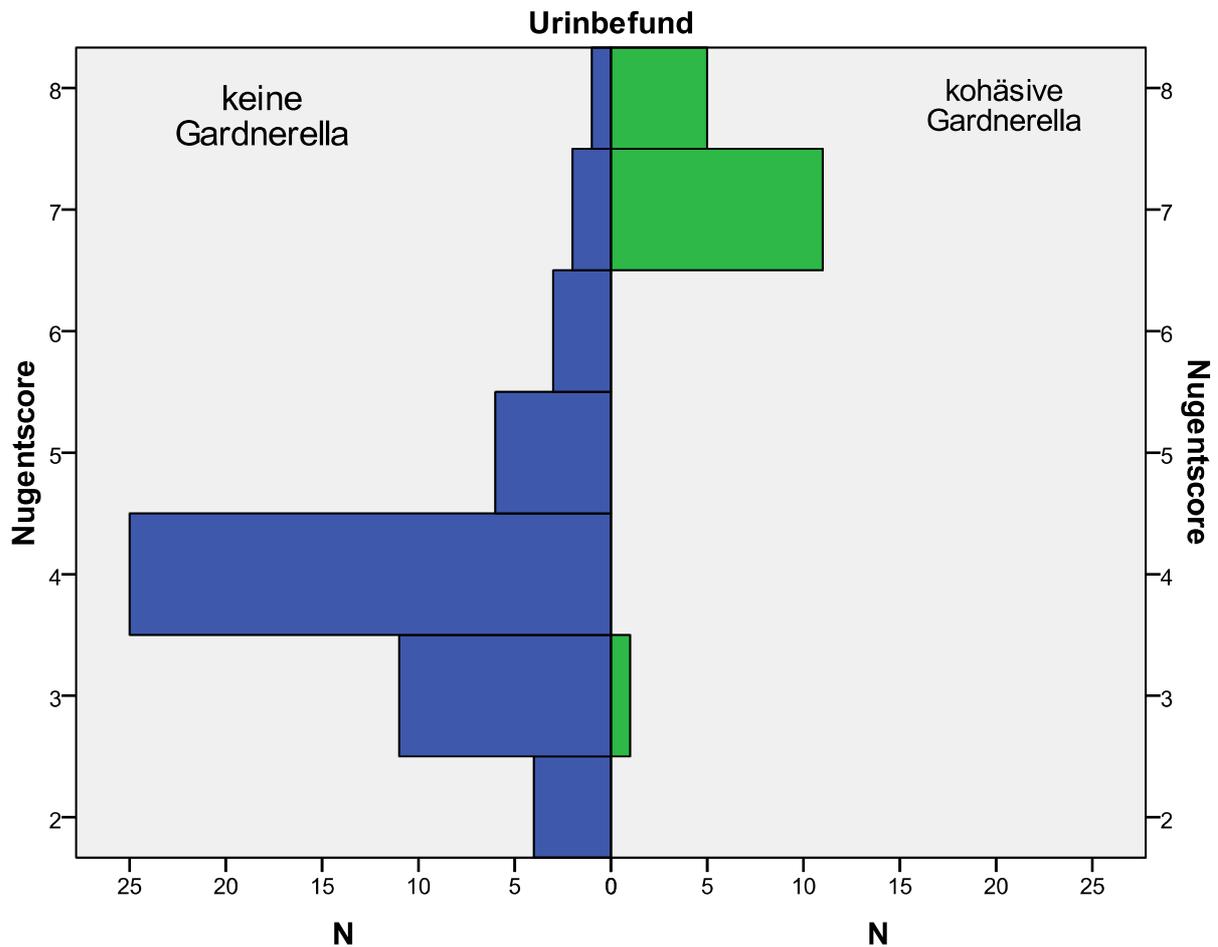
Abbildung.3: Korrelation von Alter der Patientinnen und Gardnerella- Biofilm im Urin



### 5.5.2 Gardnerella- Biofilm im Urin und Nugent- Score

Bei 17 der 18 Patientinnen mit Gardnerella- Biofilm im Urin lag der Nugent-Score zwischen 7 und 10 (Abb.4).

Abbildung.4: Nugent - Score und kohäsive Gardnerellen an Epithelzellen im Urin (BV - typischer Biofilm)



## 5.6 Gardnerella- Biofilm im Gewebe des oberen Genitaltraktes

Bei 8 der 68 Gewebeproben (11,8%) aus dem oberen Genitaltrakt wurde ein für BV typischer Biofilm (kohäsive Gardnerella) gefunden. Außerdem wurden in 13 Fällen andere nicht kohäsive Bakteriangattungen identifiziert.

### 5.6.1 Gardnerella- Biofilm im Endometrium

Bei 2 von 27 nicht schwangeren Patientinnen mit fraktionierter Abrasio wurde ein Gardnerella - Biofilm gefunden (Tab 5.6.1) (Bild 2).

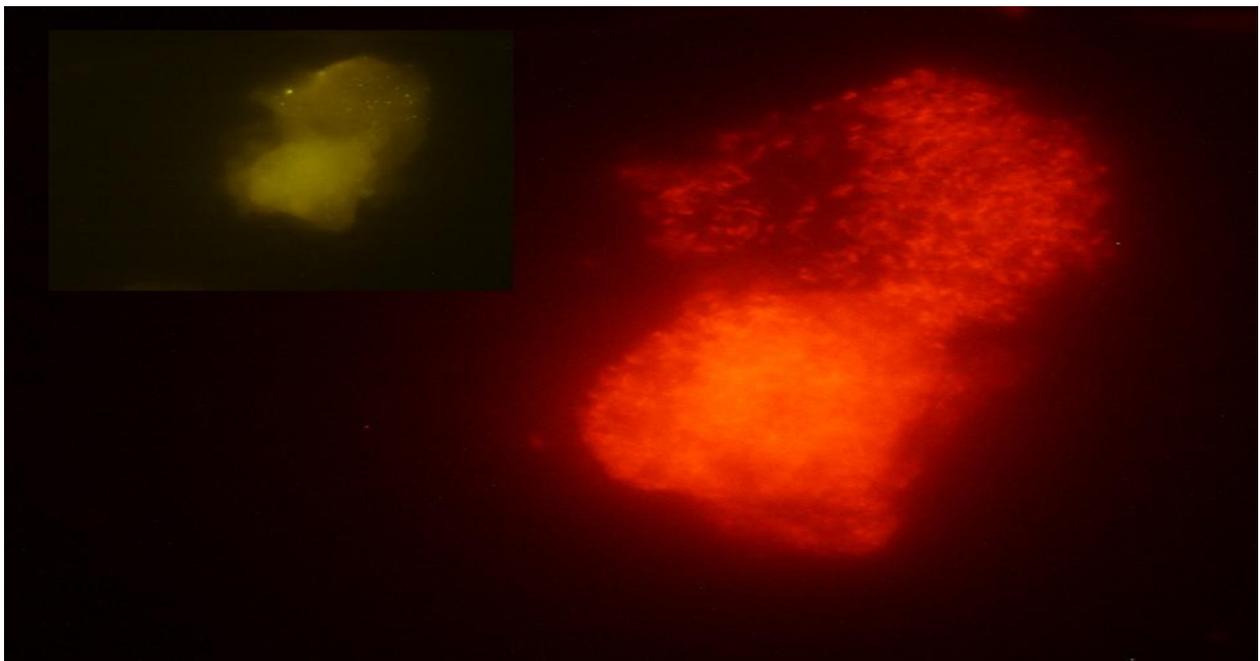
In 8 weiteren Abradaten wurden andere Bakterien (planktonisch) gefunden.

**Tab.5.6.1: Gardnerella-Biofilm im Abradat/ Endometrium (nicht schwangere)**

Endometrium	Kohäsive Gardnerella	Keine Gardnerella	Einzelne andere Bakterien
27	2	17	8

**Bild. 2**

Material der diagnostischen Abrasio uteri. Bakterien sind mit Eub C3 Sonde hybridisiert (gelbe Fluoreszenz). Gardnerella ist mit C5 Sonde hybridisiert und erscheint rot. Durch Überlagerung der Gardnerella- Signale mit Signalen für alle Bakterien wird der Anteil der Gardnerella an dem Biofilm ersichtlich. Der Ausschnitt zeigt noch mal das gleiche Bild ausschließlich mit Gardnerella- Signalen. Vergrößerung für beide Bilder x 1000 (Charakterisierung der Sonden in (64)).



**5.6.2. Gardnerella - Biofilm im Abortabradat**

Bei 5 von 19 Abortabradaten der ersten Trimenons wurde ein Gardnerella - Biofilm im Endometriumgewebe identifiziert (Tab.5.6.2).

**Tab.5.6.2: Gardnerella -Biofilm im Abortabradat**

Abortabradat	Kohäsive Gardnerella	Keine Gardnerella	Einzelne andere Bakterien
19	5	9	5

### 5.6.3 Gardnerella - Biofilm im Eileiter

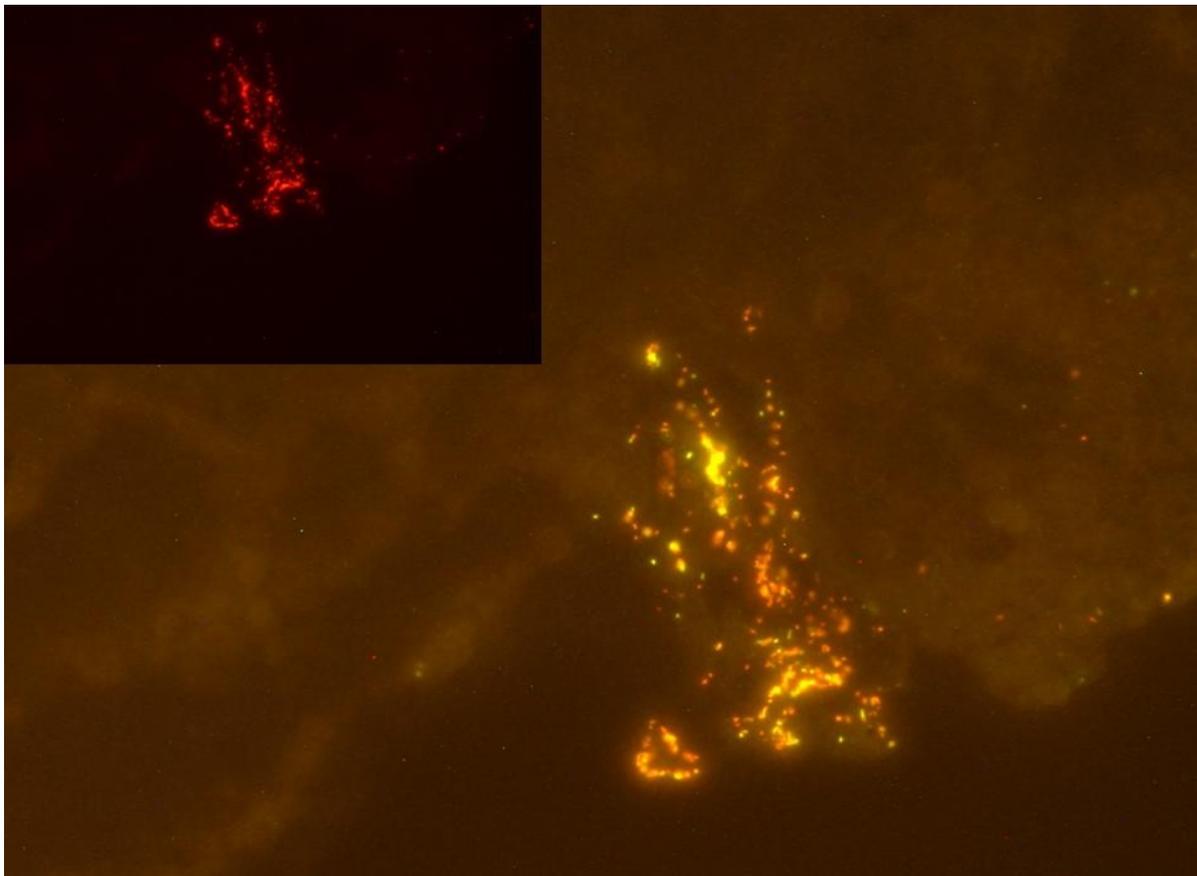
Bei 22 Patientinnen mit Tuben- oder Adnexeingriffen lagen vollständige Ergebnisse vor.

Bei einer prämenopausalen Frau konnte ein Gardnerella- Biofilm bei Extrauterin gravidität im Tubenbiopsat gefunden werden (Bild 3). Bei dieser Patientin wurde auch ein Gardnerella- Biofilm im Urin identifiziert.

Bei weiteren vier Patientinnen konnten andere nicht kohäsive Bakterienarten (Streptokokken, E. coli) mittels FisH in der Tube identifiziert werden.

#### Bild.3

Gewebe aus der Tube. Bakterien sind mit Eub C3 Sonde hybridisiert, die alle Bakterien repräsentiert (gelbe Fluoreszenz). Der Ausschnitt zeigt das gleiche Bild hybridisiert mit Gardnerella C5 – rote Fluoreszenz. Vergrößerung für beide Bilder x 1000 (charakterisierung der Sonden in (64)).



## **5.7 Gardnerella - Biofilm im Urin und im oberen Genitaltrakt von Schwangeren**

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Infektion und Fehlgeburt oder Tubargravidität zu finden, wurde das Gewebe der Schwangeren statistisch gesondert betrachtet. Es wurde das Abortabradat von 19 Patientinnen sowie das laparoskopisch entnommene Schwangerschaftsgewebe der Patientin mit Tubargravidität erfasst.

Bei acht der 19 (42%) Frauen mit Abort und bei der Frau mit Tubargravidität wurde ein Gardnerella- Biofilm im Urin gefunden.

Bei 5 der 19 Fälle mit Abort war im Abradat ein Gardnerella - Biofilm gefunden worden (26%).

Bei zwei weiteren Patientinnen konnten mit FisH andere Infektionen/Kolonisationen (Streptokokken, E. coli) im Abradat nachgewiesen werden.

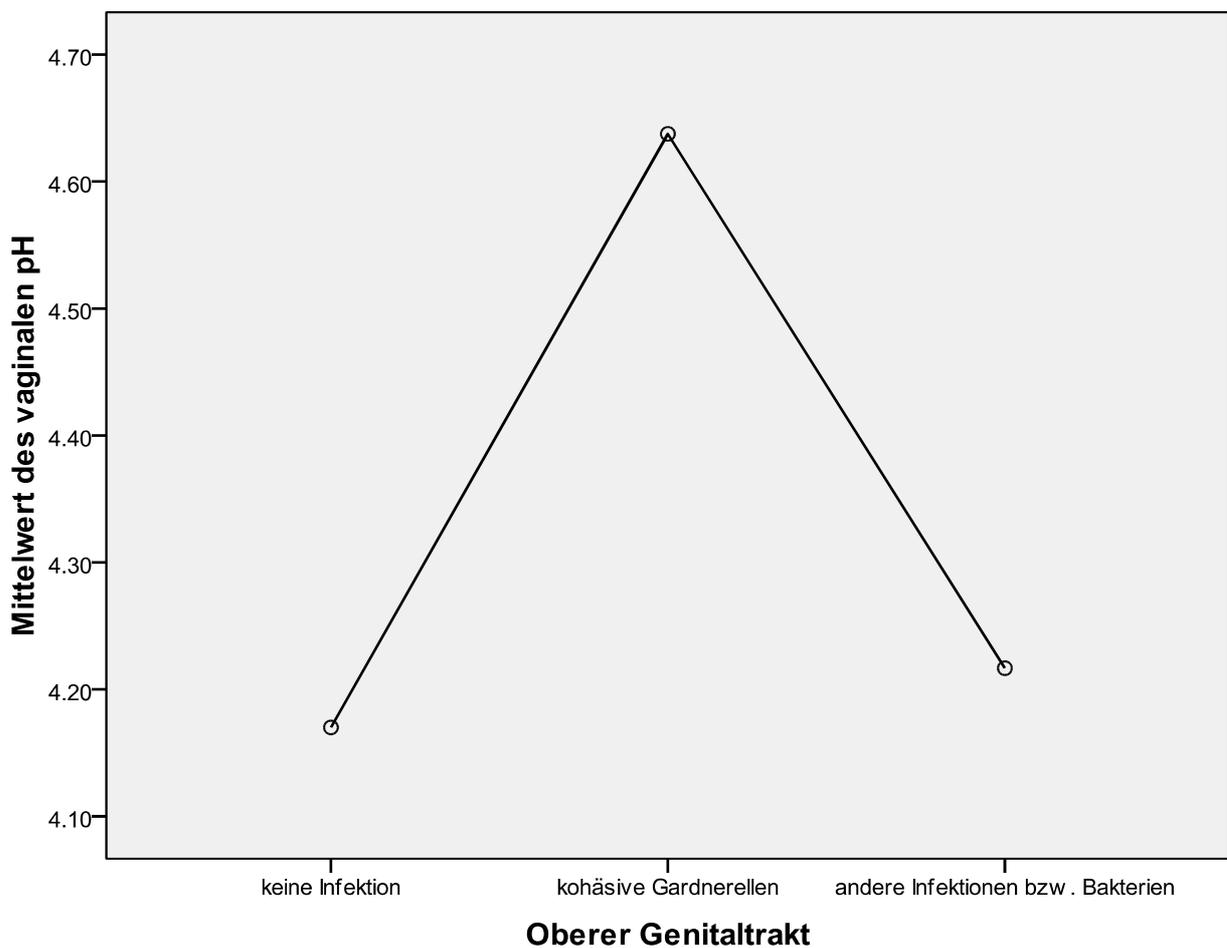
Der Zusammenhang zwischen den positiven Urinbefunde und den positiven Gewebefunden ist nicht signifikant.

## **5.8 pH- Wert und Nachweis eines Gardnerella - Biofilms im oberen Genitaltrakt**

Der mittlere pH- Wert bei acht Patientinnen mit kohäsiven Gardnerellen im oberen Genitaltrakt lag bei 4,6. Bei 8 Patientinnen, bei denen andere, nicht kohäsive Bakterien (Streptokokken, E. coli) nachgewiesen wurden, lag der mittlere pH-Wert bei 4,2 und somit nahe am pH-Wert der 27 Patientinnen ohne nachgewiesene Bakterien im oberen Genitaltrakt.

Es besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhtem pH-Wert der Scheide und Vorhandensein eines bakteriellen Biofilms im oberen Genitaltrakt (Chi-Quadrat- Test <0.01) (Abb.5).

**Abbildung 5: Korrelation des mittleren vaginalen pH - Wertes zum Nachweis eines Gardnerella - Biofilms im Gewebe des oberen Genitaltraktes.**

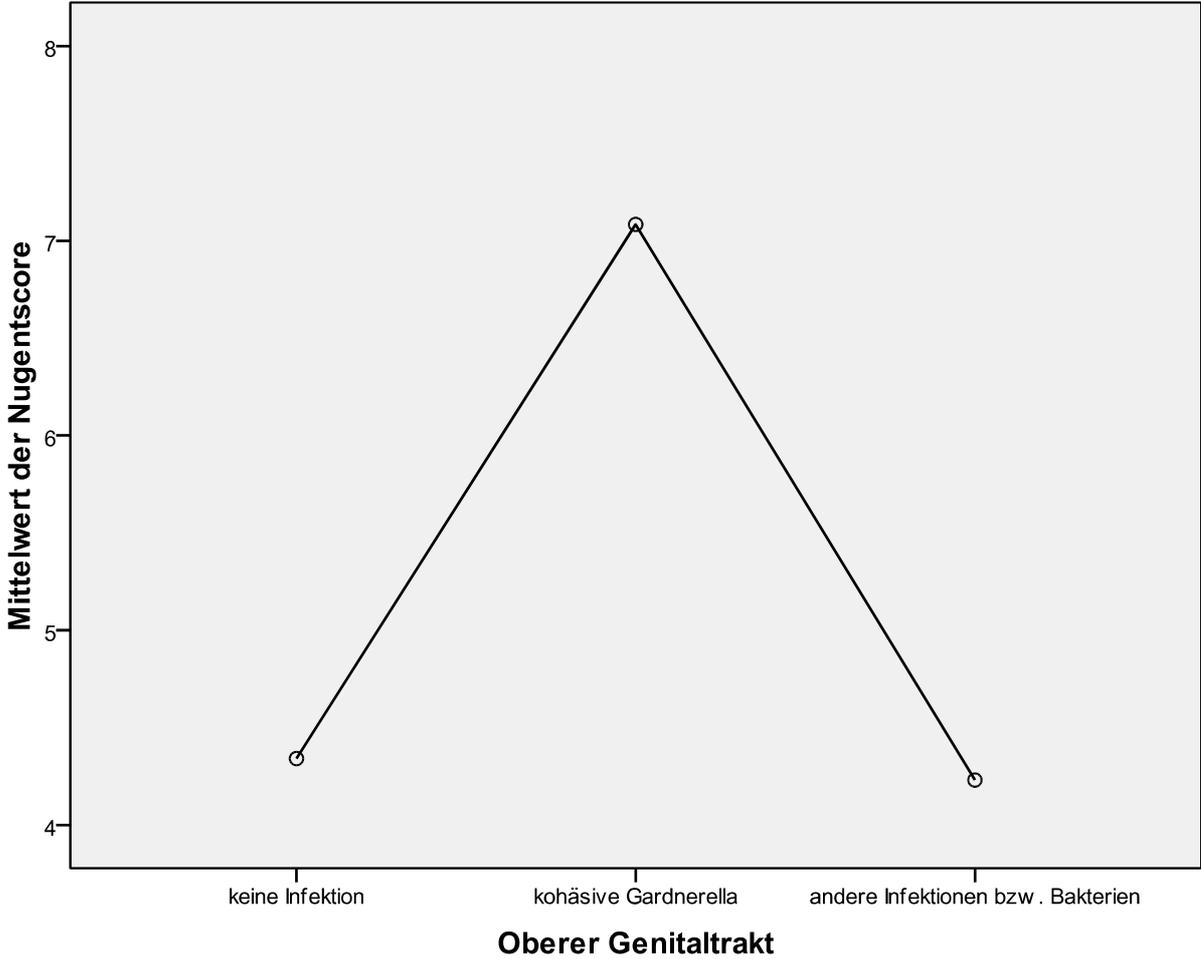


### **5.9 Nugent - Score und Gardnerella - Biofilm im oberen Genitaltrakt**

Der mittlere Nugent - Score bei den acht Patientinnen mit kohäsiven Gardnerellen im oberen Genitalbereich lag bei 7,08 während er bei Patientinnen mit Nachweis anderer Bakterien bei 4,23 lag. Der Mittelwert des Nugent-Scores bei Patientinnen ohne jeden Keimnachweis im oberen Genitalbereich lag bei 4,34.

Die Unterschiede sind statistisch signifikant (Abb.6).

**Abbildung 6: Korrelation des vaginalen Nugent -Scores zum Nachweis eines Gardnerella - Biofilms an Gewebe des oberen Genitaltraktes**



## 6. Diskussion

Die gesunde normale Vaginalflora ist nach neueren Erkenntnissen genetisch bestimmt und wird bei Frauen verschiedener ethnischer Herkunft von signifikant unterschiedlichen Laktobazillusarten dominiert.

So haben asiatische, afrikanische, hispanische oder kaukasische Frauen signifikant unterschiedliche der vier typischen Laktobazillusstämme (*Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus jensenii*) dominierend in einer Mischflora ihrer Vagina.

Außerdem hat ein erheblicher Anteil der Frauen keine dieser typischen Laktobazillus-Arten in der Vagina. Bei kaukasische Frauen sind in etwa 10% der Fälle in der Normalflora keine typischen Laktobazillen nachweisbar, bei hispanischer oder afrikanischer Herkunft, trifft das sogar in etwa einem Drittel der Fälle zu (29).

Neben Laktobazillen kommen in der Vaginalflora 40 oder 50 verschiedene, meist anaerobe Bakterienarten vor, die den meisten Gynäkologen kaum namentlich bekannt sein dürften (10, 29).

Dementsprechend ist die bakterielle Vaginose ebenfalls ethnisch beeinflusst und kommt in Deutschland und Mitteleuropa bei etwa 20% der gesunden jungen Frauen vor (31, 41), während sie bei afrikanischen und schwarzen amerikanischen Frauen wesentlich häufiger zu sein scheint. Gardner und Dukes (24) hatten sog. clue cells als Schlüssel zur Diagnose der von ihnen damals noch beschriebenen als „*Haemophilus vaginalis* Vaginitis“ bezeichnet. Spätestens seit 1984 wird der von ihnen erstmals beschriebene Erreger *Gardnerella vaginalis* und die Erkrankung bakterielle Vaginose genannt (71).

Diese Schlüsselzellen sind abgeschilferte Vaginalepithelien eines bakteriellen Biofilm, der der gesamten Vaginalwand (nur) bei bakterieller Vaginose anhaftet (62). Van der Meijden hat wahrscheinlich als erster den bakteriellen Biofilm bei BV (elektronenmikroskopisch) beschrieben, ohne den Begriff „Biofilm“ zu kennen (69).

Dieser Biofilm bei BV wurde an Gewebeproben durch FisH identifiziert und in den ersten Untersuchungen aus der betroffenen Vaginalwand gewonnen (62).

Später zeigte sich, dass der gleiche diagnostische Nutzen aus Epithelzellen im Urin von Frauen mit bakterielle Vaginose gewonnen werden kann und dass auch bei männlichen Sexualpartnern diese typischen, von Bakterien dicht beladenen Zellen im Urin gefunden werden (67).

Es ist unbekannt, warum der bakterielle Biofilm bei bakterieller Vaginose entsteht. Offensichtlich

bedarf es einer kritischen Mindestmasse von bestimmten Gardnerella- vaginalis- Stämmen, Atopobium vaginae und anderen Bakterien.

Außerdem kommt es zu einer Verschiebung der Laktobazillusflora, bei der die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- bildenden Laktobazillen vermindert sind und *L. crispatus* oder *L. gasseri* von *L. iners* verdrängt wird (10). Swidsinski et al. (64) haben ferner Laktobazillen in hoher Keimzahl innerhalb des bakteriellen Biofilms der bakteriellen Vaginose nachgewiesen können und vermuten, dass es sich hier ebenfalls um *L. iners* handelt (Mendling, persönliche Mitteilung 2012).

Desweiteren wurde der Biofilm im Kryosperma einer Samenbank gefunden, obwohl dieses Sperma in typischer Weise gewaschen und konserviert worden war (70).

Biofilme durch Bakterien oder Pilze spielen offensichtlich eine entscheidende Rolle in der Infektiologie (4, 8, 43, 62).

Seit etwa 1995 sind im internationalen Schrifttum Studien publiziert worden, aus denen hervorgeht, dass die bakterielle Vaginose ein signifikantes Risiko für Frühgeburlichkeit darstellt (14, 15, 16, 41, 42).

Später wurden weitere Fragen aufgeworfen, als sich herausstellte, dass die Therapie der bakteriellen Vaginose in Studien nicht unbedingt eine Verringerung der Frühgeburlichkeit herbeiführt (36), und dass nur in besonderen Risikofällen, z.B. bei Zustand nach Frühgeburt, Therapie von Nutzen ist (41).

Inzwischen wird die vereinfachte Sichtweise „Normalflora- bakterielle Vaginose“ differenzierter betrachtet. Besonders aus der belgischen Arbeitsgruppe (Gilbert Donders und Hans Verstraelen) wurde eine differenziertere mikroskopische Beurteilung des Nativpräparates vorgeschlagen, die unterscheidet, ob viele oder gar keine Laktobazillen, nur teilweise eine bakterielle Vaginose oder eine starke bakterielle Vaginose, ob eine aerobe kokkoide Flora im Sinne einer aeroben Vaginitis oder ob viele Leukozyten im Nativpräparat vorhanden sind.

Dabei stellten sich unterschiedlich stark signifikante Korrelationen zu einer möglichen Frühgeburt heraus (14).

Außerdem ist inzwischen bekannt, dass die Frühgeburlichkeit auch genetische Dispositionen aufweist. So wurde festgestellt, dass ein Genpolymorphismus im Tumornekrosefaktor(TNF) alpha- Gen alleine schon bei normaler Vaginalflora ein gewisses Frühgeburtsrisiko bedeutet, dass dieses Vorkommen aber im Zusammenhang mit einer bakteriellen Vaginose das etwa doppelte Frühgeburtsrisiko auf das Mehrfache erhöht (40).

Auf jeden Fall hat sich gezeigt, dass die frühe Erkennung einer bakterielle Vaginose bzw. einer Dysbiose der Scheidenflora im ersten Trimenon und deren Behandlung mit Herstellen einer

Normalflora während der gesamten Schwangerschaft die Frühgeburtlichkeit signifikant verringert (33, 35, 37, 42).

In Deutschland wurde aufgrund einer methodisch kritischen Studie in Frage gestellt, ob eine Erkennung und Behandlung der bakteriellen Vaginose in der Schwangerschaft tatsächlich sinnvoll sei, das Frühgeburtsrisiko und die Kosten für Frühgeburten verringere und die Kosten der diagnostischen und präventiven Maßnahmen während der Schwangerschaft aufwiege. Dagegen hat Saling in einer engagierten Stellungnahme heftig protestiert und nochmals die belegten Argumente für das infektiologische Frühgeburtenvermeidungsprogramm dargestellt (59).

Alle diese Untersuchungen und Argumente erfolgten bisher ohne Berücksichtigung eines bakteriellen Biofilms.

Denn trotz aller Therapien kann, wie aus den Arbeiten von Swindsinky et al. (64, 66) hervorgeht, der bakterielle Vaginose - assoziierte Biofilm in der Scheide bisher nicht beseitigt werden.

Darüber hinaus haben Romero et al. 2008 (58) im Fruchtwasser, das unter sonografischer Kontrolle durch Amniozentese bei einer Patientin mit Chorio- Amnioninfekt in der 28. SSW und folgender Frühgeburt gewonnen worden war, mit FisH einen bakteriellen Biofilm, aber nicht BV-typisch, als Einzelfall darstellen können.

Bei nicht- schwangeren jungen Frauen ist das Risiko für eine Salpingitis signifikant erhöht, wenn eine BV vorliegt (41).

Es ist bekannt, dass bei Salpingitis eine aerob- anaerobe Mischflora aus bis zu 10 verschiedenen Bakterienarten in der Tube nachgewiesen werden kann (51).

Trotz schneller und umfassender Antibiotikatherapie kommt es aber dennoch in etwa 10% der Fälle zum Tubenverschluss (49, 70). Darüberhinaus ist bekannt, dass Bakterien als Ursache einer Salpingitis in der Tube nachweisbar sein können, ohne dass man sie in der Zervix gleichzeitig vorfindet (34, 49).

Alle diese Überlegungen lassen die Frage aufkommen, ob es möglich sein könnte, dass für bakterielle Vaginose typische Biofilme nicht nur in der Vagina, sondern vielleicht auch im Endometrium oder in den Eileitern von Frauen mit bakterieller Vaginose nachweisbar sein könnten.

Deshalb wurden bei dieser Pilotstudie Gewebeproben aus Abradaten schwangerer und nicht schwangerer Frauen sowie Tubenepithelien untersucht.

Alle diese Eingriffe waren aus anderen medizinischen Gründen indiziert. Diese wissenschaftlichen Untersuchung wurde zusätzlich durchgeführt.

Es wurde bisher angenommen, dass der nicht puerperale Uterus im Cavum uteri weitgehend keimfrei sei, da ja die Zervix uteri eine mechanische und immunologische Barriere gegen aufsteigende Erreger darstellen soll.

Dennoch ist die Aszension gerade bei jungen Frauen ein geläufiges Ereignis. So wird angenommen, dass z. B. jede zehnte Frau, die eine Chlamydien- Zervizitis hat, auch durch eine Chlamydienbedingte Salpingitis bekommt (34). In entzündeten Eileitern wurden schon vor fast 30 Jahren bis zu zehn verschiedene Bakterienarten nachgewiesen (45).

In dieser Untersuchung wurde erstmals ein polymikrobieller Biofilm, der aufgrund der bakteriellen Zusammensetzung typisch für bakterielle Vaginose ist, bei Frauen mit bakterieller Vaginose auch im Endometrium und in der Tube gefunden.

Diese Frauen waren klinisch unauffällig und hatten auch keine Anamnese für eine aufsteigende bakterielle Genitalinfektion gehabt.

Es ist früher bereits mehrfach festgestellt worden, dass das Cavum uteri bzw. das Endometrium von nicht schwangeren, klinisch gesunden Frauen bakteriell besiedelt sein kann (2), ja dass sogar ein Mykoplasmen oder bakterieller Biofilm an den Eihäute bzw. „Sludge“ im Fruchtwasser bei Amnioninfekt vorkommen kann (57, 58).

Vorkommen und Bedeutung eines bakteriellen Biofilmes im schwangeren Uterus sind bisher unerforscht.

Es werden weitere Studien bedürfen, die Bedeutung der BV und eines im Uterus vorkommenden Biofilms für Aborte oder auch Frühgeburten herauszufinden.

Auch dürfte es interessant sein zu untersuchen, ob der Biofilm im Endometrium von nicht schwangeren Frauen für Rezidive der BV verantwortlich ist und wie er verhindert oder beseitigt werden kann.

Die Identifizierung eines für BV typischen Biofilms in der Tube könnte Konsequenzen für Subfertilität sowie Extrauterin graviditäten haben, ohne dass es klinisch bemerkt zur Salpingitis gekommen wäre.

Bisher wird nämlich besonders die unbemerkte Infektion mit *Chlamydia trachomatis* dafür verantwortlich gemacht (34, 70).

Wenn jede zehnte junge Frau eine Zervixinfektion durch *Chlamydia trachomatis* hat und von diesen wiederum jede zehnte eine Salpingitis durch diesen Erreger aufwies (28), so bekäme etwa eine von 100 jungen Frauen eine Salpingitis.

Etwa jedes achte Paar in Deutschland ist ungewollt kinderlos (ca. 12- 13%), davon ca. 10-20 % durch Tubenverschluss, daher grob geschätzt 2% von der Gesamtbevölkerung. Wenn etwa 1% durch eine Chlamydieninfektion einen Tubenverschluss bekäme, bleiben also nochmals etwa 1% für andere Ursachen übrig. Ob der bakterielle Biofilm hier beteiligt sein könnte, wird Gegenstand späterer Forschung sein müssen.

## **7. Zusammenfassung:**

In dieser Pilotstudie wurde erstmals durch 16S – rDNA- basierte Identifikation mit zusätzlicher Fluoreszenz in- situ Hybridisierung zur Visualisierung ein strukturierter polymikrobieller Gardnerella – vaginalis - Biofilm im Uterus und im Tubenepithel bei Frauen mit bakterieller Vaginose nachgewiesen.

Es wurde bei 68 Frauen , die zu medizinisch indizierten fraktionierten Abrasionen, Hysterektomie, Abortabrasiones, missed abortions oder einer Salpingektomie/Adnexektomie kamen, der vaginale pH- Wert, und der Nugent – Score bestimmt. An den Epithelzellen ihres Urins wurden für bakterielle Vaginose typische Biofilme gesucht.

Das operativ entnommene Gewebe (Endometrium, Abort- Abradat oder Tuben- Schleimhaut) wurde ebenfalls auf solche Biofilme untersucht.

Im Urin von 18 der 68 Frauen (26,5%) wurde ein für BV typischer Gardnerella- Biofilm an Epithelzellen identifiziert.

In acht der 68 Gewebeproben (11,8%) aus dem oberen Genitaltrakt wurde ein für BV typischer Biofilm gefunden (zwei von 27 am Endometrium, fünf von 19 im Abortabradat, eine von 22 am Tubenepithel bei extrauteriner Gravidität) Außerdem wurden 13 Fällen andere nicht kohäsive Bakteriangattungen identifiziert.

Der Nugent - Score sowie der pH- Wert der Scheide waren signifikant mit dem Nachweis des Biofilms im oberen Genitaltrakt korreliert.

Bisherige Nachweismethoden (Kulturen) und planktonisches Vorkommen von Bakterien auf den inneren Oberflächen mögen ohne klinische Bedeutung sein.

Der Nachweis eines strukturierten Biofilmes jedoch könnte von größerer Bedeutung für die infektiöse Morbidität der entsprechenden Patientinnen sein.

Darüber hinaus ist die infektiöse Genese von Aborten, Frühgeburten und Subfertilität/Sterilität hinreichend diskutiert.

Weitere Untersuchungen sind jetzt nötig, um die klinische Bedeutung und ggf. die medikamentöse Beseitigung des Biofilms zu erforschen.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D and Holmes KK(1983). Nonspecific Vaginitis. Diagnostic Criteria and Microbial and Epidemiologic Associations. *Am. J. Med.* 74, 14–22.
2. Ansbacher R, Boyson WA and Morris JA (1967). Sterility of the Uterine Cavity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 99, 394–396.
3. Antonelli PJ, Lee JC and Burne RA (2004). Bacterial Biofilms May Contribute to Persistent Cochlear Implant Infection. *Otol. Neurotol.* 25, 953–957.
4. Auler ME, Morreira D, Rodrigues FF, Abr Ao MS, Margarido PF, Matsumoto FE, Silva EG, Silva BC, Schneider RP and Paula CR (2010). Biofilm Formation on Intrauterine Devices in Patients with Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. *Med. Mycol.* 48, 211–216.
5. Bitzer EM, Schneider A, Wenzlaff P, Hoyme UB and Siegmund-Schulze E (2011). Vaginale pH- Selbstmessung zur Verhinderung von Frühgeburten. *Dtsch. Arztebl.* 108, 81-86.
6. Borges SF, Sandra F, Silva JG and Teixeira PC (2011). Survival and biofilm formation of *Listeria monocytogenes* in simulated vaginal fluid: influence of pH and strain origin. *Immunol. Med. Microbiol.* 62, 315-320.
7. Bothuyne-Queste E, Hannebicque-Montaigne K, Canis F, Noulard MN, Plennevaux JL, Tilloy E and Subtil D (2012). Is the Bacterial Vaginosis Risk Factor of Prematurity? Study of a Cohort of 1336 Patients in the Hospital of Arras. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reproduct.* 41, 262-270.
8. Costerton JW, Montanaro L and Arciola CR (2005). Biofilm in Implant Infections: Its Production and Regulation. *Int. J. Artif. Organs* 28, 1062–1068.
9. Culhane JF, Desanto D, Goldenberg RL, McCollum KF, King F and Guaschino S (2005). Variation in Nugent Score and Leukocyte Count in Fluid Collected From Different Vaginal Sites. *Obstet. Gynecol.* 105, 120-123.
10. De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Alqumber MA, Burton JP, Tagg JR, Temmerman M and Vanechoutte M (2007). Quantitative Determination by Real-time PCR of Four Vaginal Lactobacillus Species, *Gardnerella Vaginalis* and *Atopobium Vaginae* Indicates an Inverse Relationship Between *L. Gasseri* and *L. Iners*. *BMC Microbiol.* 7, 115.
11. Donders GG (1999). Microscopy of the Bacterial Flora on Fresh Vaginal Smears. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 7, 177-179.
12. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaeker A, Salambier G and Spitz B (2002). Definition of a type of abnormal vaginal flora that is different from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG* 109, 34-43.
13. Donders GG (2007). Definition and Classification of Abnormal Vaginal flora. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 21, 355-373.

14. Donders GG, van Calsteren C, Bellen G, Reybrouck R, van den Bosch T, Riphagen I and van Lierde, (2008). Predictive Value for Preterm Birth of Abnormal Vaginal Flora, Bacterial Vaginosis and Aerobic Vaginitis During the First Trimester of Pregnancy or Why Metronidazole is not a Good Option in Pregnancy., 6th Eur. Conf. Inf. Dis. Obstet. Gynecol.
15. Donders GG, van Calsteren C, Bellen G, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I and Van Lierde S (2010). Association Between Abnormal Vaginal Flora and Cervical Length as Risk Factors for Preterm Birth. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* doi:10.1002/uog.7568.
16. Donders GG (2010). Diagnosis and Management of Bacterial Vaginosis and Other Types of Abnormal Vaginal Bacterial Flora: a Review. *Obstet. Gynecol. Survey* 7, 462–473.
17. Donders GG, Bellen G and Rezeberga D (2011). Aerobic vaginitis in pregnancy. *BJOG* 118, 1163-1170.
18. Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM and Holmes KK(1989). Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 27, 251-256.
19. Eschenbach DA, Gravett MG, Chen KC, Hoyme UB and Holmes KK (1984). Bacterial vaginosis during pregnancy. An association with prematurity and postpartum complications. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* 86, 213-222.
20. Eschenbach DA, Wölner-Hanssen P, Hawes SE, Pavletic A, Paavonen J and Holmes KK (1997). Acute pelvic inflammatory disease: associations of clinical and laboratory findings with laparoscopic findings. *Obstet. Gynecol.* 89, 184-192.
21. Falsetta ML, Steichen CT, McEwan AG, Cho C, Ketterer M, Shao J, Hunt J, Jennings MP and Apicella MA (2011). The Composition and Metabolic Phenotype of *Neisseria gonorrhoeae* Biofilms. *Front. Microbiol.* 2, 75.
22. Fischbach F, Kolben M, Thurmayr R, Hafter R, Sedlaczek E, Zieglmeier M, Preisl G, Weindler J and Graeff H (1998). Genital infections and the course of pregnancy: a prospective study. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 48, 469-478.
23. Gardner HL (1980). *Haemophilus vaginalis* vaginitis after twenty-five years. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 137, 385-391.
24. Gardner HL and Dukes CD (1955). *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 69, 962-976.
25. Gardner HL (1968). Desquamative Inflammatory Vaginitis: a Newly Defined Entity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 102, 1102–1105.
26. Goldenberg RL, Hauth JC and Andrews WW (2000). Intrauterine infection and preterm birth. *N. Engl. J. Med.* 342, 1500–1507.

27. González Pedraza Avilés A, Ortíz Zaragoza MC and Irigoyen Coria A (1999). Bacterial vaginosis a "broad overview". *Rev. Latinoam. Microbiol.* 41, 25-34.
28. Herzog SA, Althaus CL, Heijne JC, Oakeshott P, Kerry S, Hay P and Low N (2012). Timing of Progression from Chlamydia Trachomatis Infection to Pelvic Inflammatory Disease: A Mathematical Modelling Study. *BMC Infect. Dis.* 12: 187. doi:10.1186/1471-2334-12-187.
29. Hickley RJ, Zhou X, Pierson JD, Ravel J and Forney LJ (2012). Understanding Vaginal Microbiome Complexity from an Ecological Perspective. *Transl. Res.* 160, 267–282.
30. Hillier SL, Kiviat NB, Hawes SE, Hasselquist MB, Hanssen PW, Eschenbach DA and Holmes KK (1996). Role of bacterial vaginosis-associated microorganisms in endometritis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175, 435-441.
31. Hoyme UB und Van der Meijden WI (1995). *Bakterielle Vaginose*. Gräefelfing: Socio-medico Verlag.
32. Hoyme UB, Möller U und Saling, E (2002). Ergebnisse und mögliche Konsequenzen der Thüringer Frühgeburtenvermeidungsaktion. *Geburtsh. Frauenheilk.* 62, 257– 263.
33. Hoyme UB and Saling E (2004). Efficient Prematurity Prevention Is Possible by pH-self Measurement and Immediate Therapy of Threatening Ascending Infection. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 115, 148–153.
34. Hoyme UB, Kentner A., Mylonas I (2012). Laparoscopic Diagnosis of Chlamydial Pelvic Inflammatory Disease and its Impact on Chlamydia Screening Programmes. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 7, 9-13.
35. Kiss H, Petricevic L and Husslein P (2004). Prospective Randomised Controlled Trial of an Infection Screening Programme to Reduce the Rate of Preterm Delivery. *BMJ* 2004 August 14; 329(7462): 371.
36. Lamont RF, Nhan-Chang CL, Sobel JD, Workowski K, Conde-Agudelo A and Romero R (2011). Treatment of Abnormal Vaginal Flora in Early Pregnancy with Clindamycin for the Prevention of Spontaneous Preterm Birth: a Systematic Review and Metaanalysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 205, 177–190.
37. Larsson PG, Bergstrom M, Forsum U, Jacobsson B, Strand A and Wolner-Hanssen P (2005). Bacterial vaginosis. Transmission, role in genital tract infection and pregnancy outcome: an enigma. *APMIS* 113, 233-245.
38. Larsson PG and Forsum U (2005). Bacterial vaginosis -- a disturbed bacterial flora and treatment enigma. *APMIS* 113, 305-316.

39. Lebeer S, Verhoeven TL, Claes IJ, De Hertogh G, Vermeire S, Buyse J, Van Immerseel F, Vanderleyden J and De Keersmaecker SC (2011). FISH analysis of *Lactobacillus* biofilms in the gastrointestinal tract of different hosts. *Lett. Appl. Microbiol.* 2011 Jan 12. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.02994.x.
40. Macones GA, Parry S, Elkousy M, Clothier B, Ural SH and Strauss JF (2004). A Polymorphism in the Promoter Region of TNF and Bacterial Vaginosis: Preliminary Evidence of Gene-environment Interaction in the Etiology of Spontaneous Preterm Birth. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190, 1504–1508.
41. Martius J, Hoyme UB und Mendling W (2013). S1-Leitlinie Bakterielle Vaginose in Gynäkologie und Geburtshilfe. AWMF (ed.), Leitlinienregister, vol. 015/028.
42. Martius J, Krohn MA, Hillier SL, Stamm WE, Holmes KK and Eschenbach DA (1988). Relationships of vaginal *Lactobacillus* species, cervical *Chlamydia trachomatis*, and bacterial vaginosis to preterm birth. *Obstet. Gynecol.* 71, 89-95.
43. Martinez LR and Fries BC (2010). Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. *Curr. Fungal. Infect. Rep.* 4, 266-275.
44. McDonald HM, Brocklehurst P and Gordon A (2007). Antibiotics for Treating Bacterial Vaginosis in Pregnancy. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2007 Jan 24; (1):CD000262.
45. Mendling W und Krasemann C (1986). Bakteriologische Befunde und therapeutische Konsequenzen bei Adnexitis. *Geburtsh. Frauenheilk.* H6, 462- 468.
46. Mendling W und Krasemann C (1988). Verursacht die Bakterielle Vaginose Frühgeburten? *Kongr. Dtsch. Ges. Gyn. Geburtsh.* , München.
47. Mendling W (2009). Back to the roots- mit Laktobazillen und Probiotika. *Frauenarzt* 50, 396-404.
48. Mendling W, Swidsinski A und Swidsinski S (2006). Adhärenter Biofilm bei bakterieller Vaginose: Hatte Gardner doch Recht?. *Frauenarzt* 47, 308-313.
49. Mendling W (2006). *Vaginose, Vaginitis, Zervizitis und Salpingitis.* Heidelberg: Springer Verlag.
50. Mendling W (2009). Die bakterielle Vaginose- eine sexuell übertragbare Erkrankung. *Frauenarzt* 50, 321- 327.
51. Mendling W (2010). Milchsäure und Milchsäurebakterien bei rezidivierenden Scheideninfektionen. *Frauenarzt* 51, 446-453.
52. Nugent RP, Krohn MA and Hillier SL (1991). Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J. Clin. Microbiol.* 29, 297-301.
53. Patterson JL, Girerd PH, Karjane NW and Jefferson KK (2007). Effect of biofilm phenotype on resistance of *Gardnerella vaginalis* to hydrogen peroxide and lactic acid. *Am.*

- J. Obstet. Gynecol. 197, 170.e1-7.
54. Pavletic AJ, Wölner-Hanssen P, Paavonen J, Hawes SE and Eschenbach DA (1999). Infertility following pelvic inflammatory disease. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 7, 145-152.
  55. Peacocke M, Djurkinak E and Thys-Jacobs S (2008). Treatment of Desquamative Inflammatory Vaginitis with Vitamin D: a Case Report. *Cutis* 81, 75–78.
  56. Reid G (2001). Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 437-443.
  57. Romero R, Garite TJ (2008). Twenty percent of very preterm neonates (23-32 weeks of gestation) are born with bacteremia caused by genital Mycoplasmas. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 198, 1-3.
  58. Romero R, Schaudinn C, Kusanovic JF, Gorur A, Gotsch F, Webster F, Nhan-Chang CL, Erez O, Kim CJ, Espinoza J, Goncalves LF, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, Hassan SS, Costerton JW (2008). Detection of a microbial biofilm in intraamniotic infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 198, 135e1-135e5.
  59. Saling E (2011). Problems in Prevention of Preterm Birth--regrettable Contradictions. A Special Comment from the Founder of the Journal of Perinatal Medicine. *J. Perinat. Med.* 39, 223–225.
  60. Sobel JD (1994). Desquamative Inflammatory Vaginitis: a New Subgroup of Purulent Vaginitis Responsive to Topical 2% Clindamycin Therapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171, 1215–1220.
  61. Sparks RA, Purrier BG, Watt PJ and Elstein M (1977). The Bacteriology of the Cervix and Uterus. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 84, 701-704.
  62. Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Ladhoff A, Swidsinski S, Hale LP and Lochs H (2005). Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstet. Gynecol.* 106, 1013-1023.
  63. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Bengmark S, Scholze J and Doerffel Y (2008). Bacterial biofilm suppression with antibiotics for ulcerative and indeterminate colitis: consequences of aggressive treatment. *Arch. Med. Res.* 39, 198-204.
  64. Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Dörffel Y, Scholze J, Lochs H and Verstraelen H (2008). An Adherent Gardnerella Vaginalis Biofilm Persists on the Vaginal Epithelium after Standard Therapy with Oral Metronidazole. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 198, 97.e1–6.
  65. Swidsinski A, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Mendling W, Schilling J, Patterson JL and Verstraelen H (2010). Dissimilarity in the occurrence of Bifidobacteriaceae in vaginal and perianal microbiota in women with bacterial vaginosis. *Anaerobe* 16, 478-482.
  66. Swidsinski A, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Schilling J and Mendling W (2010). Response of Gardnerella vaginalis biofilm to 5 days of moxifloxacin treatment. *FEMS*

Immunol. Med. Microbiol. 61, 41-46.

67. Swidsinski A, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Verstraelen H, Vaneechoutte M, Lemm V, Schilling J and Mendling W (2010). Gardnerella Biofilm Involves Females and Males Is Transmitted Sexually. *Gynecol. Obstet. Invest.* 70, 256-263.
68. Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, Mendling W, Verstraelen H, Dieterle S and Schilling J (2010). Desquamated epithelial cells covered with a polymicrobial biofilm typical for bacterial vaginosis are present in randomly selected cryopreserved donor semen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 399-404.
69. Van der Meijden WI, Koerten H, Van Mourik and de Bruijn WC (1988). Descriptive Light and Electron Microscopy of Normal and Clue-cell-positive Discharge. *Gynecol. Obstet. Invest.* 25, 47–57.
70. Weström L (1975). Effect of Acute Pelvic Inflammatory Disease on Fertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 121, 707–713.
71. Weström L, Evaldson G, Holmes KK, van der Meijden W, Rylander E and Fredriksson B (1984). Taxonomy of Vaginosis; Bacterial Vaginosis – A Definition. In Mardh PA, Taylor–Robinson D (Ed.), *Bacterial Vaginosis.* (259–260). Stockholm: Amquist & Wiksell International.

## **9. Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Zaher Halwani, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Nachweis bakterieller Biofilm im oberen Genitaltrakt der Frau] 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) entsprechen den URM und 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. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

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

## **10.Lebenslauf**

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

## **Danksagung**

Ich danke meinem Doktorvater für geduldige, wissenschaftliche und väterliche Einweisung und Korrekturen.