

Aus der Klinik für Geburtsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Mitte

DISSERTATION

Das Amnioninfektionssyndrom: Molekularbiologische
Identifikation von Mikroorganismen an Eihäuten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ina Steding

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.06.2016

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	V
Abstract	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Relevanz des Amnioninfektionssyndroms im klinischen Alltag.....	1
1.2 Grundlagen.....	3
1.2.1 Frühgeburtlichkeit.....	3
1.2.1.1 Risikofaktoren für eine Frühgeburt.....	3
1.2.1.2 Pathogenese der Frühgeburt	4
1.2.1.3 Einfluss der Vaginalflorea	8
1.2.2 Nachweis einer intrauterinen Infektion	10
1.2.3 Pathologie der Plazenta beim Amnioninfektionssyndrom	12
1.3 Fragestellung.....	15
2 Methodik	16
2.1 Studienpopulation und Einschlusskriterien	16
2.2 Voraussetzungen zur Entwicklung eines Entnahmeprotokolls	16
2.3 Einführung eEPK.....	17
2.4 Gesamtübersicht der Methodik.....	20
2.5 Auswahl der Patientinnen.....	22
2.5.1 Auswahl der Patientinnen der AIS-Gruppe	22
2.5.2 Auswahl der Patientinnen der Kontrollgruppe	23
2.6 Arbeitsablauf der Probenakquise	24
2.7 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Visualisierung von Mikroorganismen.....	29
2.8 PCR als Hilfsmittel zur Detektion von Mikroorganismen.....	33
2.9 Auswertung der Daten.....	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Standardisiertes Entnahmeprotokoll.....	35
3.1.1 Kontaminationsarme Probenentnahme	35
3.1.2 Eindeutige Darstellung der erforderlichen Arbeitsschritte	35

3.2 Charakteristik der Studienpopulationen.....	36
3.2.1 Allgemeine Daten der Fallgruppe.....	36
3.2.2 Allgemeine Daten der Kontrollgruppe	36
3.2.3 Vergleich der Fall- und Kontrollgruppe.....	37
3.3 Präpartal und peripartal erfasste Daten der Fallgruppe.....	40
3.3.1 Aufnahme und stationärer Verlauf.....	40
3.3.2 Entbindung.....	43
3.4 Postpartale Untersuchungsergebnisse von Plazenta und Eihaut.....	44
3.4.1 Abstrich	44
3.4.2 FISH.....	47
3.4.3 PCR	49
3.4.4 Pathologie	52
3.4.5 Ergebnis.....	53
4 Diskussion	54
4.1 Methodik.....	54
4.1.1 Strukturierung einer kontaminationsfreien Plazenta- und Probenentnahme ..	54
4.1.2 Darstellung von Arbeitsschritten einer medizinischen Studie.....	55
4.2 Zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen AIS-Patientinnen und Kontrollgruppe?.....	57
4.2.1 Abstrich	57
4.2.2 FISH.....	59
4.2.3 PCR	61
4.2.4 Histo-pathologische Untersuchung	63
4.2.5 Kontrolle	63
4.3 Ureaplasmen	64
4.4 Limitationen der Arbeit	66
5 Zusammenfassung.....	69
6 Literaturverzeichnis.....	XI
7 Eidesstattliche Versicherung	XIV
8 Lebenslauf.....	XV
9 Danksagung	XVII

Abstrakt

Ziel

Geburten vor der 37. Schwangerschaftswoche stellen in Deutschland weiterhin eine geburtsmedizinische und neonatologische Herausforderung dar. Von diesen sind bis zu 40% der Frühgeburten infektiös bedingt. Zur Identifikation eines Amnioninfektionssyndroms (AIS) und der beteiligten Mikroorganismen werden routinemäßig eine kulturbasierte und histologische Diagnostik durchgeführt. Ziel dieser Studie ist es, ein kontaminationsarmes Studienprotokoll zu entwickeln und anschließend molekularbiologische Nachweismethoden (FISH, PCR) zur Detektion der beteiligten Mikroorganismen einzuführen und die Ergebnisse mit der konventionellen Diagnostik zu vergleichen.

Methodik

Die Studie setzt sich aus 25 Patientinnen in der AIS-Gruppe und 25 Patientinnen der Kontrollgruppe zusammen. Zur Minimierung der mikrobiellen Kontamination während der Entnahme der Plazenta- und Eihaut-Proben nach Sectio caesarea wurde ein Entnahmeprotokoll zur Standardisierung der Vorgehensweise entwickelt. Anschließend wurden mittels 16S rRNA Sonden die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung sowie die PCR des 16S rRNA-Gens durchgeführt. Zur Evaluierung dieser Methoden erfolgte der Vergleich der Ergebnisse mit den Resultaten der kulturellen und histo-pathologischen Untersuchungen.

Ergebnis

Die FISH und PCR konnten in vielen Fällen eine Besiedlung der Eihäute nachweisen und die besiedelnde Spezies identifizieren. Häufig stellte dies eine Ergänzung zur kulturellen Untersuchung dar, die nicht zuverlässig einen Besiedlungsnachweis bei histo-pathologisch gesichertem AIS erbringen konnte. Vereinzelt ergab sich eine durch FISH und PCR identifizierte, mikrobielle Besiedlung, die histologisch und kulturell nicht bestätigt werden konnte.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der Studie legen nahe, dass die FISH und PCR eine wertvolle Ergänzung in der Diagnostik eines AIS darstellen und Hinweise auf deren Entstehungsmechanismus liefern. Weiterhin war es möglich, ein kontaminationsarmes

Studienprotokoll zu entwickeln und eEPK als Werkzeug zur Prozessbeschreibung in der medizinischen Forschung zu etablieren. Die Untersuchung der Kontrollpatientinnen erbrachte neue Hinweise, die gegen das häufige Vorkommen klinisch unauffälliger Infektionen bei normal verlaufenden Schwangerschaften sprechen.

Aufgrund der geringen Größe einer Probe ist es möglich, dass mitunter besiedelte Areale nicht erfasst wurden. Eine Weiterführung der Untersuchungen an zusätzlichen betroffenen Patientinnen ist notwendig, um die Ergebnisse zu verifizieren und ein besseres Verständnis der Pathogenese des AIS zu entwickeln.

Abstract

Aim of the study

Preterm birth is still an obstetrical and neonatological challenge in Germany. 40% of these deliveries are induced by infectious agents. The identification of chorioamnionitis and the causing microorganisms is currently obtained by culture-based methods and histological diagnosis. The objective of this study is to originate a contamination-free study protocol as a basis to analyse samples taken from the amniotic membrane and the placenta. Results derived from sample analysis through moleculobiological methods (FISH, PCR) are matched against conventional diagnosis.

Methods

The study population consists of 25 inpatients with chorioamnionitis delivering via secondary Caesarean section and 25 inpatients that delivered by a planned Caesarean section. A standardised extraction protocol has been developed to minimise microbial contamination during sample acquisition after the Caesarean section. The following working steps included Fluorescence-in-situ-hybridisation with 16S rRNA-probes and RT-PCR of the 16SrRNA-gene. The results of the moleculobiological based methods have been compared to the results of culture-based and histological methods.

Results

FISH and PCR identified a microbial colonisation of the amniotic membrane and the precise species. This is a useful supplement to culture-based methods since those were not able to detect a microbial colonisation in a histological ensured chorioamnionitis.

Occasionally, FISH and PCR detected a microbial infection that could not be verified by culture-based and histological methods.

Conclusion

The results of this study suggest that moleculobiological methods are valuable additions in the diagnostic process of chorioamnionitis. They provide new indications of the formation and origin of chorioamnionitis that leads to a better understanding of this medical condition. Furthermore, we were able to provide a standardized contamination-free study protocol and implemented eEPK as a medical process description notation. Additionally, we demonstrated the absence of microbial invasion in normal gestations. The limitations of this study are the small number of inpatients and the limited number of samples derived and analysed from each patient. Further studies are required to verify the obtained results.

Abkürzungsverzeichnis

AIS	-	Amnioninfektionssyndrom
MIAC	-	microbial invasion of the amniotic cavity, mikrobielle Invasion der Amnionhöhle
PPROM	-	preterm premature rupture of membranes, vorzeitige unreife Ruptur von Membranen
BV	-	Bakterielle Vaginose
IUD	-	Intrauterine Device, Intrauterine Einheit zur Verhütung
FISH	-	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
PCR	-	polymerase chain reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion
RT-PCR	-	realtime polymerase chain reaction, Echtzeit Polymerase-Ketten-Reaktion
CRP	-	C-reaktives Protein
SSW	-	Schwangerschaftswoche
IL-6	-	Interleukin 6
IL-8	-	Interleukin 8
WHO	-	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
rDNA	-	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
eEPK	-	erweiterte ereignisgesteuerte Prozesskette

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mögliche Infektionswege einer intrauterinen Infektion	5
Abbildung 2: Marker einer intrauterinen Infektion in der Schwangerschaft	7
Abbildung 3: Nachweis der Häufigkeit der anhand von PCR entdeckten Bakterien in der Amnionflüssigkeit	11
Abbildung 4: Gesamtübersicht der Arbeitsschritte	20
Abbildung 5: Auswahl der Studienpatientinnen des Fallkollektivs	22
Abbildung 6: Auswahl der Studienpatientinnen der Kontrollgruppe	23
Abbildung 7: Probenaufnahme Teil 1	24
Abbildung 8: Probenaufnahme Teil 2	25
Abbildung 9: Markierte Probenentnahmestellen an Eihaut	27
Abbildung 10: Markierte Probenentnahmestellen des Plazentagewebes	27
Abbildung 11: Arbeitsschritte der FISH-Diagnostik	30
Abbildung 12: PCR beim Amnioninfektionssyndrom	33
Abbildung 13: Altersverteilung in AIS- und Kontrollgruppe	37
Abbildung 14: Gestationsalter im Vergleich bei AIS- und Kontrollgruppe	38
Abbildung 15: Dauer der stationären Behandlung im Vergleich bei AIS- und Kontrollgruppe	39
Abbildung 16: Verteilung der Patientinnen bei Aufnahme nach Schwangerschaftswoche	40
Abbildung 17: Darstellung der Schwangerschaftswoche bei Entbindung, eingeordnet nach WHO-Kriterien zu Frühgeburtlichkeit und Studiengruppe	41
Abbildung 18: Indikationen zur Entbindung	43
Abbildung 19: Ergebnisse der präpartalen kulturellen Diagnostik der AIS-Gruppe	44
Abbildung 20: Ergebnisse der postpartalen Plazenta-Abstriche bei AIS-Gruppe und Kontrollgruppe	45
Abbildung 21: Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Vergleich zwischen AIS- und Kontrollgruppe	47
Abbildung 22: Darstellung einer Gewebeprobe des Fallkollektivs	48
Abbildung 23: Ergebnisse der Polymereasekettenreaktion bei AIS- und Kontrollgruppe	49
Abbildung 24: Ergebnisse der histo-pathologischen Untersuchung der AIS- und Kontrollgruppe im Vergleich	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histologische Stadieneinteilung des maternalen AIS nach Holzman et al. 2007	13
Tabelle 2: Histologische Stadieneinteilung des fetalen AIS nach Holzman et al. 2007	13
Tabelle 3: Einteilung der Schweregrade des AIS nach Holzman et al. 2007	14
Tabelle 4: Beschreibung der Notationselemente eines eEPK nach Scheer et al. 1997	18
Tabelle 5: Standardsondenset zur FISH-Diagnostik beim AIS	31
Tabelle 6: Spezifische Sonden zur weiterführenden Diagnostik	32
Tabelle 7: Kulturell erfasste mikrobielle Besiedlung vor der Entbindung	42
Tabelle 8: Kulturell erfasste mikrobielle Besiedlung von Plazenta und Eihaut nach der Entbindung	45
Tabelle 9: Nachgewiesene Bakterienspezies in der PCR.....	50
Tabelle 10: Ergebnisse aller Untersuchungen bei PCR positiven Patientinnen der Fallgruppe.....	50

1 Einleitung

1.1 Relevanz des Amnioninfektionssyndroms im klinischen Alltag

Eine der Hauptursachen für Geburten vor der 37. Schwangerschaftswoche in Deutschland^{1,2} sind intrauterine Infektionen³. Für die in diesem Kontext geborenen Kinder besteht ein erhöhtes Risiko, direkte oder indirekte Folgen dieser frühen Geburt zu erleiden, zu denen unter anderem das Atemnotsyndrom, Hirnblutungen und neurologische Defizite gehören⁴. Überleben diese Kinder die direkten Folgen der zu frühen Geburt, benötigen sie häufig weitere, intensive Unterstützung im Lauf ihres Lebens¹. Die Kosten dieser Folgen trägt meist die Gesellschaft, in der sie leben^{1,5}.

Ungeachtet der Tatsache, dass verschiedene Erklärungsansätze für die Entstehung einer klinisch manifesten Amnioninfektion existieren, sind die klinischen Anhaltspunkte nicht immer vorhanden und teilweise unspezifisch. Als diagnostische Kriterien für ein Amnioninfektionssyndrom (AIS) haben sich eine Leukozytose, CRP-Erhöhung, Fieber sowie maternale und fetale Tachykardie in Kombination mit einem vorzeitigen Blasensprung oder einer vorzeitigen Wehentätigkeit erwiesen. Erst durch die postpartale histologische Untersuchung von Plazenta und Eihäuten wird die Verdachtsdiagnose des AIS bestätigt oder widerlegt. Eine kalkulierte antibiotische Behandlung und effektive präpartale Betreuung ist daher sowohl für die maternale, als auch die fetale Prognose entscheidend. Dafür ist es notwendig zu wissen, welche Mikroorganismen als Auslöser für eine intrauterine Infektion infrage kommen.

Die klassische Nachweismethode einer Infektion nach einem frühzeitigen Blasensprung oder vorzeitigen Wehen ist ein vaginaler Abstrich und die darauf folgende Anlegung einer Erregerkultur. Das Problem bei der Anlegung von Bakterienkulturen aus diesen Abstrichen ist die schwierige Kultivierung anaerober Bakterien sowie das schlechtere Wachstum der meisten Bakterienspezies in Reinkulturen. Ebenso ist eine Differenzierung zwischen pathogenen Erregern und Standortflora schwierig. Durch die Untersuchung vieler in den Körper eingebrachter Implantate ist bekannt, dass Bakterien Biofilme, definiert als Lebensgemeinschaften von Mikroorganismen, gebunden an eine Oberfläche⁶, bilden und dadurch eine, auch unter Antibiotikatherapie, erhöhte Überlebenschance besitzen⁷. Mittels neuer molekularbiologischer Methoden wie der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist es möglich, diese Biofilme sichtbar zu

machen⁸. Zusätzlich ist es möglich, dass durch die Anwendung von Techniken zur Amplifikation von Nukleinsäuren kulturell nicht nachzuweisende Bakterien dargestellt werden. Diese schon etablierten Techniken können auch in der Geburtsmedizin angewendet werden. Im Rahmen eines publizierten Case-Reports wurde der Nachweis eines Biofilms in der Amnionhöhle einer Patientin erbracht⁹. Ebenso gibt es zahlreiche Hinweise auf vaginale Biofilme^{10,11}. Die Schwierigkeit der Anwendung dieser Techniken in der Geburtsmedizin liegt in der Erzielung verlässlicher Ergebnisse anhand der Untersuchung von Plazenta und Eihäuten, da bei der Geburt Kontaminationen durch die vaginale Standortflora entstehen.

Ziel der Arbeit

Zur Erweiterung bisheriger Erkenntnisse über das Keimspektrum beim Amnioninfektionssyndrom sollen daher in dieser Arbeit möglichst kontaminationsarme Methoden zur Probenakquise entwickelt und geeignete mikrobiologische Verfahren zur Erregerdiagnostik angewendet werden. Basierend auf den Ergebnissen, soll beurteilt werden, wie geeignet die angewendeten Methoden zur Klärung diverser Fragestellungen, das Amnioninfektionssyndrom betreffend, sind.

1.2 Grundlagen

1.2.1 Frühgeburtlichkeit

Frühgeburtlichkeit ist aktuell eine der Hauptursachen für die Sterblichkeit von Kindern unter 5 Jahren¹. Die WHO definiert eine Frühgeburt als jede Geburt vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche oder weniger als 259 Tage seit dem ersten Tag der letzten Periode der betroffenen Frau¹. Zu früh Geborene haben ein erhöhtes Risiko, im klinischen Verlauf zu versterben oder lebenslange körperliche/intellektuelle Einschränkungen davonzutragen. In Deutschland liegt die Frühgeborenenrate bei 8,9%¹² und unterscheidet sich damit nur wenig von den Daten weltweit (11,1%)¹.

Frühgeburten werden anhand der vollendeten Schwangerschaftswoche in drei Gruppen eingeteilt: extreme Frühgeburt (unter 28 SSW), sehr früh Geborene (28 bis 32 SSW) und späte Frühgeburt (32 bis 37 SSW). Diese Einteilung ist insofern relevant, da sich mit steigendem Schwangerschaftsalter des Fetus die gesundheitlichen Risiken verringern¹. Ebenso hängt die Gesundheit des Kindes von der Ursache der verfrühten Entbindung ab. Auch diese wird in drei Gruppen eingeteilt: spontane Frühgeburten (50%), Beendigung der Schwangerschaft wegen maternaler oder fetaler Indikationen (30%) und vorzeitigen Blasensprungs (20%)¹³. Späte Frühgeburten machen insgesamt einen Anteil von 70% an der Gesamtgruppe der Frühgeburten aus und weisen einen geringeren Anteil an der Gesamtmortalität und -morbidity auf¹⁴. Trotzdem ist auch bei dieser Gruppe das Risiko für eine neonatale Beeinträchtigung, im Vergleich zu Neugeborenen am Termin, erhöht¹⁴. Neben der finanziellen Belastung durch neonatale Intensivbetreuung wird eine engmaschige weiterführende gesundheitliche Betreuung benötigt.

Die Rate der Frühgeburten der letzten Jahre ist konstant geblieben¹⁵ und zwingt die medizinische Forschung, Lösungsansätze zu entwickeln um dies langfristig zu ändern und mittelfristig Strategien zu entwickeln, die gesundheitlichen Beeinträchtigungen der Kinder aufzufangen.

1.2.1.1 Risikofaktoren für eine Frühgeburt

Die Gründe für das Auftreten von Frühgeburten sind zahlreich und können nicht anhand eines singulären Ereignisses in der Schwangerschaft erklärt werden. Vielmehr ist es eine Kombination mehrerer Faktoren, die als Ergebnis eine zu frühe Geburt zur Folge haben. Die wichtigsten Risikofaktoren für eine Frühgeburt wurden jedoch anhand

zahlreicher Beobachtungen ermittelt und schließen erhöhtes maternales Alter, Ernährungssituation, multiple Schwangerschaften, Rauchen, vorangegangene Frühgeburten, eine veränderte Vaginalflora und akute Infektionen ein^{15,16}. Wie diese Risikofaktoren im Einzelnen zur Pathogenese einer spontanen Frühgeburt oder eines PPROM (preterm premature rupture of membranes) beitragen, ist größtenteils unbekannt¹⁴ und Gegenstand aktueller Forschung.

1.2.1.2 Pathogenese der Frühgeburt

Eine Hypothese besagt, dass eine entzündungsvermittelte Deziduaaktivierung eine zentrale Rolle spielen könnte¹³. Infektionen, Entzündungen oder Hämorrhagien aktivieren das maternale und fetale Immunsystem, dadurch ausgeschüttete Chemokine und Zytokine induzieren ihrerseits Prostaglandine, Metalloproteasen und andere Enzyme¹⁵. Die Prostaglandine regen den Uterus zur Kontraktion an, wohingegen die Metalloproteasen beginnen, die Eihäute (Amnion mit dünn ausgezogenem Teil des Chorion) zu zersetzen, was zur Ruptur ebenjener führt¹⁵. Die Metalloproteasen greifen ebenso das Kollagen der Zervix an und führen zu einer Verkürzung der Zervix, um das Durchtreten des Kindes durch den Geburtskanal zu ermöglichen.

Ebenso ist es möglich, dass die Reaktion des Fetus auf eine Infektion selbst die Frühgeburt induzieren kann. Verschiedene Studien legen nahe, dass ein erhöhter fetaler Cortisolspiegel eine Reaktion auf proinflammatorische Zytokine bzw. die generelle Anwesenheit von Mikroorganismen sein kann^{17,18}. Es zeigte sich, dass dieser eindeutig mit dem IL-6- und IL-8- Spiegel korrelierte¹⁸. Weiterhin wurde angenommen, dass das fetale Cortisol Prostaglandine stimuliert und die Wirkung des Progesterons als schwangerschafterhaltendes Hormon hemmt¹⁷ und dadurch eine Frühgeburt auslöst.

Bei beiden Theorien spielen Infektionen und assoziierte Entzündungsreaktionen eine zentrale Rolle. Durch erregerkulturelle Untersuchungen des Fruchtwassers wurde ermittelt, dass 25-40% der Frühgeburten durch Infektionen ausgelöst werden¹⁵. Diese Infektionen innerhalb des Uterus finden zwischen dem maternalen Gewebe und den fetalen Membranen, in den fetalen Membranen (Chorioamnionitis) selbst, in der Plazenta (Villitis), in der Amnionflüssigkeit (Amnionitis), in der Nabelschnur (Funisitis) oder im Fetus selbst statt. Da die Relevanz einer Infektion als Auslöser einer spontanen Frühgeburt oder eines PPROM¹⁹ außer Frage steht, gilt es zu klären, wie die Bakterien Zugang zur Fruchthöhle bekommen und um welche Bakterien es sich hierbei handelt.

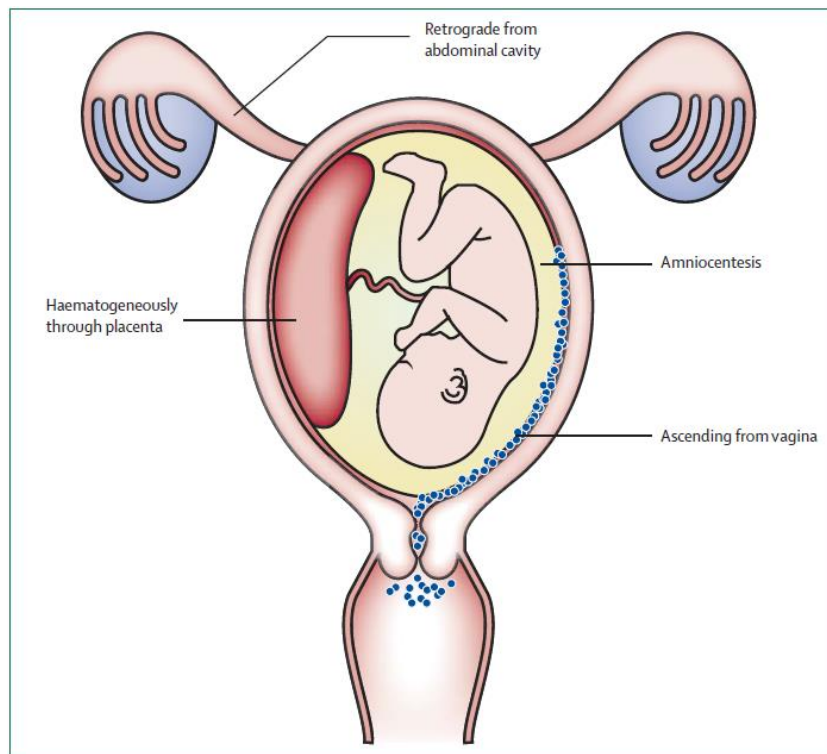


Abbildung 1: Mögliche Infektionswege einer intrauterinen Infektion¹³

Abbildung 1 zeigt folgende Möglichkeiten eines Zugangs:

1. eine ascendierende Infektion über die Vagina und die Zervix
2. eine hämatogene Streuung über die Plazenta
3. eine akzidentelle Einbringung zum Zeitpunkt einer invasiven Untersuchung, zum Beispiel einer Amniozentese
4. eine retrograde Infektion über die Eileiter aus dem Abdomen¹³.

Den häufigsten Infektionsweg stellt die ascendierende Infektion dar¹³. Der Zeitpunkt der Kolonisation ist bisher unbekannt, könnte aber früh in der Schwangerschaft liegen und über Monate unentdeckt bleiben. Ebenso ist eine Besiedlung vor der Schwangerschaft denkbar, da in einer Studie bei Patientinnen mit bakterieller Vaginose (BV) dieselben Bakterien in Kulturen des Endometriums nachgewiesen werden konnten²⁰ und somit eine intrauterine Infektion ohne das Bestehen einer Schwangerschaft vorliegt. Aufgrund dieser Entdeckung wäre es also möglich, dass die bakterielle Besiedlung im Uterus bereits zum Zeitpunkt der Konzeption besteht¹⁵. Viele Infektionen des oberen Genitaltrakts bleiben asymptomatisch. Fraglich ist nun, weshalb die intrauterine

Infektion erst in der Schwangerschaftsmittle symptomatisch wird. Folgende zwei Erklärungsansätze liegen hierzu vor:

Während der Entwicklung des Embryos wächst die Amnionhöhle in die Chorionhöhle hinein. Am Ende des dritten Monats ist das Wachstum so ausgedehnt, dass die Chorionhöhle durch das Amnion vollständig ausgefüllt wird, dieses auf dem Chorion zu liegen kommt, Amnion und Chorion miteinander verschmelzen und die sogenannten Eihäute bilden. Durch die gesamte Ausdehnung der Embryonalanlage zu diesem Zeitpunkt trifft das Chorion laeve auf das Endometrium der gegenüberliegenden Uterusseite, die Decidua parietalis, und verschmilzt mit ihr. Zu diesem Zeitpunkt ist das Uteruslumen vollständig ausgefüllt²¹. Daraus folgend, kann sich durch das dichte Zusammenliegen der Membranen und der Dezidua ein Abszess entwickeln, wenn die bei der Konzeption vorhandenen Bakterien nicht rechtzeitig vom maternalen Immunsystem zerstört wurden. Aufgrund dessen können die Patientinnen symptomatisch werden und die Situation kann in einer spontanen Frühgeburt oder einem PPROM eskalieren¹³. Zerstört das maternale Immunsystem die im Uterus vorhandenen Bakterien rechtzeitig, entwickeln sich kaum oder nur selten erneut Infektionen, solange die Eihäute intakt bleiben.

Eine alternative Hypothese besagt, dass der Fetus nur mit einem funktionierenden Immunsystem in der Lage ist, entsprechend auf eine ihn betreffende oder umgebende Infektion zu reagieren und die nötigen Zytokine oder Hormone auszuschütten, die fähig sind, die Geburt zu initiieren¹⁵. Die Hämatopoese des Fetus findet bis zur 12. Woche in der Leber statt, ebenso die Bildung weißer Blutzellen. Daher entwickelt sich rund um diesen Zeitpunkt ein fetales Immunsystem, das zunehmend leistungsfähiger wird und aktiv werden kann.

Vermutlich liegt die Erklärung des Zeitpunktes der Frühgeburt in der Kombination beider Hypothesen.

Es gibt verschiedene diagnostische Ansätze, um eine drohende Frühgeburt zu erkennen. Vorzeitige Wehen sind ein häufiges Symptom und erfordern weitere Untersuchungen, um das Frühgeburtsrisiko einzuschätzen. Das in diesem Zusammenhang wissenschaftlich am intensivsten untersuchte Kompartiment ist das Fruchtwasser, da dieses den Fetus vollständig umgibt.

WOMEN PRESENTING IN LABOR		
AMNIOTIC FLUID	CERVIX OR VAGINA	SERUM
Bacteria	Bacterial vaginosis	High G-CSF
Low glucose	High G-CSF	High interleukin-6
High white-cell count	High TNF- α	High TNF- α
High G-CSF	High interleukin-1	High C-reactive protein
High TNF- α	High interleukin-6	
High interleukin-1	High interleukin-8	
High interleukin-6	High fetal fibronectin	

ASYMPTOMATIC WOMEN IN ROUTINE PRENATAL CARE		
AMNIOTIC FLUID	CERVIX OR VAGINA	SERUM
High interleukin-6	Bacterial vaginosis	High G-CSF
	High interleukin-6	High ferritin
	High ferritin	
	High fetal fibronectin	

*G-CSF denotes granulocyte colony-stimulating factor, and TNF- α tumor necrosis factor α .

Abbildung 2: Marker einer intrauterinen Infektion in der Schwangerschaft¹⁵

Goldenberg et al. erstellten im Jahr 2000 eine Übersicht an beobachteten Infektionsmarkern im Fruchtwasser, der Zervix/Vagina und dem Serum. Anhand von Abbildung 2 ist erkennbar, dass eine intrauterine Infektion diverse Veränderungen in verschiedenen Kompartimenten verursacht. Im Fruchtwasser sind Bakterien, verminderte Glucosewerte, eine erhöhte Anzahl weißer Blutzellen und höhere Konzentrationen verschiedener Zytokine als bei nicht infizierten Frauen nachweisbar. An der Zervix oder in der Vagina können die gleichen Zytokine wie in der Amnionflüssigkeit nachgewiesen werden, da sie allgemeine Marker für Infektionen darstellen. Zusätzlich ist Interleukin-8 nachweisbar, das als Chemokin fungiert. Ausschließlich das erhöhte fetale Fibronectin zeigt jedoch eine drohende Frühgeburt an. Es ist anzunehmen, dass durch die intrauterine Infektion die äußerste Eihaut rupturiert, wodurch dieses Protein in die Vagina gelangen kann²². Da dies nur die äußere Membran betrifft, ist kein Nachweis von Fruchtwasser zu erbringen, die das Ereignis zu diesem Zeitpunkt als PPROM markieren würde. Im Serum der betroffenen Patientinnen sind, neben den ebenso im Fruchtwasser und dem vaginalen Abstrich vorhandenen G-CSF, TNF- α und IL-6, ein erhöhter CRP- Spiegel nachweisbar. In der Kombination mit vorzeitigem Wehen sind all diese Marker in den drei Kompartimenten Vorboten einer drohenden Frühgeburt durch eine Infektion¹⁵. Da eine Amniozentese als

invasive Diagnostik nicht routinemäßig durchgeführt wird, sind nur die Serummarker im klinischen Alltag relevant. Leider zeigen diese allein lediglich eine unspezifische Entzündungsreaktion. Dies zieht im klinischen Alltag die Verdachtsdiagnose des AIS anhand unspezifischer Entzündungszeichen wie Fieber, maternaler und fetaler Tachykardie, Leukozytose und CRP-Erhöhung nach sich. Die weitere Diagnostik beinhaltet Abstriche zur Anlegung einer Erregerkultur und die prophylaktische Gabe von Cefuroxim und Metronidazol, um mögliche Infektionserreger zu behandeln.

Da der häufigste Infektionsweg die ascendierende Infektion darstellt, ist es notwendig zu verstehen, welchen Einfluss die Vaginalflora auf die Entstehung einer intrauterinen Infektion hat.

1.2.1.3 Einfluss der Vaginalflora

Milchsäurebakterien sind die dominierende Spezies der postpubertären humanen Vaginalflora. *Lactobacillus* spp. nutzen das vorhandene Glykogen, um Milchsäure zu produzieren, die verantwortlich für das relativ saure Milieu der Vagina mit einem pH-Wert von etwa 4,5 ist. Dies hemmt das Wachstum potenziell pathogener Mikroorganismen. Zusätzlich wird von einigen Laktobazillen Wasserstoffperoxid gebildet, das sich als toxisch für andere Mikroorganismen erwiesen hat und das Auftreten einer bakteriellen Vaginose vermindert²³. Die Gruppe der Lactobacillaceae ist groß und umfasst eine Vielzahl grampositiver Bakterien. Die häufigsten, in der Vaginalflora auftretenden, sind *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. iners* und *L. crispatus*¹¹, jedoch ist niemals ausschließlich nur eine Spezies vorhanden. Die normale bakterielle Flora ist vom Lactobacillus-dominierenden Typ¹¹. Weiterhin existiert eine Intermediärflora, die einen Wechsel von einer normalen Flora zur bakteriellen Vaginose oder zurück kennzeichnet¹¹. Definitionsgemäß ist die Intermediärflora charakterisiert durch die reduzierte Anzahl an Laktobazillen, gemischt mit anderen Morphotypen²⁴. Die anormale bakterielle Flora wiederum ist entweder durch anaerobe Überwucherung (bakterielle Vaginose), durch aerobe Bakterien wie *E. coli* und B-Streptokokken (aerobe Vaginitis) oder durch eine Mischung beider Besiedlungstypen gekennzeichnet.

Solange die Funktion der Vaginalflora bestehen bleibt, kann bei gesunden Frauen auch eine andersgeartete Zusammensetzung der Vaginalflora vorkommen. Beispielsweise wurden *Atopobium*, *Megasphaera* und *Leptotrichia* als alternative Milchsäureproduzenten nachgewiesen, die das Ökosystem dominierten²⁵.

Die Beschaffenheit der Vaginalflora etabliert sich in der Pubertät und bleibt meist bis zum Eintritt der Menopause bestehen²⁶. Trotzdem unterliegt die Zusammensetzung einer gewissen Dynamik. Anhand einer Untersuchung von 33 Frauen im reproduktionsfähigen Alter konnte nachgewiesen werden, dass in der Mehrheit der Probandinnen Veränderungen in der relativen Zusammensetzung der Spezies über einen Zeitraum von 16 Wochen stattfand²⁷. In einigen Fällen erfolgte auch ein Wechsel der gesamten Population, der über einen längeren Zeitraum persistierte und in einem neuen Zustand des Gleichgewichts im vaginalen Ökosystem resultierte²⁷. Faktoren, die diese Veränderungen hervorrufen können, werden aktuell untersucht. Mögliche Einflussfaktoren sind hormonelle Fluktuationen, sexuelle Praktiken, Häufigkeit des Geschlechtsverkehrs, Intimdsuschen oder die Nutzung anderer Hygieneprodukte²⁷. Veränderungen der Vaginalflora, die mit einer Überwucherung eines zur normalen Flora gehörenden Bakteriums oder einer Zunahme dessen Virulenz einhergeht, kann in der Entwicklung einer bakteriellen Vaginose (BV) resultieren²⁸. Ob eine Erkrankung eintritt, hängt jedoch immer von der Interaktion zwischen bakterieller Virulenz, numerischer Dominanz und der angeborenen und erworbenen Immunreaktion des Wirtes ab²⁸. Im Rahmen einer BV werden durch die Anlegung von Erregerkulturen diverse Spezies identifiziert, die häufig nicht Bestandteil des gesunden vaginalen Ökosystems, aber der Intermediärflora sein können¹¹. Dazu gehören *Mycoplasma hominis*, *G. vaginalis*, *Mobiluncus* spp.²⁸, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia tracomatis* und andere gram-negative Stäbchen¹¹. Die Intermediärflora kann aber, im Gegensatz zu einer BV, nicht signifikant mit einem nachteiligen Schwangerschaftsergebnis korreliert werden²⁹. Dementsprechend scheint nicht das Vorkommen potenziell pathogener Bakterien wie *M. hominis* für eine Infektion ursächlich zu sein, sondern die absolute Abwesenheit von Laktobazillen wie im Fall einer BV³⁰. Erschwerend kommt hinzu, dass etwa die Hälfte der Frauen mit einer anormalen Vaginalflora asymptomatisch bleiben oder nur milde Symptome entwickeln, die sie nicht zu einem Arztbesuch zwingen. Zu einer aufsteigenden Infektion, ausgehend von einer BV, kommt es in solchen Fällen, in denen das Immunsystem einer betroffenen Patientin hyporeagibel und daher nicht in der Lage ist, eine große Anzahl an Bakterien zu bekämpfen³¹. Eine klinisch manifeste intrauterine Infektion ist die Folge³¹.

1.2.2 Nachweis einer intrauterinen Infektion

Eine Möglichkeit, eine intrauterine Infektion direkt nachzuweisen, ist die Untersuchung von Amnionflüssigkeit. Im Rahmen mehrerer Studien wurde den Patientinnen unter sterilen Bedingungen per Amniozentese oder während der Sectio caesarea Fruchtwasser entnommen und weiterführend untersucht³²⁻³⁵. In einigen Studien standen Patientinnen mit PPRM im Vordergrund, andere untersuchten die mikrobielle Besiedlung bei intakten Membranen.

Die Amnionflüssigkeit wurde mittels Bakterienkulturen und PCR auf das Vorhandensein von Mikroorganismen untersucht^{32,35}. Die qualitative Analyse mittels konventioneller PCR beruht in den meisten Fällen auf der Anwendung von Breitspektrum 16S rDNA Primern und gruppenspezifischen Primern (z.B. *Candida* spp.)³². Weiterhin wurde zur quantitativen Analyse die RT-PCR herangezogen³⁵. Anhand dieser Methoden konnte nachgewiesen werden, dass eine mikrobielle Invasion der Amnionhöhle (MIAC microbial invasion of the amniotic cavity) bei einem PPRM in annähernd der Hälfte aller untersuchten Patientinnen nachweisbar war, jedoch häufig nur mittels PCR und nicht in der Kultur³⁵. Weiterhin wurden Spezies nachgewiesen, die vorher noch nicht in Fruchtwasser nachweisbar waren, oder Spezies, die mit dem Gastrointestinaltrakt assoziiert sind³⁵. Ebenso gab es einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *Candida* spp. und einem IUD; eine MIAC bei PPRM war assoziiert mit einer fetalen Immunreaktion und einem nachteiligen Schwangerschaftsergebnis³⁵. Auch für nicht bakterielle Spezies wurde der Nachweis geführt: *Candida* spp., Archaea, Protozoen (*Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* etc.) und Viren (Adenoviren, Enteroviren, CMV, Epstein-Barr-Virus, RSV)³⁶.

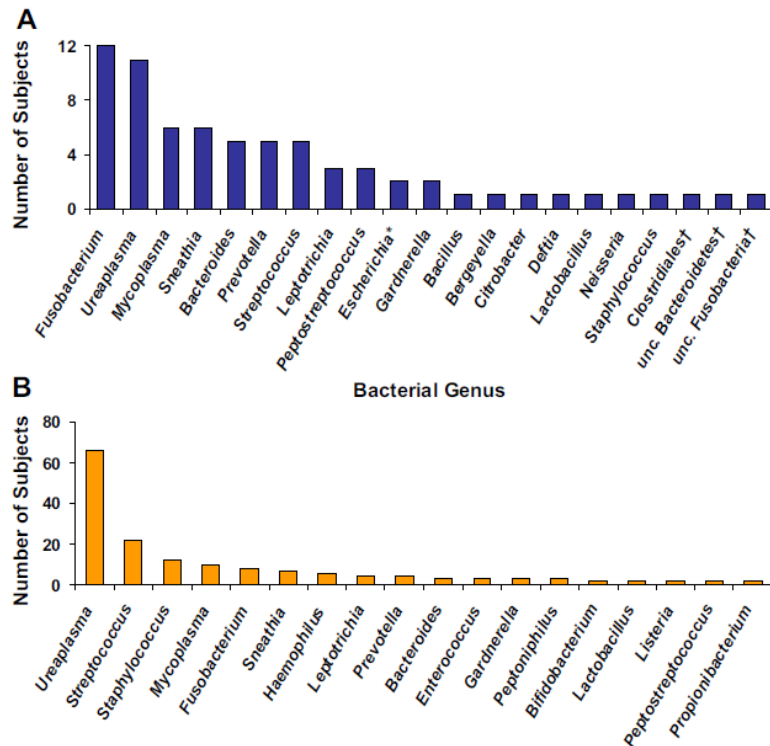


Abbildung 3: Nachweis der Häufigkeit der anhand von PCR entdeckten Bakterien in der Amnionflüssigkeit (A) alle in Studien ermittelten Bakterien bei Frauen mit vorzeitigen Wehen, aber intakten Eihäuten, (B) alle in Studien ermittelten Bakterien (vorkommend bei 2 oder mehr Frauen) bei Frauen mit PPROM³⁶

Abbildung 3 führt alle bisher mittels PCR identifizierten Bakterien auf, die bei Patientinnen mit vorzeitigen Wehen oder PPROM nachweisbar waren³⁶. Anhand dieser ist festzuhalten, dass in der Mehrzahl der Fälle bei einem PPROM Ureaplasmen nachweisbar waren, die häufig Bestandteil der Intermediärflora, also einem Übergangszustand zur BV oder zurück, sind^{11,36}.

Eine weitere Möglichkeit, eine intrauterine Kolonisation festzustellen, ist die Untersuchung der fetalen Membranen, also der Eihäute. Eine Studie aus dem Jahr 2009 nutzte ebenfalls zur qualitativen Analyse die konventionelle PCR mit 16S rDNA Primern sowie zur quantitativen Analyse RT-PCR, um an den Eihäuten die Art der bakteriellen Besiedlung zu identifizieren³⁷. Die Proben wurden unter sterilen Bedingungen nach einer Sectio caesarea oder einer vaginalen Geburt gewonnen, wobei bei letzterer die oberste Schicht des Amnions entfernt wurde, um eine Oberflächenkontamination zu vermeiden³⁷. Die Plazenta wurde im Anschluss zur histopathologischen Untersuchung weitergeleitet³⁷. In 55% der Patientinnen mit PPROM und einer Sectio caesarea konnte bakterielle DNA nachgewiesen werden.

Dies unterschied sich nicht signifikant von der Gruppe, die nach einem PPROM vaginal entband (70%)³⁷. Die am häufigsten identifizierte Spezies war hierbei, wie auch bei Untersuchungen an der Amnionflüssigkeit, *Ureaplasma* spp., genauer *Ureaplasma parvum*. In sich unterscheidender Häufigkeit bei der vaginalen Gruppe und der Sectio caesarea-Gruppe fanden sich ebenfalls *Strep. mitis*, *Fusobacterium* spp., *Strep. agalactiae* und *Ureaplasma urealyticum*³⁷. Die Diversität der Bakterien bei der vaginalen Entbindung war deutlich größer³⁷.

Eine andere Studie aus dem Jahr 2008 untersuchte das Choriongewebe von extrem frühgeborenen Kindern (23. bis 27. SSW) und identifizierte mittels Kultur und PCR oben genannte und weitere Bakterien wie Corynebakterien, Mycoplasmen, Propionibakterien, *Prevotella bivia* etc³⁸.

1.2.3 Pathologie der Plazenta beim Amnioninfektionssyndrom

Makroskopisches Erscheinungsbild (nach Harris, 1988):

Die Frühgeborenen- Plazenta ist kleiner und leichter als eine reife Plazenta. Bei einer lang andauernden intrauterinen Infektion erscheinen die oberflächlichen Membranen gelblich. Der Grund hierfür ist die leukozytäre Invasion des Gewebes. Weiterhin ist es möglich, dass sich die Eihäute nicht glatt und glänzend, sondern eher rau darstellen. Besteht eine Infektion durch anaerobe Bakterien, ist es möglich, dass die Plazenta fötide riecht. Die Ränder der Plazenta können hämorrhagisch unterlaufen imponieren, was einen Hinweis auf eine Deziduitis darstellt³⁹.

Mikroskopisches Erscheinungsbild:

Im Gewebe ist mikroskopisch eine Invasion polymorphkerniger Leukozyten erkennbar. Eosinophile Granulozyten sind vereinzelt in lang andauernden intrauterinen Infektionen nachweisbar. Die Leukozyten wandern aus zwei Bereichen ein: dem intervillösen Raum (maternal) und den fetalen Blutgefäßen. Bis zur 20. Woche erfolgt die Wanderung der Leukozyten ausschließlich aus den maternalen Blutgefäßen hin zum Ort der Entzündung. Sobald das Immunsystem des Fetus in der Lage ist, selbst kompetente Leukozyten zu produzieren, beteiligt sich dieser daran⁴⁰. Im Fall eines ausgeprägten Amnioninfektionssyndroms ist das Epithel des Amnions häufig degeneriert oder nekrotisch⁴¹. Weiterhin treten vereinzelt Thrombosen der Umbilikalgefäße⁴² sowie Thrombosen der Choriongefäße auf. Letztere zeigen sich häufiger bei länger

andauernden Infektionen, beginnend in der Intima der Gefäße nahe des Amnions, und breitet sich kontinuierlich aus⁴³.

Stadieneinteilung

Maternale Stadien:

Tabelle 1: Histologische Stadieneinteilung des maternalen AIS nach Holzman et al. 2007

Stadium	Charakteristika	Beschreibung
1	Wenigstens ein mikroskopisches Sichtfeld mit mehr als 10 polymorphkernigen Leukozyten im subchorialen Fibrin, aber nicht im Chorion oder Amnion	Akute Chorionitis
2	Polymorphkernige Leukozyten im Chorion der Plazenta oder extraplazentaren Chorion mit oder ohne Amnion, aber keine leukozytäre Karyorrhesis oder nekrotisierende Entzündung	Akute Chorioamnionitis
3	Polymorphkernige Leukozyten im Chorion der Plazenta und/oder extraplazentaren Chorion und Amnion mit Karyorrhesis und/oder nekrotisierender Entzündung	Nekrotisierende Chorioamnionitis

Fetale Stadien:

Tabelle 2: Histologische Stadieneinteilung des fetalen AIS nach Holzman et al. 2007

Stadium	Charakteristika
1	Wenigstens ein mikroskopisches Sichtfeld mit polymorphkernigen Leukozyten in den fetalen Gefäßen des Chorions der Plazenta, aber nicht den Umbilikalgefäßen
2	Polymorphkernige Leukozyten in Umbilikalgefäßen, begrenzt auf die Gefäßwand
3	Polymorphkernige Leukozyten in den Umbilikalgefäßen und der Wharton'schen Sulze

Eine weitere Einteilung umfasst den Grad der Infiltration des Gewebes mit polymorphkernigen Leukozyten:

Tabelle 3: Einteilung der Schweregrade des AIS nach Holzman et al. 2007

Grad	Anzahl Leukozyten / mikroskopisches Sichtfeld
1	1 bis 10
2	11 bis 30
3	31 bis 100
4	>100

1.3 Fragestellung

Anhand der erfolgten Einführung und der erläuterten Problematik von Frühgeburten und mikrobiellen Infektionen als wichtigen verursachenden Faktor ergeben sich einige Fragen, deren Beantwortung Ziel der AIS-Studie und dieser Arbeit sind.

1. Wie kann eine kontaminationsarme oder, im besten Fall, kontaminationsfreie Plazenta- und Probenentnahme strukturiert werden?
2. Welche Möglichkeiten gibt es, die erforderlichen Arbeitsschritte einer medizinischen Studie darzustellen und eine einfache Reproduzierbarkeit der Studienergebnisse zu gewährleisten?
3. Zeigen sich überhaupt signifikante Unterschiede zwischen Patientinnen mit AIS und der ausgewählten Kontrollgruppe?
4. Finden sich durch den zusätzlichen Einsatz anderer Nachweismethoden wie der FISH und PCR andere Keimspektren?

2 Methodik

2.1 Studienpopulation und Einschlusskriterien

Es wurde eine prospektive kontrollierte Studie durchgeführt. Der Studieneinschluss sowie die Probenentnahme erfolgten in der Klinik für Geburtsmedizin, Charité Campus Mitte, Berlin. Eine Zustimmung der Ethikkommission der Charité (EA/043/13) zum Studienprotokoll lag vor.

Für die Fallgruppe wurden 25 Patientinnen über einen Zeitraum von 17 Monaten eingeschlossen, die zwischen der vollendeten 24.SSW und vor Vollendung der 37. SSW standen. Diese wurden über das Ziel der Pilotstudie informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Probenentnahme und –untersuchung. Eingeschlossen wurden alle Patientinnen, die in oben genanntem Zeitraum vorzeitige Wehen entwickelten oder einen vorzeitigen Blasensprung aufwiesen sowie per sekundärer Sectio entbanden. Zusätzlich wurden bei der Auswahl die Ergebnisse des Infektlabors, also CRP-Erhöhung und Leukozytose sowie die klinische Symptomatik (Fieber, Tachykardie) der Patientin berücksichtigt. Als Kontrollkollektiv untersuchten wir die Plazenten und Eihäute von 25 Patientinnen, die ohne Komplikationen in der Schwangerschaft nach der 37. SSW per primärer Sectio entbanden.

2.2 Voraussetzungen zur Entwicklung eines Entnahmeprotokolls

Bei der Untersuchung der bakteriellen Kolonisation an Eihäuten und Plazenta besteht die Herausforderung darin, die Proben sicher steril zu gewinnen. Nur so ist gewährleistet, dass diese ohne Kontamination evaluiert werden können. Dies setzt voraus, dass ausschließlich Patientinnen als Probandinnen infrage kommen, die nicht vaginal, sondern per Sectio caesarea entbinden. Somit kann eine Beeinträchtigung der Proben durch die Vaginalflora minimiert werden. Anschließend ist eine weiterführende sterile Behandlung der Plazenta essenziell.

Auch muss die Wahrscheinlichkeit einer Überwucherung der darauf vorkommenden Bakterien bis zum Zeitpunkt der Probenentnahme so gering wie möglich bleiben. Daher ist die Plazenta, nachdem diese sich vom Uterus gelöst hat, in einen sterilen Behälter

zu überführen und anschließend bis zur Probenentnahme kühl zu lagern. Der Zeitraum bis zur Probenentnahme muss so begrenzt wie möglich sein.

Wurde ein Entnahmeprotokoll entwickelt, sollte dieses von allen Akteuren penibel eingehalten werden, damit der Vorteil der detaillierten Ausarbeitung aller Arbeitsschritte nicht verloren geht. Es muss zu jeder Tages- und Nachtzeit und im Rahmen jeder Arbeitsbelastung identisch durchgeführt werden können. Daher wäre es sinnvoll, den Ablauf mit jedem wichtigen Arbeitsschritt grafisch darzustellen.

2.3 Einführung eEPK




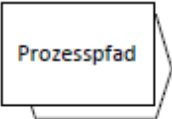


Um die ausgewählten und verwendeten Methoden übersichtlich und verständlich darzulegen, wurde die Darstellung mittels erweiterter ereignisgesteuerter Prozessketten (eEPK) gewählt. eEPK ist eine grafische Modellierungssprache⁴⁴, die ursprünglich zur Darstellung von Ist – und Soll- Zuständen u.a. in Geschäftsprozessen entwickelt wurde. Die relevanten Merkmale der eEPK ist die grafische Darstellung der zu einem Prozess zugehörigen Funktionen und deren zeitlich-logischer Abfolge⁴⁴. Dies gewährleistet in vorliegendem Fall, dass jeder einzelne Schritt des Prozesses der Ergebniserzeugung innerhalb der Studie nachvollzogen werden kann. Dadurch soll jederzeit die externe, experimentelle Überprüfung der ermittelten Resultate ermöglicht werden. Da die gewählte Darstellung in der medizinischen Literatur nicht gebräuchlich ist und daher nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Bedeutung der Diagramme allgemein bekannt ist, folgt eine kurze Einführung in eEPK.

Einer der wesentlichen Vorteile eines eEPK-Modells ist die übersichtliche Darstellung komplexer Strukturen und Abläufe. Hierbei ermöglicht diese eine schnelle, verständliche Sicht über die Gesamtstruktur, die zum raschen Verständnis des Arbeitsprozesses insgesamt beiträgt. Es ist immer ersichtlich, welcher Arbeitsschritt in welchem Ergebnis mündet und welche Organisationseinheit die Verantwortung trägt. Zudem gewährleistet die schrittweise Darstellung, dass jederzeit ersichtlich ist, bei welchem Arbeitsschritt Optimierungen nötig oder zusätzliche Untersuchungen möglich sind. Der Nachteil hierbei ist allerdings auch, dass durch die nötige Abstraktion in Detailfragen Informationen verloren gehen können, die jedoch durch eine ergänzende Erklärung eines beiliegenden Textes wieder zur Verfügung stehen.

Bereits erwähnt wurde das zentrale Merkmal der eEPK, die grafische Darstellung der zu einem Prozess gehörigen Funktionen in zeitlich-logischer Abfolge⁴⁴. Diese Abfolge ist

an bestimmte formale Regeln geknüpft, die sowohl die Art der Darstellung betreffen, als auch die Abfolge der Elemente innerhalb eines Prozesses. Die wesentlichen Elemente, die auch im vorliegenden Fall von zentraler Bedeutung sind, sollen in der folgenden Tabelle erklärt werden.

Tabelle 4: Beschreibung der Notationselemente eines eEPK nach Scheer et al. 1997

Notationselement	Beschreibung
	→Auslöser für eine bestimmte Funktion <u>oder</u> →erreichter Status nach einem Vorgang
	→stellt einen Ablauf oder Auftrag dar →dieser braucht ein vorgelagertes Ereignis, um ein gewünschtes, definiertes Ergebnis zu erzielen →steht immer zwischen zwei Ereignissen
	→Darstellung einer Person oder Gruppe, die für eine Funktion verantwortlich ist
	→ abstrakte Funktion → ähnliches Element wie Funktion; komplexe Handlungsabfolge, die in einem späteren eEKP genauer dargestellt wird → zeigt den Zeitpunkt im Gesamtablauf des Prozesses an
	→ logischer Operator → verbindet Funktionen und Ereignisse → bedeutet „entweder - oder“ → nur eine der Optionen ist möglich
	→ logischer Operator → verbindet Funktionen und Ereignisse → bedeutet „und“ → alle Optionen sind zwingend und existieren parallel



- logischer Operator
- verbindet Funktionen und Ereignisse
- bedeutet „oder“
- mehrere Optionen sind möglich

2.4 Gesamtübersicht der Methodik

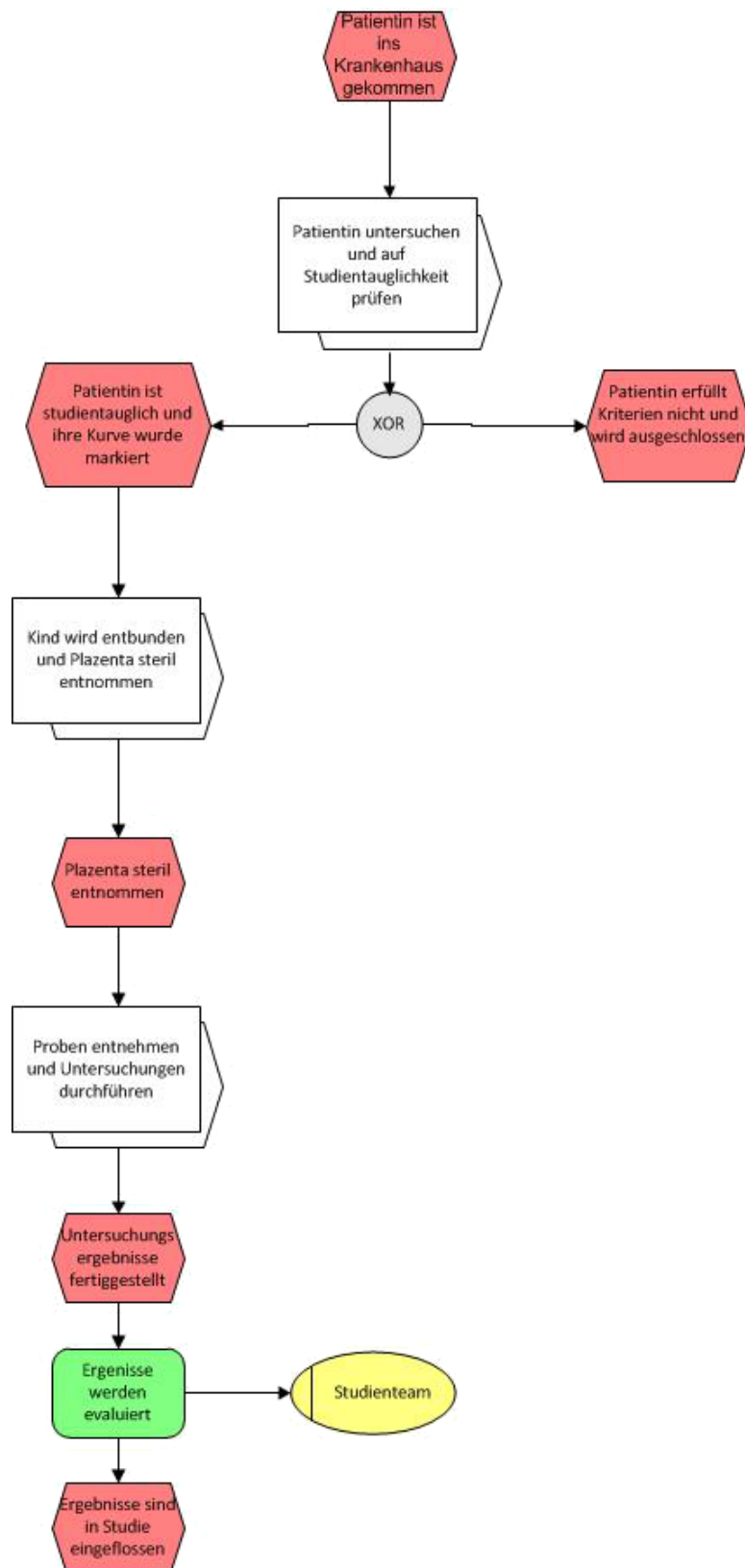


Abbildung 4: Gesamtübersicht der Arbeitsschritte

Abbildung 4 enthält eine Übersicht aller für den Studienablauf erforderlichen Arbeitsschritte. Diese sind sowohl für die Fall- als auch für die Kontrollgruppe gleich. Das Ausgangsereignis ist die Ankunft einer schwangeren Patientin im Krankenhaus. Folgend werden bei ihr Untersuchungen zur Gesundheit und zum Status der Schwangerschaft durchgeführt und entschieden, ob eine stationäre Aufnahme erforderlich ist. Ebenso wird die Eignung der Patientin für das Studienkollektiv überprüft. Im Fall eines Ausschlusses verbleibt die Patientin in der Klinik, wird aber im Zusammenhang mit der Studie nicht weiter betrachtet.

Erfüllt die Patientin die Einschlusskriterien, wird deren Kurve markiert und der klinische Verlauf beobachtet. Tritt der Fall ein, dass die Patientin einer Sectio caesarea unterzogen werden muss, wird das Kind entbunden und die Plazenta steril entnommen und kurzfristig gekühlt verwahrt. Sofern dies erfolgt ist, können Proben und Abstriche unter sterilen Bedingungen entnommen und anschließend an die untersuchenden Institutionen verschickt werden. Sind die Untersuchungsergebnisse fertiggestellt, werden diese durch das Studienteam evaluiert und die Ergebnisse fließen in die Studie ein.

2.5 Auswahl der Patientinnen

2.5.1 Auswahl der Patientinnen der AIS-Gruppe

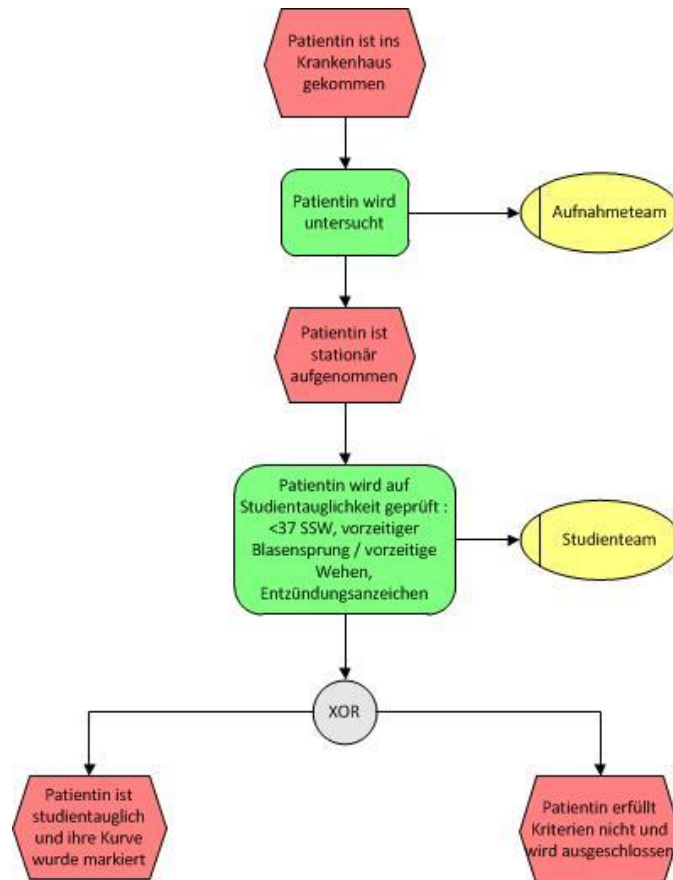


Abbildung 5: Auswahl der Studienpatientinnen des Fallkollektivs

Abbildung 5 beschreibt die notwendigen Schritte zur Auswahl der geeigneten Studienteilnehmerinnen.

Erreicht eine Patientin die Aufnahme des Kreißsaals, wird diese vom Aufnahmeteam untersucht, welches aus Hebammen und Ärzten des an der Studie beteiligten Krankenhauses besteht. Anhand der erhobenen Untersuchungsergebnisse entscheidet sich, ob die Patientin stationär aufgenommen wird. Ist dies der Fall, prüft das Studienteam der AIS-Studie, bestehend aus einer Doktorandin(I.S.), einer Assistenzärztin(D.vS.) und einer Oberärztin(A.T.), die erhobenen Daten der Patientin. Liegt die Schwangerschaftsdauer unter der 37. SSW, sind ein vorzeitiger Blasensprung oder vorzeitige Wehen ursächlich für die Aufnahme und bestehen anhand eines angeforderten Blutbildes Anzeichen einer unspezifischen Entzündung, ist die Patientin für die Studie geeignet. Daraufhin wird die Kurve der Patientin mit einer Markierung versehen, die die betreuende Hebamme auffordert, das Studienteam im Fall einer

Sectio caesarea zu benachrichtigen. Treffen die oben genannten Kriterien nicht zu, wird die Patientin von der Studie ausgeschlossen.

2.5.2 Auswahl der Patientinnen der Kontrollgruppe

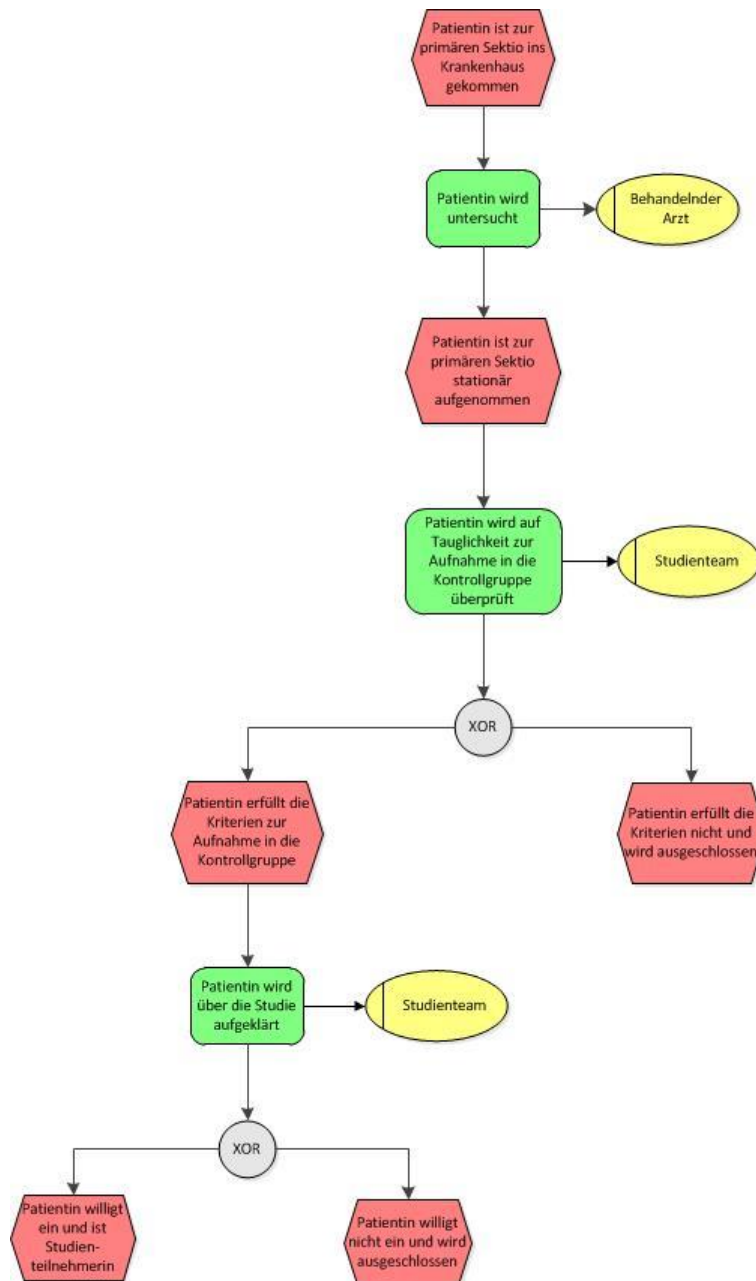


Abbildung 6: Auswahl der Studienpatientinnen der Kontrollgruppe

Abbildung 6 zeigt den Arbeitsablauf zur Akquirierung der Kontrollpatientinnen. Diese erscheinen zur Durchführung einer primären Sectio am Tag der geplanten Entbindung und werden vom behandelnden Arzt, der meist auch die Operation durchführen wird, untersucht. Wurde die Patientin stationär aufgenommen, überprüft das Studienteam, ob ein unauffälliger Schwangerschaftsverlauf vorlag und die Patientin die

37. Schwangerschaftswoche vollendet hat und somit das Kind nicht mehr zu den Frühgeborenen nach WHO-Klassifikation zählt. Erfüllt die Patientin die Kriterien nicht, wird sie von der Studie ausgeschlossen. Erfüllt die Patientin die Kriterien, wendet sich vor der Entbindung ein Mitglied des Studienteams an die Patientin und klärt sie über Ziele und Ablauf der Studie auf. Stimmt sie der Teilnahme zu, wird sie in die Studie eingeschlossen und der Arbeitsablauf ist ab sofort der gleiche wie der der AIS-Gruppe. Willigt die Patientin nicht in die Teilnahme ein, wird sie von der Studie ausgeschlossen.

2.6 Arbeitsablauf der Probenakquise

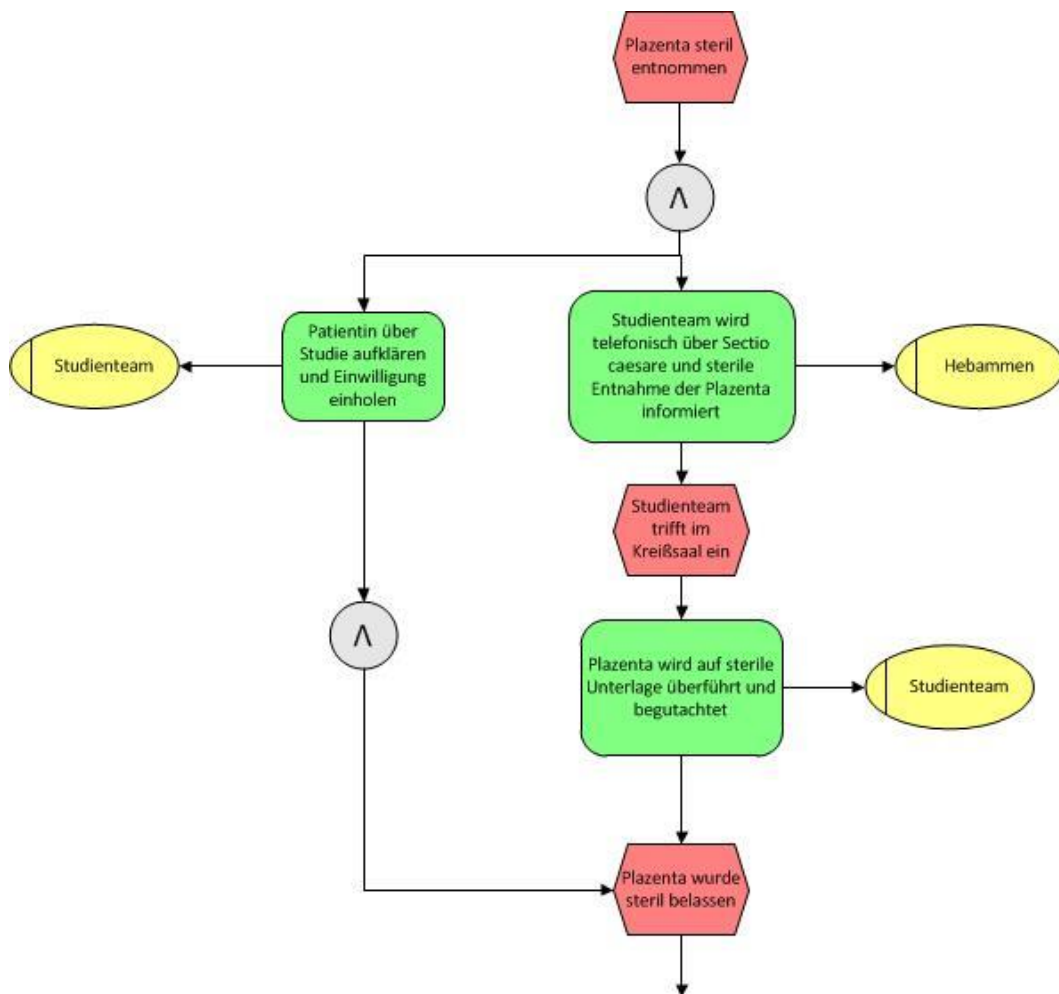


Abbildung 7: Probenakquise Teil 1

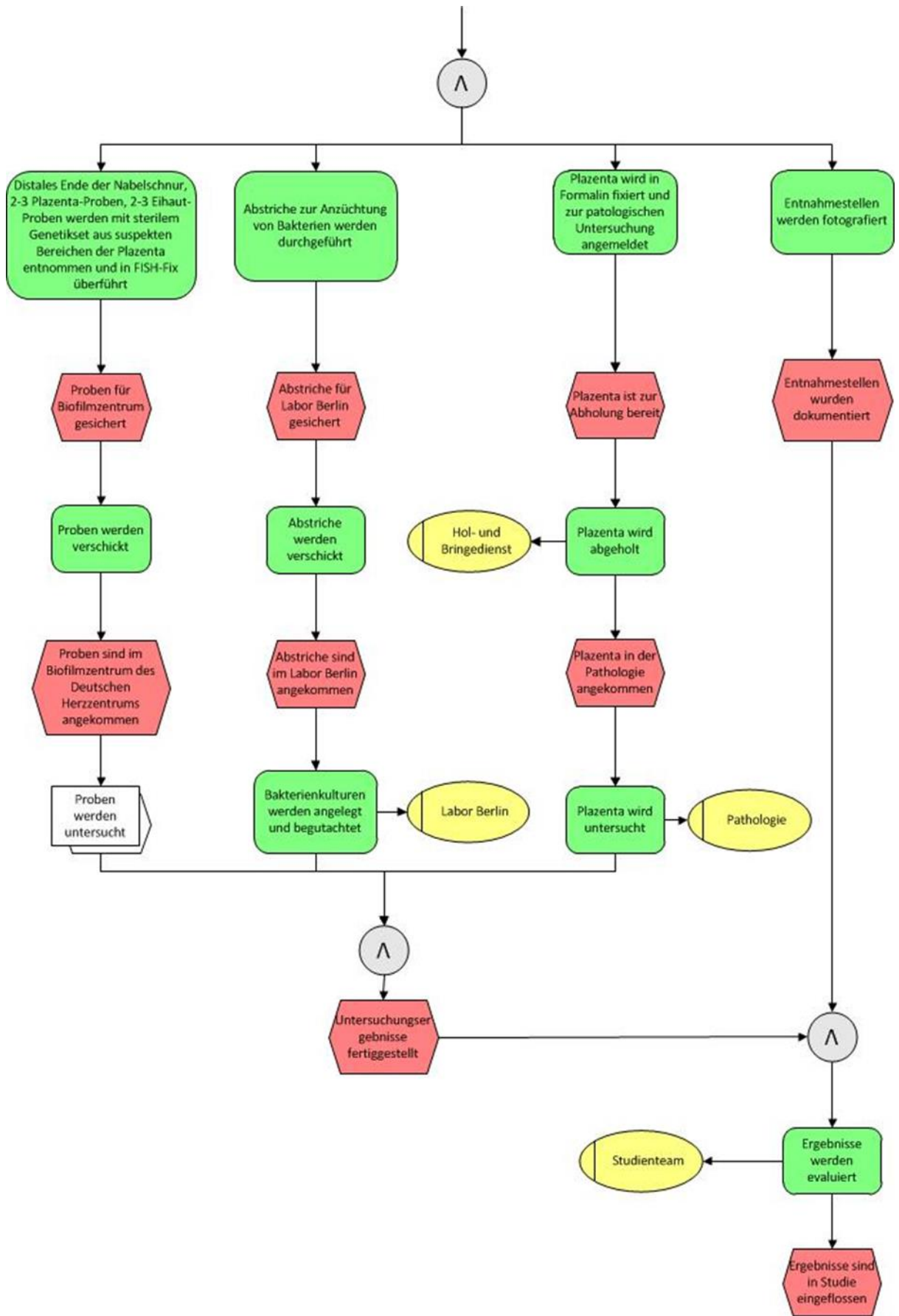


Abbildung 8: Probenaufnahme Teil 2

Abbildung 7 und 8 stellen die Arbeitsabläufe zur Probengewinnung dar. Die sterile Entnahme erfolgte in Rahmen des normalen Operationsablaufes nach der Abnabelung des Säuglings. Die Plazenta wurde nach der Lösung, wobei bestenfalls auf eine manuelle Lösung verzichtet wurde, entnommen und in ein steriles Aufbewahrungsbehältnis gelegt und dieses verschlossen. Anschließend verblieb die Plazenta bis zum Zeitpunkt der Probenentnahme bei 4°C gekühlt im Kreißsaal.

Wurde die Plazenta erfolgreich steril entnommen, informieren die Hebammen telefonisch das Studienteam über die sekundäre Sectio und die erfolgreiche Entnahme. Die Patientin wird über den Zweck der Studie aufgeklärt und ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme eingeholt. Dies erfolgt durch ein Mitglied des Studienteams. Anschließend wird die Plazenta auf eine sterile Unterlage überführt und makroskopisch auf Auffälligkeiten untersucht. Während dieses Arbeitsschrittes werden die Probenentnahmestellen festgelegt. Da vornehmlich die Eihäute als äußere Schutzbarriere des Kindes zu untersuchen sind, werden die Proben bei einer makroskopisch unauffälligen Plazenta verteilt entnommen, aus mindestens drei deutlich räumlich voneinander getrennten Abschnitten. Erscheint ein Bereich suspekt, also deutlich rauer und weniger glänzend bzw. gelblich-grünlich belegt, wird mindestens eine Probe dort entnommen. Die Auswahl der Entnahmestellen der Plazenta erfolgt nach dem gleichen Schema, wobei an der Plazenta weniger Proben untersucht werden.

Im Verlauf des gesamten Arbeitsablaufes bleibt die Plazenta steril, da in einem separaten Raum ausschließlich mit sterilen Handschuhen, Mund- und Haarschutz sowie mit sterilen Entnahmesets, bestehend aus einer Schere und Pinzette, gearbeitet wird. Abbildung 9 und 10 stellen exemplarisch die Probenentnahmestellen sowie deren Markierung nach Abschluss der sterilen Arbeitsschritte dar. I, II und III markieren die Entnahmestellen der Eihaut, die gezielte räumliche Verteilung der Entnahmestellen ist erkennbar.

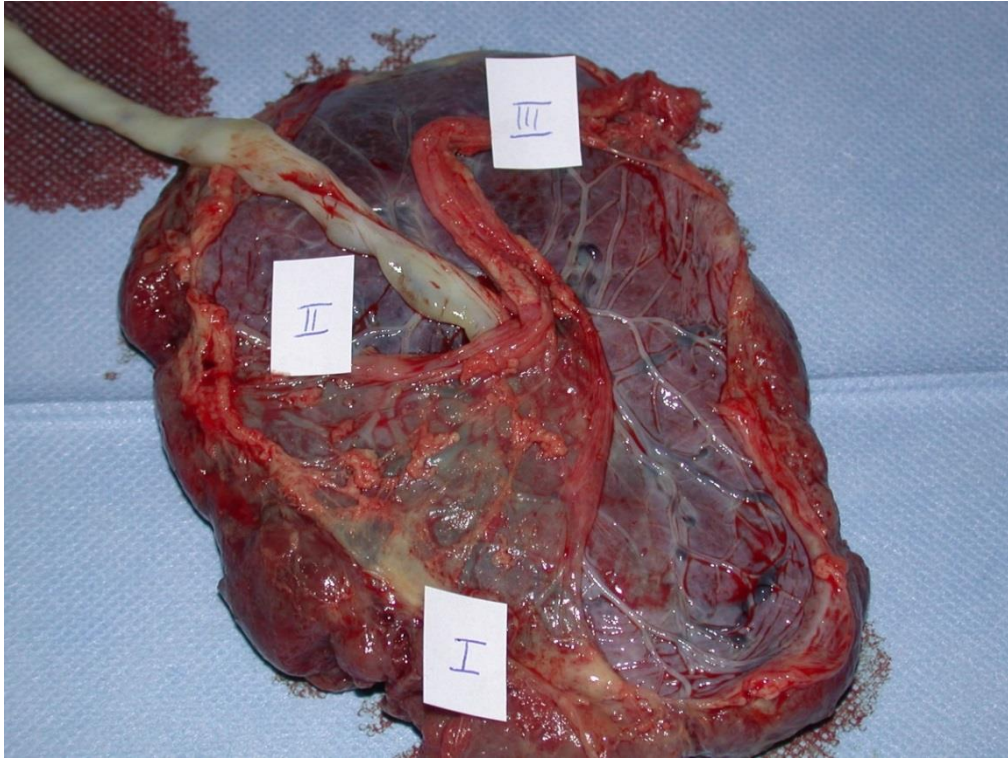


Abbildung 9: Markierte Probenentnahmestellen an Eihaut

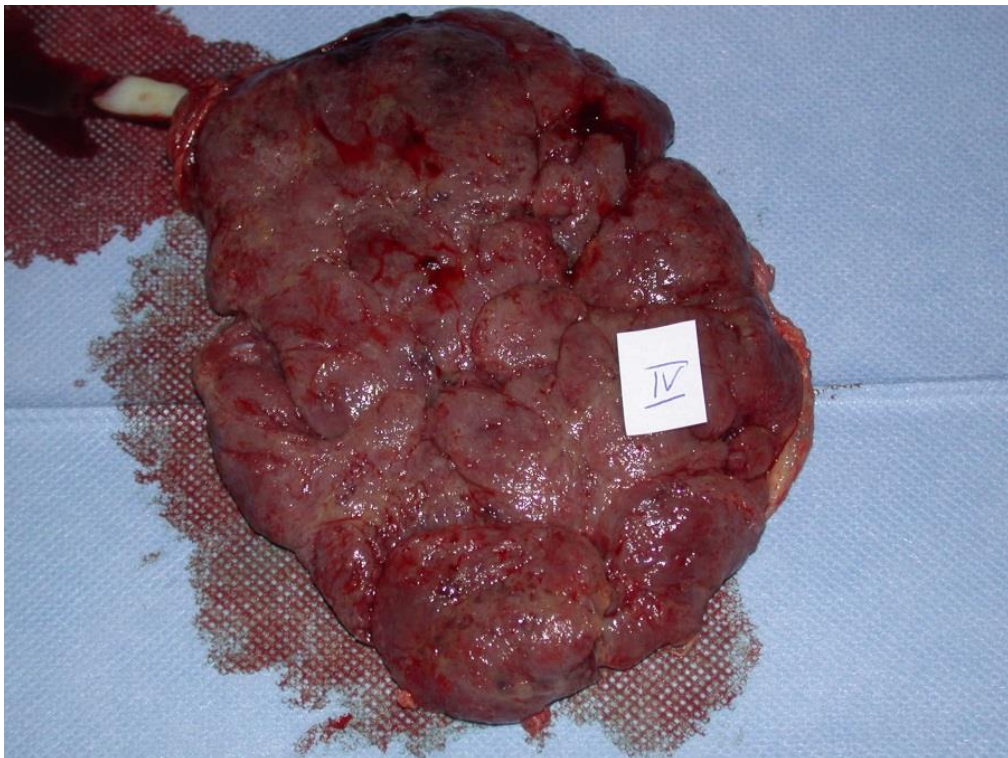


Abbildung 10: Markierte Probenentnahmestellen des Plazentagewebes

Markierung IV kennzeichnet die Entnahmestelle des placentaren Gewebes.

Folgende Proben werden zur weiterführenden Untersuchung im Biofilmzentrum entnommen:

1. das distale Ende der Nabelschnur
2. Proben der Eihäute aus suspekten Bereichen und/oder gleichmäßig verteilt
3. Proben der Plazenta aus suspekten Bereichen und/oder gleichmäßig verteilt

Diese werden in separate Falcon-Tubes mit FISH-Fixierlösung, bestehend aus Formaldehyd und Ethanol, überführt. Sie müssen bis zur Untersuchung im Biofilmzentrum des Deutschen Herzzentrums bei 4°C gekühlt gelagert werden. Anschließend wird ein Abstrich auf Bakterien, Erreger und Resistenz und ein Abstrich auf *Chlamydia trachomatis* durchgeführt. Sobald diese Arbeitsschritte abgeschlossen sind, werden die Entnahmestellen der Eihaut- und Plazentaprobe nummeriert und fotodokumentiert. Die Plazenta ist in einen Transportbehälter zu überführen, mit 4%iger Formaldehydlösung zu fixieren und zur pathologischen Untersuchung anzumelden.

Sind die Proben, Abstriche und die Plazenta selbst gesichert und für den Transport vorbereitet, werden diese verschickt. Die Proben in FISH-Fix werden in das Biofilmzentrum des Deutschen Herzzentrums versandt, die Abstriche gelangen in das Labor Berlin und die Plazenta wird vom Hol- und Bringedienst der Charité in die Pathologie transportiert.

Im Biofilmzentrum werden die Proben mittels PCR und FISH untersucht, deren Arbeitsschritte in einem nachfolgenden Abschnitt detailliert dargelegt werden. Das Labor Berlin legt Bakterienkulturen an und begutachtet diese entsprechend Verfahren der Routinediagnostik. Das Institut für Pathologie der Charité fertigt Paraffinschnitte der Plazenta und Eihäute an und beurteilt diese im Hinblick auf ein abgelaufenes Entzündungsgeschehen.

Sind alle Untersuchungsergebnisse fertiggestellt, werden diese vom AIS-Studententeam evaluiert und fließen in die Studie ein. Dieses Protokoll durchliefen in seiner Gesamtheit sowohl die Plazenten der Fall-, als auch der Kontrollgruppe.

2.7 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Visualisierung von Mikroorganismen

Die FISH ist ein wertvolles diagnostisches Hilfsmittel zur Sichtbarmachung von Mikroorganismen auf Oberflächen und im Gewebe. Mittels fluoreszenzmarkierter Sonden ist es möglich, intakte Zellen zu detektieren und, je nach Spezifität der Sonde, eindeutig einer Spezies zuzuordnen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Sonden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen versehen werden können und dadurch auf einer Probe mehrere Ziele innerhalb eines Hybridisierungsvorganges markiert werden. Eine typische Oligonukleotid-FISH-Sonde besteht aus 15 bis 30 Basenpaaren und ist in ihrer Beschaffenheit abhängig von den Anforderungen an Spezifität, Sensitivität und der Penetrationsfähigkeit des Gewebes⁸. Die schnellste und einfachste Methode ist die direkte Markierung der Sonden mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Hierbei werden an das 5'-Ende einer Oligonukleotidsequenz die Farbstoffe befestigt. Im Fall dieser Studie handelte es sich um Fluorescein-5-Isothiocyanat (FITC). Das übliche Ziel einer FISH-Sonde ist die 16S rRNA, da diese ein phylogenetischer Marker ist und eine große Anzahl an Kopien in den Zellen vorliegt⁴⁵.



Abbildung 11: Arbeitsschritte der FISH-Diagnostik

Abbildung 11 zeigt die Arbeitsabläufe einer typischen FISH-Prozedur. Folgende Schritte sind hierbei notwendig, um ein verwertbares Ergebnis zu erzielen:

1. Fixierung der Mikroorganismen
2. Vorbereitung der Probe, einschließlich notwendiger Vorbehandlungen
3. Hybridisierung mit den passenden Sonden, um die richtigen Zielsequenzen zu erreichen
4. Waschen der Proben, um ungebundene Sonden zu entfernen
5. Fixierung, Visualisierung und Dokumentation der Ergebnisse⁸

Die entnommenen Proben bleiben für mindestens 24 Stunden im FISH-Fix und werden anschließend in Methacrylat eingebettet und geschnitten. Um eine erfolgreiche Hybridisierung durchführen zu können, ist es im Hinblick auf Gram-positive Bakterien notwendig, eine Vorbehandlung durchzuführen. Diese ermöglicht das Vordringen der FISH-Sonde zur 16S rRNA. Für Streptokokken und Enterokokken wird Lysozym verwendet, bei Staphylokokken ist zusätzlich Lysostaphin notwendig⁸.

20µl vorgewärmte Hybridisierungslösung, gemischt mit 5 pmol der jeweiligen benötigten Oligonucleotidsonde, werden auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Die standardmäßig verwendeten Sonden im vorliegenden Fall stellt folgende Tabelle dar:

Tabelle 5: Standardsondenset zur FISH-Diagnostik beim AIS

Oligonucleotidsonde	Darstellung von
EUB338 ⁴⁶	Eubakterien
NonEUB ⁴⁷	Nonsense Sonde
STAPHY ⁴⁸	<i>Staphylococcus</i> spp.
SAU ⁴⁹	<i>S. aureus</i>
STREP1 ⁴⁸	<i>Streptococcus</i> spp. (außer durch STREP 2 erfasste)
STREP2 ⁵⁰	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. mitis</i> -Gruppe

EUB338 bindet an einen Großteil der bekannten Bakterienarten und beweist in den vorliegenden Fällen eine gelungene Hybridisierung. Die gleichzeitige Verwendung von NonEUB als Nonsense-Sonde, die keine Bindungsstelle in bekannten Bakterienarten aufweist, hilft, eine unspezifische Bindung der genutzten Sonden an organisches Material auszuschließen⁵¹.

Besteht aufgrund von mikrobiologischen Voruntersuchungen der Verdacht auf eine anderweitige Besiedlung der Proben, werden folgende FISH-Sonden zusätzlich appliziert:

Tabelle 6: Spezifische Sonden zur weiterführenden Diagnostik

Oligonucleotidsonde	Darstellung von
EFAEC ⁵²	<i>E. faecalis</i> , <i>E. sulfureus</i> , <i>Granulicatella</i> spp.
ENCO ⁵⁰	<i>Enterococcus</i> spp. ohne <i>E. faecalis</i>
FUNU ⁵³	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>F. periodonticum</i> , <i>F. naviforme</i> , <i>F. canefelinum</i>
BAC303 ⁵⁴	Bacteroidaceae, Prevotellaceae, einige Porphyromonadaceae
LAB759 ⁵⁵	<i>Lactobacillus</i> spp., Ruminococcaceae, <i>Pediococcus</i> spp.

Nach einer zweistündigen Inkubation in einer dunklen, humiden Kammer bei 49°C werden die Schnitte mit Wasser abgespült, um nicht gebundene Sonden zu entfernen. Folgend werden die Schnitte getrocknet und fixiert. Die Fixierung erfolgt mit einem DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) enthaltenden Medium. DAPI bindet an Adenin-Thymin-Bereiche doppelsträngiger DNA und weist eine blaue Fluoreszenz auf. Dies erleichtert die Orientierung im Gewebe und stellt unspezifisch bakterielle DNA dar.

Anschließend wird ein Epifluoreszenzmikroskop verwendet, um die bearbeiteten Schnitte zu untersuchen und die bakterielle Besiedlung einzuschätzen. Auch hier werden zur Dokumentation Fotografien angefertigt.

2.8 PCR als Hilfsmittel zur Detektion von Mikroorganismen

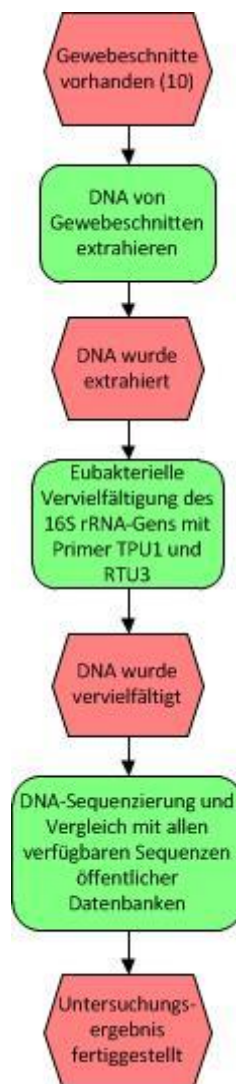


Abbildung 12: PCR beim Amnioninfektionssyndrom

Abbildung 12 beschreibt die Extraktion und weitere Bearbeitung bakterieller DNA zur Identifikation der auf den Eihaut- und Plazentaprobe existenten Mikroorganismen der Studienpatientinnen.

Um eine ausreichende Menge DNA zu extrahieren, werden zehn Gewebeschnitte verwendet, die aus einer in Methacrylat eingebetteten Probe entstanden sind. Wurde die nötige Menge extrahiert, findet mithilfe der PCR die eubakterielle Vervielfältigung des 16S rRNA-Gens unter Verwendung der Primer TPU1 und RTU3 statt⁵⁶. Auf eine detaillierte Beschreibung der Arbeitsschritte einer PCR wird hierbei verzichtet und auf die aktuelle Literatur verwiesen.

Nach Abschluss der PCR ist eine ausreichende Menge DNA vorhanden, um diese sequenzieren zu können. Die DNA-Sequenzierung ist ein vollautomatischer

Arbeitsschritt, an welchen sich der Vergleich der ermittelten Sequenzen unter Verwendung öffentlicher Datenbanken (Genbank, EMBL) anschließt. Konnte diese eine oder mehrere Spezies ermitteln, werden die Ergebnisse dokumentiert und gemeinsam mit den Ergebnissen der FISH an das Studienteam der AIS-Studie weitergeleitet.

2.9 Auswertung der Daten

Die statistische und grafische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mittels IBM SPSS Statistics Version 22.0.0.0 von 2013.

3 Ergebnisse

3.1 Standardisiertes Entnahmeprotokoll

Neben der Auswertung und den Erkenntnissen der erhobenen Daten und Informationen aus verschiedenen molekularbiologischen Techniken ist als ein großes Ergebnis der Studie das standardisierte Entnahmeprotokoll zu werten. Dieses ist auf andere Studien, die sich mit Mikroorganismen und Schwangerschaft beschäftigen, übertragbar.

3.1.1 Kontaminationsarme Probenentnahme

Das erste Ziel dieser Studie stellte die Strukturierung einer kontaminationsarmen bzw. kontaminationsfreien Probenentnahme dar. Die durchgehend sterile Handhabung der Plazenta von Beginn der interventionellen klinischen Maßnahmen bis zum Ende der Probenentnahme ist die grundlegende Voraussetzung des entwickelten Arbeitsablaufes. Jede durchgeführte Maßnahme zur Probengewinnung wurde dieser Bedingung untergeordnet. Aufgrund der Ergebnisse der molekularbiologischen Diagnostik der Kontrollgruppe konnte eine Kontaminationsfreiheit der gewonnenen Proben erreicht werden.

3.1.2 Eindeutige Darstellung der erforderlichen Arbeitsschritte

Die Entwicklung des Entnahmeprotokolls und seiner grafischen Darstellung zum besseren Verständnis und einheitlichen Handlungsabfolge war Teil des Anfangsprozesses und Voraussetzung zur erfolgreichen Weiterführung der durchgeführten Studie. Im Rahmen der Literaturrecherche in der Planungsphase ergab sich ein breites Spektrum angewandter Techniken zur Probengewinnung in anderen Studien, die häufig nicht zweifelsfrei eine postpartale Kontamination der Proben ausschließen konnten.

Das Ergebnis der Entwicklungsarbeit ist ein standardisiertes Entnahmeprotokoll, das in jedem Kreißsaal durchgeführt werden kann und aufgrund seiner grafischen Darstellung in Form eines eEPK leicht nachzuvollziehen ist.

3.2 Charakteristik der Studienpopulationen

3.2.1 Allgemeine Daten der Fallgruppe

Die Patientinnen der Fallgruppe wurden nach den oben genannten Kriterien ausgewählt und in die Studie eingeschlossen.

Der errechnete Mittelwert des Alters dieser Gruppe beträgt $32,36 \pm 6,36$ Jahre. Das durchschnittliche Gestationsalter der Feten bei Entbindung beträgt $211,04 \pm 19,83$ Tage. Die Dauer des stationären Aufenthaltes in der Gruppe der AIS-Patientinnen beläuft sich im Mittel auf $21,92 \pm 15,53$ Tage und beinhaltet auch die Zeit, die vor der Entbindung stationär in der Klinik verbracht wurde.

Die betrachteten Patientinnen wiesen im Mittel $2,68 \pm 1,46$ Graviditäten und $2 \pm 1,29$ Paritäten auf. Eingeschlossen wurden 8 Geminigraviditäten.

3.2.2 Allgemeine Daten der Kontrollgruppe

Die Patientinnen der Kontrollgruppe wurden nach oben genanntem Schema ausgewählt und in die Studie aufgenommen.

Das durchschnittliche Alter der Patientinnen beträgt $32,48 \pm 5,77$ Jahre und die Entbindung des Feten per primärer Sectio erfolgte nach $271 \pm 7,66$ Gestationstagen. Nach einem im Mittel $4,16 \pm 0,99$ Tagen dauernden stationären Aufenthalts konnten die Patientinnen nach Hause entlassen werden. Die eingeschlossenen Patientinnen wiesen $2,92 \pm 1,73$ Graviditäten und $2,2 \pm 1,15$ Paritäten auf. Es wurden keine Geminigraviditäten untersucht.

3.2.3 Vergleich der Fall- und Kontrollgruppe

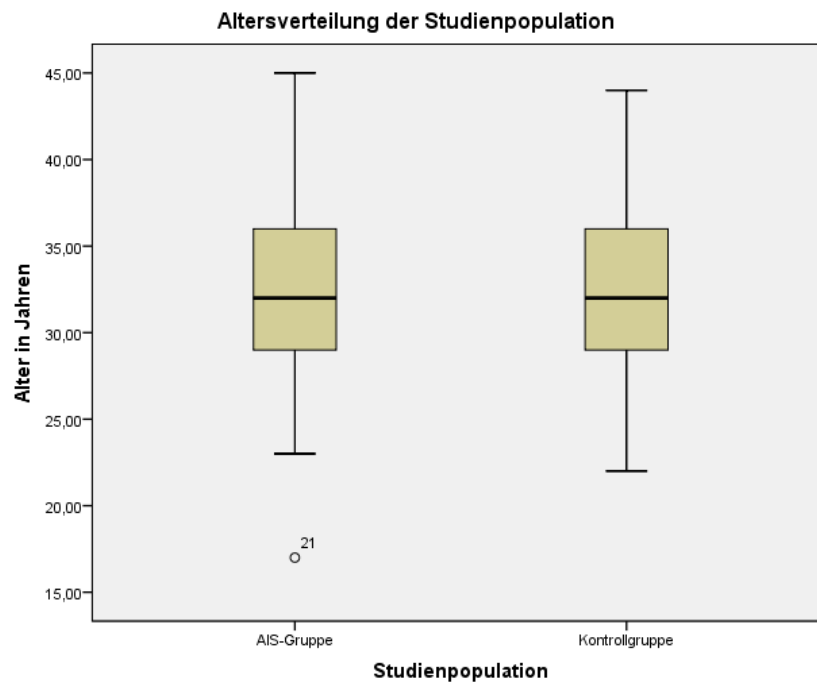


Abbildung 13: Altersverteilung in AIS- und Kontrollgruppe

Anhand der Charakteristika der beiden Populationen der Studie ist erkennbar, dass sich die Patientinnen hinsichtlich des Alters nicht signifikant unterscheiden ($p=0,945$ bei einem Signifikanzniveau von $p<0,05$) und daher kein Unterschied bezüglich des mittleren Alters der Gruppen besteht. Abbildung 13 verdeutlicht diesen Befund. Somit sind die Voraussetzungen der verglichenen Patientinnengruppen die gleichen.

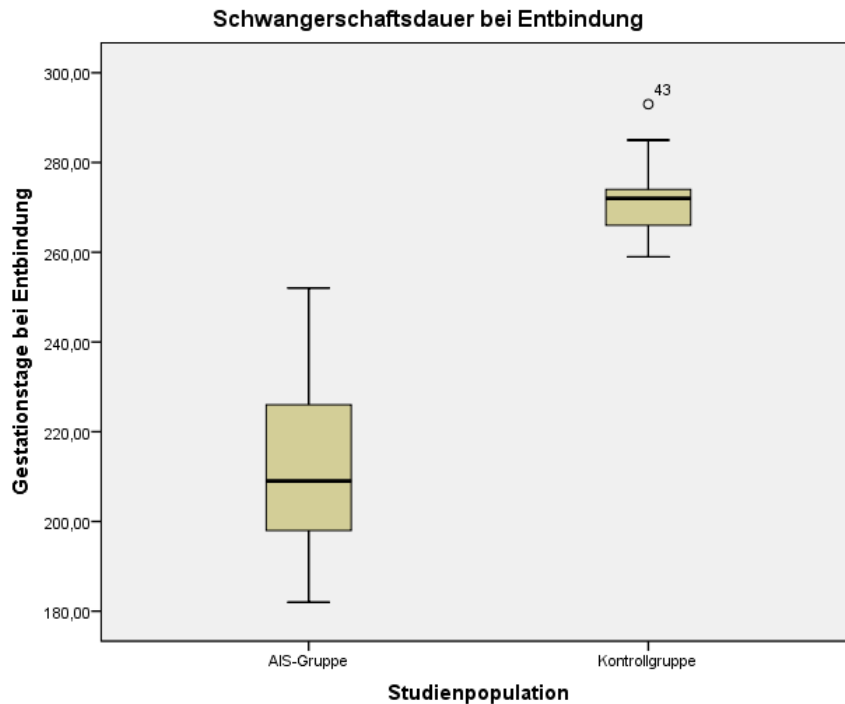


Abbildung 14: Gestationsalter im Vergleich bei AIS- und Kontrollgruppe

Die durchschnittliche Dauer der Schwangerschaft bis zur Entbindung unterscheidet sich signifikant ($p=0,00$) zwischen den Gruppen, diesen Zusammenhang visualisiert Abbildung 14. Während die mittlere Schwangerschaftsdauer in der AIS-Gruppe bei 211 Tagen liegt, dauert die Schwangerschaft in der Kontrollgruppe im Mittel 60 Tage länger, daher 271 Tage.

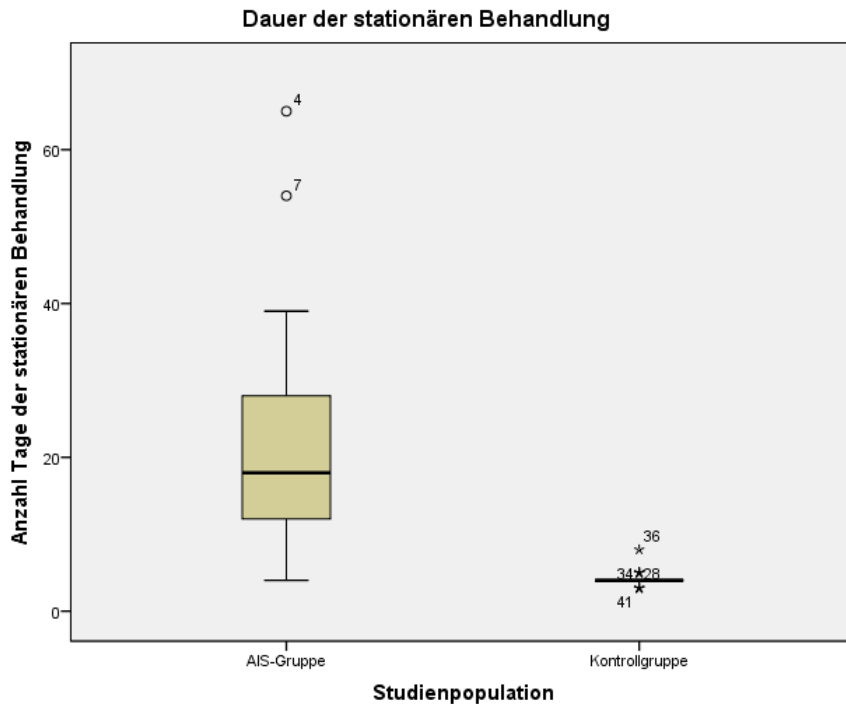


Abbildung 15: Dauer der stationären Behandlung im Vergleich bei AIS- und Kontrollgruppe

Erwartungsgemäß besteht ein signifikanter Unterschied ($p= 0,00$) bei der Dauer des stationären Aufenthaltes zwischen den Populationen, erkennbar in Abbildung 15, da es sich bei der Kontrollgruppe um Patientinnen handelt, die unter geplanten Bedingungen ihr Kind entbanden und keine postpartalen Komplikationen aufwiesen. Die Patientinnen der AIS-Gruppe hingegen befanden sich prä- und postpartal eindeutig länger in stationärer Behandlung.

Ergebnis:

Anhand der oben genannten Vergleiche zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen Patientinnen mit AIS und der ausgewählten Kontrollgruppe. Bei gleicher Altersstruktur unterscheiden sich die Gruppen in der mittleren Schwangerschaftsdauer sowie der Dauer der stationären Behandlung.

3.3 Präpartal und peripartal erfasste Daten der Fallgruppe

3.3.1 Aufnahme und stationärer Verlauf

Häufigkeitsverteilung der Schwangerschaftswoche bei Aufnahme nach WHO-Kriterien für Frühgeburtlichkeit (AIS-Gruppe)

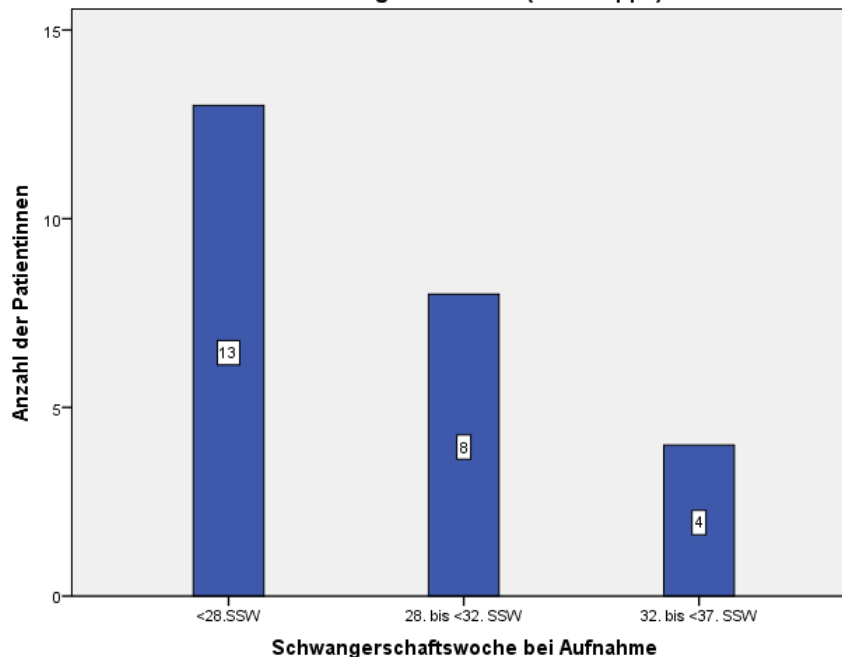


Abbildung 16: Verteilung der Patientinnen bei Aufnahme nach Schwangerschaftswoche

Die Patientinnen der Fallgruppe wurden überwiegend vor der 32. Schwangerschaftswoche stationär aufgenommen, welches Abbildung 16 darlegt. Die Einleitung supportiver Maßnahmen stand im Rahmen der klinischen Versorgung zur Verhinderung einer extremen Frühgeburt (< 28. SSW) oder sehr frühen Frühgeburt (28. bis <32. Schwangerschaftswoche) im Vordergrund. Es wurden alle Möglichkeiten zum Fortbestehen der Schwangerschaften getroffen, solange sie nicht das Leben der Mutter gefährdeten.

Häufigkeitsverteilung der Schwangerschaftswoche bei Entbindung nach WHO-Kriterien für Frühgeburtlichkeit

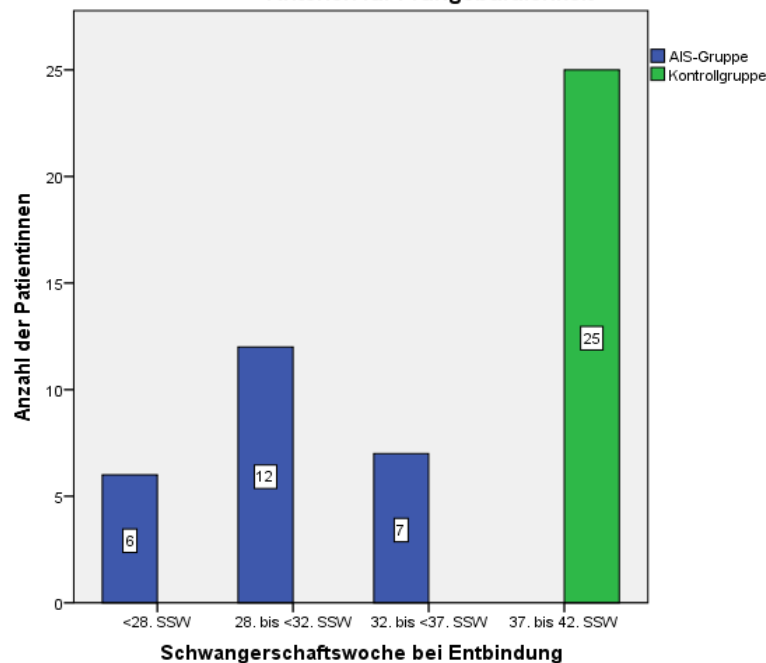


Abbildung 17: Darstellung der Schwangerschaftswoche bei Entbindung, eingeordnet nach WHO-Kriterien zu Frühgeburtlichkeit und Studiengruppe

Fallgruppe:

Im weiteren Verlauf verschlechterten sich der maternale und fetale Allgemeinzustand bei den Patientinnen der AIS-Gruppe, sodass die Entscheidung zur sekundären Sectio getroffen werden musste. Abbildung 16 und 17 zeigen die Veränderung der Schwangerschaftsdauer von der Aufnahme bis zur Entbindung. Entbunden wurden die Kinder zum Zeitpunkt der sehr früh Geborenen (28.-32. SSW), obwohl die Mehrheit der Mütter mit einem, die Schwangerschaft gefährdenden Problem zum Zeitpunkt der extrem Frühgeborenen (<28.SSW) aufgenommen wurden. Dies führt zu verbesserten gesundheitlichen Chancen für das Neugeborene. Eine der getroffenen Maßnahmen bei Aufnahme war die Gabe einer kalkulierten Antibiotikatherapie mit Cefuroxim/Metronidazol. Diese erhielten 92% der eingeschlossenen Patientinnen meist nach der Entnahme von Abstrichen zur kulturellen Erregerdiagnostik. In 64% der Fälle konnte so vor der Entbindung eine bakterielle Besiedlung der Vagina oder Zervix nachgewiesen werden, die in Tabelle 7 erfasst ist. Somit war in mehr als der Hälfte der Fälle eine bakterielle Infektion der schwangerschaftsbedrohende Faktor.

Kontrollgruppe:

Im Gegensatz dazu wurden alle Kinder der Kontrollgruppe unter kontrollierten Bedingungen ohne Komplikationen nach der 37. Schwangerschaftswoche entbunden.

Tabelle 7: Kulturell erfasste mikrobielle Besiedlung vor der Entbindung

Nachgewiesene Besiedlung	Anzahl der Fälle (Dopplung möglich)
<i>Escheria coli</i>	8 (davon 1 ESBL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
Sprosspilze	3 (davon 1 ausschließliche Sprosspilze)
B-Streptokokken	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
<i>Citrobacter koseri</i>	1
<i>Enterobacter cloacea</i>	1
Koagulase-negative Staphylokokken	1

3.3.2 Entbindung

Die Entbindung aller Patientinnen der AIS- Gruppe erfolgte laut Methodenprotokoll als sekundäre Sectio. Im Schwangerschaftsverlauf der Patientinnen ereignete sich in 80% ein vorzeitiger Blasensprung, in 12% vorzeitige Wehen und in 8% eine Zervixreifung oder –insuffizienz.

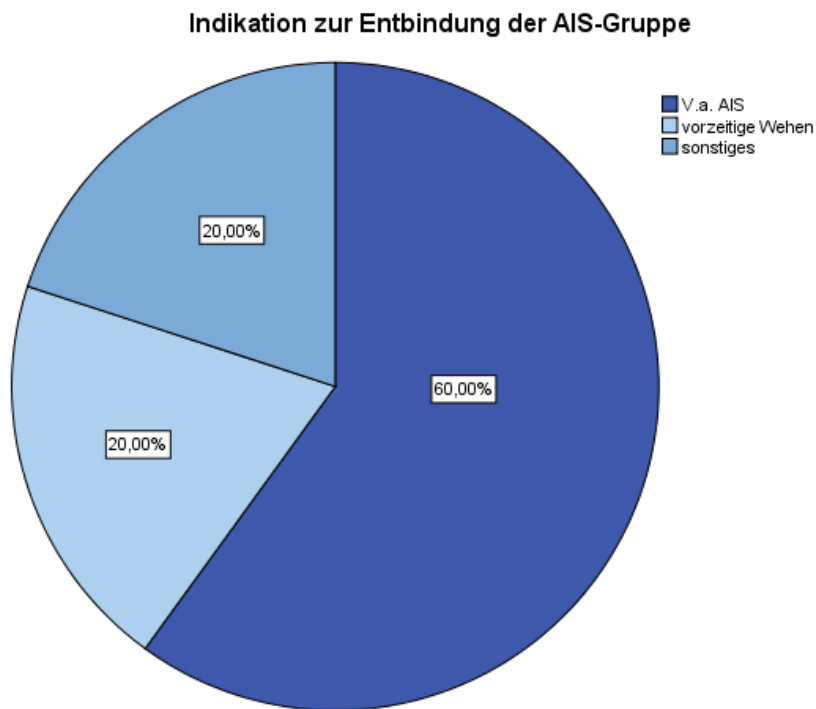


Abbildung 18: Indikationen zur Entbindung

Abbildung 18 demonstriert die Hauptursachen, die nach einer gründlichen Evaluierung der individuellen Situation die behandelnden Ärzte zu einer sekundären Sectio bewegen haben. Trotz der Häufigkeit eines vorzeitigen Blasensprungs von 80% ergaben sich nur bei 60% der Patientinnen klinische Anhaltspunkte für ein AIS. In 20% der Fälle waren therapieresistente Wehen die Hauptursache für eine Sectio, unter den Punkt „sonstiges“ fallen vorzeitige Plazentalösung, grünes Fruchtwasser und pathologisches CTG. In diesen Fällen konnte weder histopathologisch noch im postpartalen Abstrich, der FISH oder der PCR ein AIS nachgewiesen werden.

3.4 Postpartale Untersuchungsergebnisse von Plazenta und Eihaut

3.4.1 Abstrich

Die Abstrichentnahme der Fallgruppe erfolgte präpartal durch die untersuchenden Ärzte des Aufnahmeteam vaginal, zervikal und rektal sowie nach Bedarf im Verlauf des stationären Aufenthalts. Die Abstriche wurden im Labor Berlin analysiert. Nach der Entbindung wurden, dem Studienprotokoll entsprechend, Abstriche von Plazenta und Eihaut entnommen und ebenfalls im Labor Berlin untersucht.

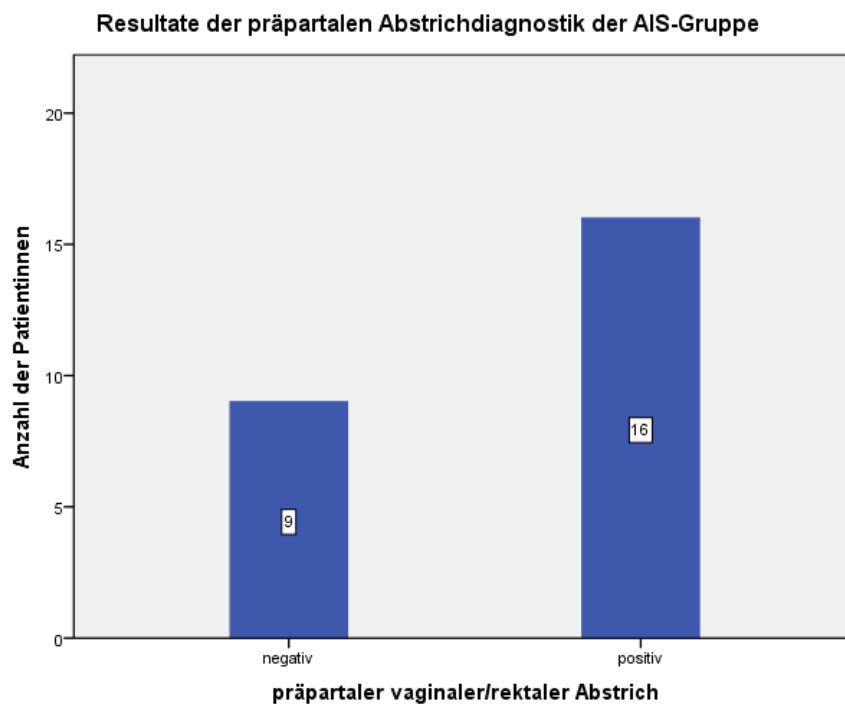


Abbildung 19: Ergebnisse der präpartalen kulturellen Diagnostik der AIS-Gruppe

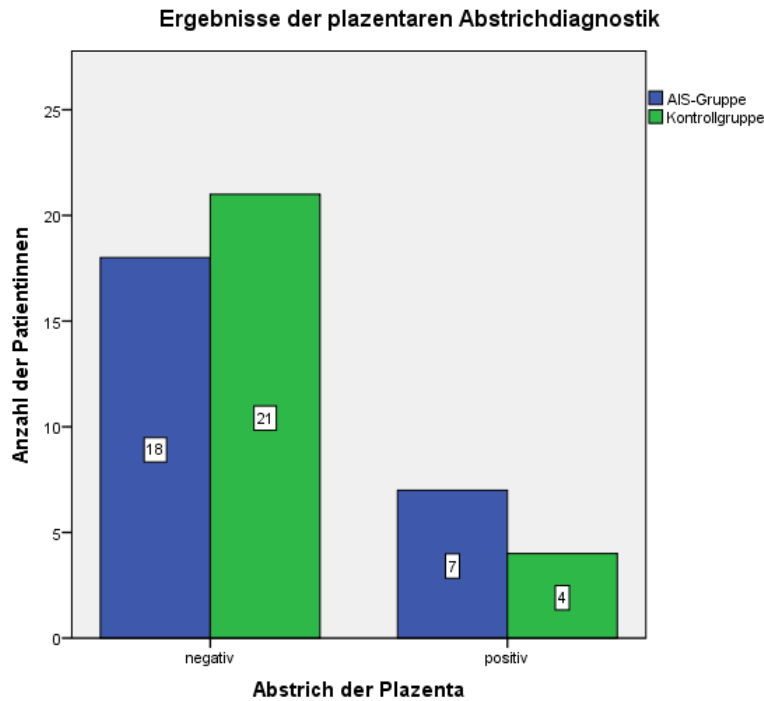


Abbildung 20: Ergebnisse der postpartalen Plazenta-Abstriche bei AIS-Gruppe und Kontrollgruppe

Fallgruppe:

Die Anzahl der positiven Kulturen der eingeschlossenen Patientinnen beträgt präpartal 64%. In den postpartalen Abstrichen von Plazenta und Eihäuten wurde in 28% eine mikrobielle Besiedlung nachgewiesen. Die im Detail erfassten Mikroorganismen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Kulturell erfasste mikrobielle Besiedlung von Plazenta und Eihaut nach der Entbindung

Nachgewiesene Besiedlung	Anzahl der Fälle (Dopplung möglich)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1
<i>S. mitis/oralis</i>	1
<i>E. faecalis</i>	1
<i>S. hominis</i>	1
<i>S. warneri</i>	1
<i>E. coli</i>	2
<i>Gemella morbillorum</i>	1

Auffällig hierbei ist die geringe Überschneidung der prä- und postpartal gefundenen Spezies. Lediglich *E.coli* und *S.aureus* finden sich zu beiden Zeitpunkten. Der Nachweis des *Staphylococcus aureus* erfolgte bei einer Patientin, die auch präpartal eine vaginale *Staphylococcus aureus*-Besiedlung aufwies. Das Resistenzspektrum beider Bakterien ist gleich. Ebenso verhält es sich bei einer Patientin, die präpartal eine zervikale *Escheria coli*-Besiedlung zeigte und postpartal den gleichen Keim mit demselben Resistenzspektrum aufwies. Beide Patientinnen wurden präpartal mit Cefuroxim und Metronidazol behandelt bei jeweils auf Cefuroxim sensiblen Keimen.

Kontrollgruppe:

Hier ist eine geringere Häufigkeit einer Besiedlung zu verzeichnen. Die aufgetretenen Keime konnten in zwei Fällen *Staphylococcus epidermidis*, in einem Fall *Lactobazillus rhamnosus* und in einem weiteren Fall ein *Staphylococcus aureus* zugeordnet werden. In allen Fällen war eine vorherige Anreicherung zu einem erfolgreichen Nachweis notwendig.

Bei $p= 0,316$ ist kein signifikanter Unterschied des postpartalen Bakteriennachweises in der Kultur zwischen den Gruppen erkennbar.

3.4.2 FISH

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde an den postpartal steril gewonnenen Proben von Plazenta und Eihaut durchgeführt.

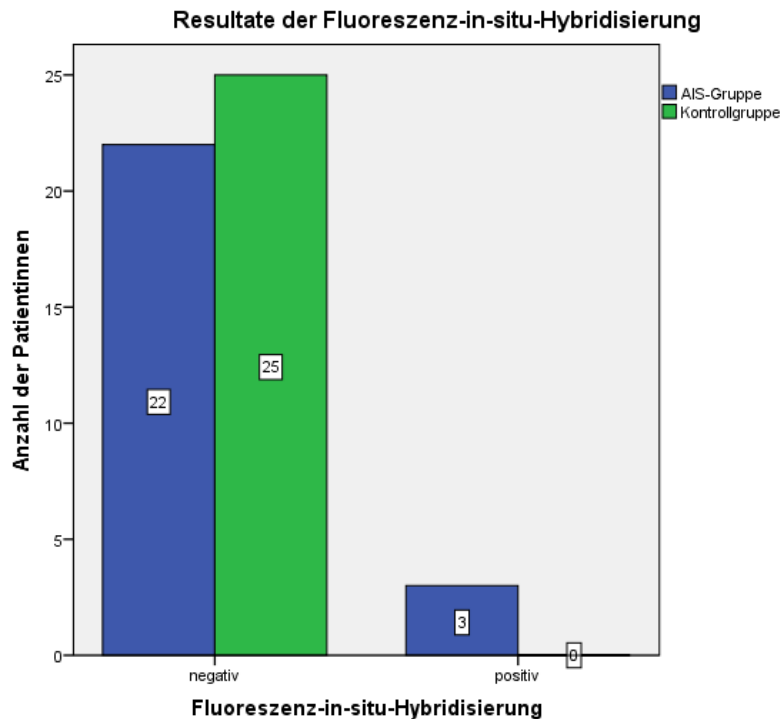


Abbildung 21: Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Vergleich zwischen AIS- und Kontrollgruppe

Abbildung 21 illustriert die Untersuchungsergebnisse der FISH-Analyse im Biofilmzentrum des Deutschen Herzzentrums.

Fallgruppe:

In 12% der Fälle konnte mit den in Tabelle 4 und 5 genannten Proben Bakterienspezies eindeutig identifiziert werden. Hierbei handelte es sich um *S.mitis* (STREP1+2), *S.aureus* (STAPHY) und *E.coli*, der jedoch erst über die Sonde EUB338 gefischt und im weiteren Verlauf als *E.coli* näher spezifiziert wurde. In weiteren Fällen war ein fragliches Signal mit dem DNA-Farbstoff DAPI nachweisbar. Innerhalb der DAPI-Gruppe gab es nur vereinzelt den Nachweis einer Besiedlung mittels PCR, sodass diesen Ergebnissen nur eine geringe Bedeutung beigemessen werden kann. Mit den verwendeten FISH-Sonden waren keine weiteren Mikroorganismen darstellbar. Die nachfolgende Abbildung 22 zeigt beispielhaft eine Gewebeprobe mit unterschiedlichen FISH-Sonden.

In diesem speziellen Fall handelt es sich um den Nachweis von *S.aureus* in der Eihaut. Dieser Keim imponiert in der vorliegenden Probe orange und ist jeweils gruppiert anzutreffen. Die relativ undifferenziert anzutreffende blaue Färbung ist auf die DAPI-Sonde zurückzuführen.

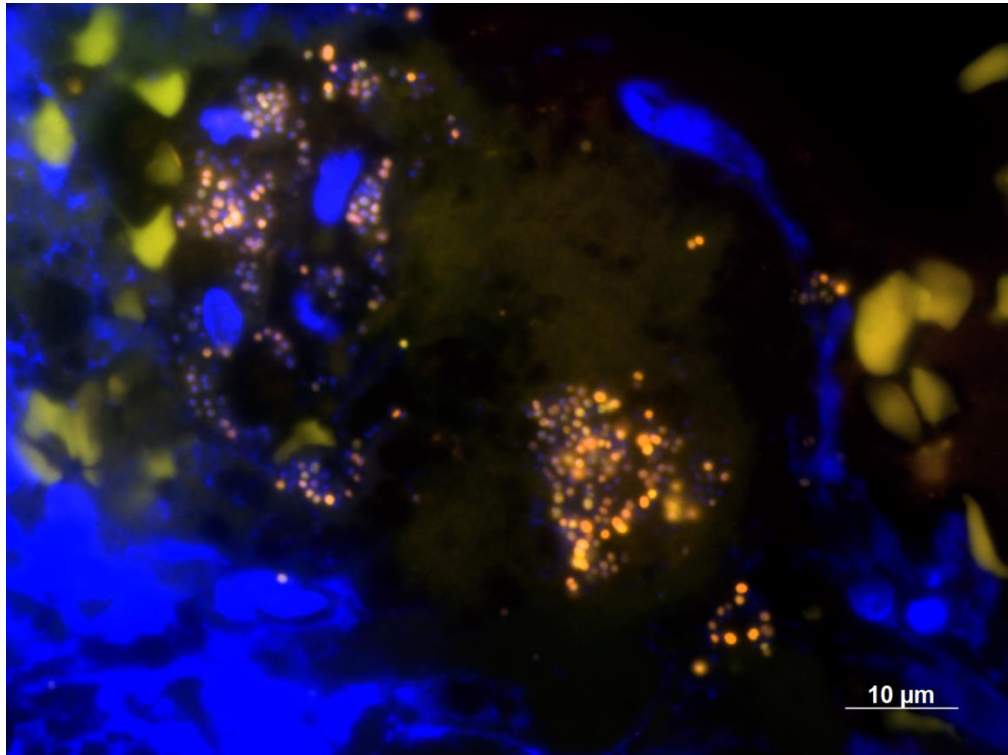


Abbildung 22: Darstellung einer Gewebeprobe des Fallkollektivs⁵⁷

Kontrollgruppe:

Die Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zeigen keine bakterielle Besiedlung der untersuchten Proben. Auch hier wurden die in Tabelle 4 genannten FISH-Sonden verwendet.

Es besteht bei $p=0,077$ kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich des Keimnachweises mittels einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.

3.4.3 PCR

Das Material für die PCR wurde aus den in Methacrylat eingebetteten Proben gewonnen und aufbereitet.

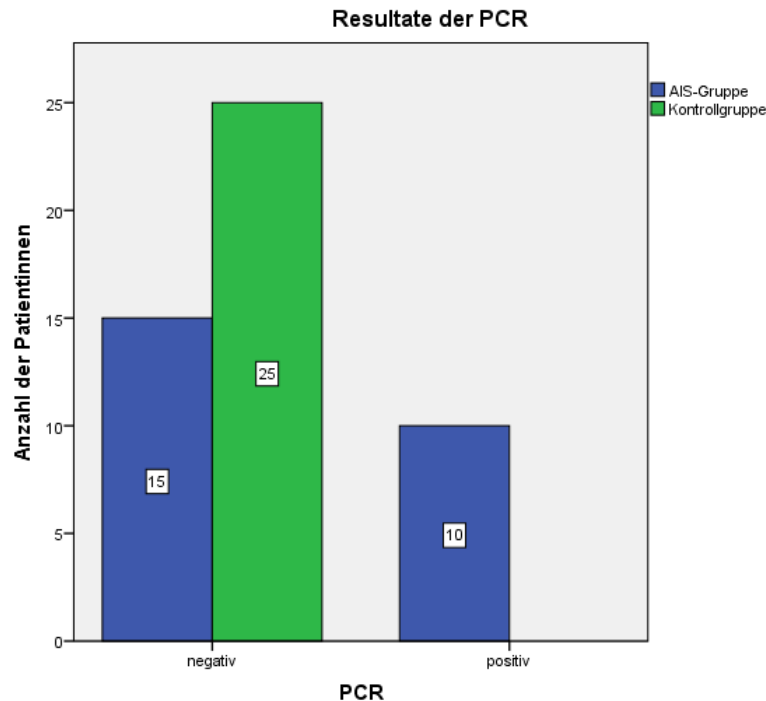


Abbildung 23: Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion bei AIS- und Kontrollgruppe

Abbildung 23 stellt die Ergebnisse der PCR grafisch dar.

Fallgruppe:

Insgesamt wurde in 40% der Fälle durch dieses Verfahren eine bakterielle Besiedlung der untersuchten Proben nachgewiesen. In vier Fällen konnte bei DAPI-positiver FISH eine eindeutige Zuordnung zur besiedelnden Bakterienspezies vorgenommen werden. Vereinzelt war auch in FISH-negativen Proben eine Kolonisation nachweisbar. In drei Fällen gab es eine eindeutige Übereinstimmung zwischen den in der FISH nachgewiesenen Bakterien und dem Nachweis in der PCR. Bisher ist es nicht möglich, *Ureaplasma* spp. in der FISH nachzuweisen, sodass in diesen Fällen eine diagnostische Lücke besteht. Es zeigen sich somit unterschiedliche Erregerspektren je nach verwendetem diagnostischen Verfahren.

Tabelle 9: Nachgewiesene Bakterienspezies in der PCR

Nachgewiesene Besiedlung	Anzahl der Fälle
<i>Ureaplasma</i> spp.	4
<i>S. mitis</i> - Gruppe, <i>S. pneumoniae</i>	2
<i>S. aureus</i>	1
Enterobacteriaceae	2
Mischige Sequenz	1

Kontrollgruppe:

In dieser Gruppe konnte in den untersuchten Proben keine Besiedlung mit Bakterien nachgewiesen werden.

An den Ergebnissen mit $p = 0,001$ ist ein signifikanter Unterschied zwischen AIS und Kontrollgruppe nachweisbar.

Tabelle 10: Ergebnisse aller Untersuchungen bei PCR positiven Patientinnen der Fallgruppe

Indikation zur Entbindung	PCR	FISH	Abstrich pränatal / postnatal	Pathologie
V.a. AIS	<i>Ureaplasma parvum</i> / <i>urealyticum</i>	negativ	<i>E.coli</i> / kein Nachweis	Vollbild ascendierendes AIS
V.a. AIS	<i>S. mitis</i> (99,4% über 503 bp)	STREP	Kein Nachweis / <i>S. mitis</i>	Vollbild ascendierendes AIS
V.a. AIS	<i>S. aureus</i>	STAPHY	<i>S. aureus</i> / <i>S. aureus</i>	Vollbild ascendierendes AIS
V.a. AIS	<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>E. coli</i> 99,3%)	DAPI- positiv	<i>E. coli</i> / <i>E.coli</i>	Vollbild AIS bei Zwilling 1, kein AIS bei Zwilling 2

V.a. AIS	<i>Ureaplasma parvum/ urealyticum</i> (99,9% über 501 bp)	negativ	<i>K. pneumoniae</i> / kein Nachweis	Kein Anhalt für AIS
V.a. AIS	<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>E. coli</i> 99,4%)	EUB338	Kein Nachweis / <i>E. coli</i>	Vollbild AIS, eitrig phlegmonöse Chorioamnionitis
V.a. AIS	<i>S.mitis /pneumoniae</i> (99,5% über 408 bp)	DAPI-positiv	Kein Nachweis/ <i>Gemella morbillorum</i>	Vollbild AIS
V.a. AIS	<i>Ureaplasma parvum /urealyticum</i> (99,9% über 498bp)	DAPI-positiv	<i>E.coli</i> / kein Nachweis	Amnionitis
V.a. AIS	<i>Ureaplasma parvum/ urealyticum</i> (Eihaut 99,9% 227/240 bp; Placenta 99,9% 232bp)	DAPI-positiv	<i>S.aureus</i> / kein Nachweis	Aszendierende Amnionitis
Präeklampsie	<i>Mischige Sequenz</i>	negativ	Kein Nachweis/ kein Nachweis	Vollbild AIS

3.4.4 Pathologie

Nach Entnahme der Proben an Placenta und Eihaut wurden diese in das Pathologische Institut der Charité überführt.

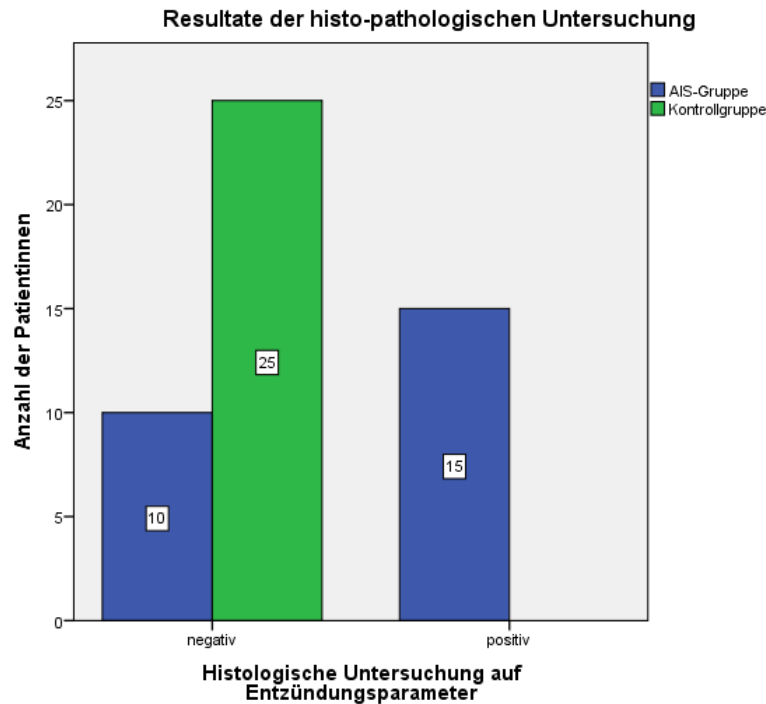


Abbildung 24: Ergebnisse der histo-pathologischen Untersuchung der AIS- und Kontrollgruppe im Vergleich

Abbildung 24 illustriert die Ergebnisse der histologisch-pathologischen Untersuchung, die laut Studienprotokoll an allen Plazenten durchgeführt wurde.

Fallgruppe:

Hier lassen sich in 60% der Fälle ein AIS verschiedener Schweregrade nachweisen, die häufig sowohl den mütterlichen, als auch kindlichen Bereich der Plazenta betreffen. Eine Plazenta konnte durch Kommunikationsfehler nicht rechtzeitig in die Pathologie gebracht und dadurch nicht untersucht werden. Diese wurde den negativen Fällen zugeordnet.

Kontrollgruppe:

In dieser Gruppe wiesen 92% der Frauen keine Entzündungsreaktion im mütterlichen oder kindlichen Gewebe auf. In zwei Fällen war eine Reaktion nachweisbar; in einem Fall eine kleinherdige Perivillitis und in dem zweiten Fall eine geringgradige chorale

Placentitis, die eine rein mütterliche Zellreaktion darstellte. Diese Fälle wurden in der histo-pathologischen Untersuchung nicht als AIS-Patientinnen deklariert. In beiden Fällen gab es keinen Besiedlungsnachweis in Abstrich, PCR oder FISH, sodass hier von einer aseptischen Zellreaktion ausgegangen werden kann.

Bei einem $p=0,00$ ist der Unterschied zwischen den Gruppen signifikant.

3.4.5 Ergebnis

Durch den Einsatz dreier unterschiedlicher mikrobiologischer Nachweismethoden und einer Methode zur Verifizierung einer bestehenden histologischen Entzündungsreaktion konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

Die präpartale kulturelle Diagnostik zeigte eine vaginale Besiedlung, bestehend aus einem bunten Bild der üblichen Darmkeime. Postpartal ergab sich ein Keimspektrum, welches überwiegend aus Mikroorganismen der residenten Hautflora bestand oder fäkalen Ursprungs war. Ebenso fanden sich Mikroorganismen der normalen bzw. intermediären Vaginalflora.

Die FISH erbrachte den eindeutigen Nachweis von Streptokokken, Staphylokokken und Eubakterien. Unspezifisch ließ sich vereinzelt bakterielle DNA nachweisen.

Die PCR detektierte hauptsächlich Ureaplasmen und Enterobakterien.

Somit ergeben sich mit unterschiedlichen mikrobiologischen Nachweismethoden unterschiedliche Keimspektren im untersuchten Fallkollektiv bei deutlichen Unterschieden bezüglich der mikrobiellen Flora je nach verwendetem Verfahren. Weiterhin gibt es signifikante Unterschiede im Bereich Schwangerschaftsdauer, Länge des Klinikaufenthaltes, mikrobieller Nachweis in der PCR und dem Nachweis eines histologischen Amnioninfektionssyndroms zwischen Fall- und Kontrollgruppe.

4 Diskussion

4.1 Methodik

4.1.1 Strukturierung einer kontaminationsfreien Plazenta- und Probenentnahme

Die Entwicklung des strukturierten Entnahmeprotokolls folgte den unter Punkt 1.3 genannten Anforderungen:

Jede Plazenta einer Patientin, die eine Sectio caesarea benötigte, sollte vom Verlassen des Uterus bis zum Ende der Probenentnahme steril und kontaminationsfrei bleiben. Dieser einfache Ansatz ist kein Standard in Studien, die sich mit dem mikrobiellen Besiedlungsspektrum von Eihäuten auseinandersetzen.

Steel et al. untersuchten 2005 die fetale Membran von Einlingsschwangerschaften nach vaginaler Entbindung und Sectio caesarea². Hierbei wurden keine speziellen Vorkehrungen beschrieben, wie die Plazenta zu behandeln ist, sodass nicht von einer lückenlos sterilen Behandlung ausgegangen werden kann. Laut Steel et al. wurde in tiefen Gewebeschichten der Plazenta nach Sectio caesarea eine 70%ige Besiedlungsrate bei Patientinnen am Termin nachgewiesen². Daraufhin schließt die Gruppe die bakterielle Besiedlung als Hauptursache der Frühgeburtlichkeit aus. Aufgrund der fraglichen Kontaminationsfreiheit der untersuchten Proben muss diese Aussage kritisch hinterfragt werden, da sie sich mit den erzielten Ergebnissen dieser aktuellen Studie nicht deckt.

Eine weitere Studie von Onderdonk et. al. 2008 behandelt die Plazenta während der Probenentnahme steril und untersucht Proben vaginaler und abdominell-operativer Entbindungen vor der 28. SSW³⁸. Das Amnion aller untersuchten Plazenten wurde entfernt, um darunterliegendes Gewebe zu entnehmen, welches als steril gilt. Anschließend erfolgten die kulturelle- und PCR-Diagnostik. Die Rate kultur-positiver Proben war erwartungsgemäß höher in der Gruppe der vaginal entbundenen Patientinnen³⁸, welches sich mit einer intrapartalen Kontamination erklären lässt. Mittels PCR konnte hier kein mikrobieller Nachweis erbracht werden.

Andere Studien betrachteten nicht die Eihäute, sondern das Fruchtwasser^{33,34} und können daher als Referenz nicht betrachtet werden.

Da in den genannten Studien eine Kontamination im Verarbeitungsprozess nicht restlos ausgeschlossen werden kann, wurde von uns das unter 2.6 dargestellte Methodenprotokoll entwickelt und getestet. Um eine strukturierte und standardisierte Probenentnahme zu gewährleisten, muss der erarbeitete Arbeitsablauf von allen beteiligten Personen streng eingehalten werden. Diese Maßgabe wurde durch einen detailliert vorgeschriebenen Ablaufplan eingehalten.

Das Protokoll an sich erwies sich im Rahmen der Pilotstudie als sehr gut geeignet, um die mikrobielle Besiedlung von Plazenta und Eihäuten ohne eine Kontamination zu untersuchen. Die negativen Befunde der PCR und FISH als sensitivste Untersuchungsmethoden im Rahmen der Kontrollgruppe beweisen, dass es keine akzidentelle Aufbringung von Mikroorganismen gab. Im Rückschluss bedeutet dies, dass die gefundenen Mikroorganismen in der Fallgruppe präexistent waren und möglicherweise einen Einfluss auf das Schwangerschaftsgeschehen hatten. Die Einbeziehung mehrerer diagnostischer Verfahren sicherten die Ergebnisse in jedem Fall ab.

Damit konnte die erste Zielsetzung der Studie, eine strukturierte, kontaminationsfreie Plazenta- und Probenentnahme zu gewährleisten, erreicht werden.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im Rahmen klinischer Studien ist eine der Grundvoraussetzungen in der Forschung. Somit besteht die Notwendigkeit, die durchgeführten Arbeitsschritte einfach, übersichtlich und ohne erheblichen Aufwand darzustellen und für andere verfügbar zu machen.

4.1.2 Darstellung von Arbeitsschritten einer medizinischen Studie

Die Entwicklung einer einheitlichen Handlungsabfolge im Rahmen von Studien oder auch in der Etablierung eines neuen diagnostischen Verfahrens setzt immer voraus, dass ohne weitere Schwierigkeiten bei der Nutzung gleicher Methoden das gleiche Ergebnis reproduziert werden kann. Meist bedarf es aufwendiger Schulungen oder des zeitaufwendigen Studiums langer Texte, um keinen Arbeitsschritt auszulassen oder vorzuziehen. Hilfreich ist in solchen Fällen die Aufschlüsselung des Arbeitsablaufs in einzelne, einfach auszuführende Teilschritte und Arbeitsanweisungen der Form „wenn, dann“.

Nutzt man diese Arbeitsanweisungen, sollte sowohl schriftlich als auch grafisch kein Zweifel bestehen, welcher Arbeitsschritt in welchem Ergebnis münden soll und wer wofür verantwortlich ist.

Diese Anforderungen müssen in alltäglichen Prozessen wirtschaftlich arbeitender Unternehmen bewältigt werden und können daher auch für medizinische Prozesse Anwendung finden. Die Ziele der Prozessmodellierung, formuliert von Prof. Dr. Susanne Koch, sind denkbar einfach: Transparenz, Fehlervermeidung, Kosten, personenunabhängige Verfügbarkeit des Wissens, erleichterte Einarbeitung neuer Mitarbeiter, Auswertungsmöglichkeiten, Simulationen u.v.a.⁵⁸. In der Medizin erfolgt die Darstellung von Handlungsabläufen gern in einfachen Fließdiagrammen, die simple Handlungsabfolgen liefern können, z.B. im Rahmen der Reanimationsleitlinien. Sobald komplexere Handlungsabfolgen gefordert werden, in die mehr als eine Person involviert sind, wird die Handhabung mit einfachen Fließdiagrammen häufig komplizierter.

Der Vorteil eines eEPK ist die grafische Beschreibung der logisch-zeitlichen Abfolge eines Tätigkeitsflusses⁵⁹. Jedes Ereignis („Frau betritt den Kreißaal“) löst eine Funktion aus („Patientin wird untersucht“). Es ist zu jedem Zeitpunkt klar, welche Funktion von welcher Funktionseinheit (hier „Aufnahmeteam“) ausgeführt wird. Jede Funktion hat wieder ein Ergebnis, welches zu einer erneuten Funktion führt⁵⁹. Es ist immer eindeutig, welcher Bereich der Handlungskette von welchem Mitarbeiter bearbeitet wird. Es ist auch immer ersichtlich, welcher Schritt als nächstes folgt bzw. welche auslösenden Faktoren ein Handeln des Mitarbeiters erfordern. Auch besteht die Möglichkeit, zwischen mehreren Handlungssträngen zu wählen, je nachdem, welche Vorbedingung erfüllt ist, oder alle im Rahmen der gegebenen Möglichkeiten parallel durchzuführen. Der Schwerpunkt dieser Methode liegt offensichtlich in der Abbildung eines Kontrollflusses, der vorgibt, wie und in welcher Reihenfolge Handlungen auszuführen sind^{44,59}. Genau dieser Schwerpunkt macht die eEPKs zu einer hervorragenden Darstellungsvariante von Arbeitsabläufen, bei denen wie in dieser Studie alles zu jedem Zeitpunkt auf die gleiche Art und Weise durchgeführt werden muss, damit keine mikrobielle Kontamination und keine Zeitverluste auftreten. Gleichzeitig ermöglicht sie die genaue Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, weil kein Raum für Interpretationen und die individuelle Wahl des Zeitpunktes eines Arbeitsschrittes bleibt. Zusätzlich ist es einfach, neue Mitarbeiter in das Methodenprotokoll einzuweisen, da sie sich strikt an die Vorgaben zu halten haben und im Prinzip kein Raum für Fragen bleibt.

Üblicherweise wird in klinischen Studien ein Entnahmeprotokoll entwickelt, welches besagt, wie in den einzelnen Fällen vorgegangen werden soll. Hierbei ist jedoch nicht in allen Fällen eindeutig klar, an welchen Stellen Proben entnommen werden², oder es wurde in langen Texten umständlich beschrieben, was in den verschiedenen Situationen zu tun ist³³. Übersichtlicher, einfacher und fehlerärmer werden die Arbeitsabläufe visuell im Rahmen von eEPKs festgehalten. Es gibt noch eine Vielzahl an Prozessnotationen, welche für unterschiedliche Fragestellungen und Betrachtungsweisen von Arbeitsabläufen geeignet sind, aber in vielen Fällen für die einfachen Anforderungen der Darstellung unseres Arbeitsablaufes unnötig komplex waren.

Trotzdem empfiehlt es sich im Vorfeld, die eEPKs mit den entsprechenden Mitarbeitern durchzusprechen und auftretende Fragen zu klären. So können die Darstellungen später am Arbeitsplatz als bildliche Gedächtnisstütze eingesetzt werden.

4.2 Zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen AIS-Patientinnen und der Kontrollgruppe?

Die statistische Auswertung zeigt, dass sich die verglichenen Populationen in Alter, Gravität und Parität nicht wesentlich unterscheiden. Diese Grundvoraussetzung ermöglicht den Vergleich der anderen erhobenen Daten untereinander.

Es ist deutlich auszumachen, dass die Patientinnen der AIS- Gruppe bei einem Signifikanzniveau von $p= 0,00$ länger in stationärer Behandlung verweilten und die Feten ein signifikant geringeres Gestationsalter bei der Entbindung aufwiesen. Daher liegt der Rückschluss nahe, dass das Amnioninfektionssyndrom in einer deutlich verkürzten Schwangerschaftsdauer mit einem erheblichen Mehrbedarf an stationärer Betreuung mündet.

4.2.1 Abstrich

Vor der Entbindung finden sich in den vaginalen Abstrichen der Fallgruppe die in ähnlichen Konstellationen häufig nachweisbaren Keime, hauptsächlich *E. coli* und *S. aureus*. Diese Bakterien sind die klassischen Mikroorganismen, nachweisbar im Rahmen einer aeroben Vaginitis¹¹. Sie wurden mit den nach Leitlinien empfohlenen

Antibiotika (Cefuroxim und Metronidazol) bekämpft und dadurch vermutlich eine Verlängerung der Schwangerschaft erreicht. Den 16 präpartal positiven vaginalen Abstrichen stehen nach medikamentöser Behandlung und einer Entbindung per Kaiserschnitt 7 positive postpartale plazentare Abstriche gegenüber. Dies unterstreicht die gängige Hypothese, dass Keime der Mikroflora ascendieren und Entzündungen und Infektionen in der Schwangerschaft auslösen können¹⁵. Durch die kalkulierte Antibiotikatherapie nach der stationären Aufnahme der Patientinnen des Fallkollektivs konnte die mikrobielle Besiedlung nachweislich von präpartal 64% auf postpartal 28% gesenkt werden. Auffällig ist jedoch, dass in zwei Fällen der gleiche Keim mit gleichem Resistenzspektrum prä- und postpartal nachweisbar war. Da sowohl der aufgefundene *E.coli*, als auch der *S.aureus* im Resistogramm sensibel auf die verabreichten Antibiotika war, gab es präpartal keine Veranlassung zu einer Veränderung der Therapie. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der Untersuchung von Gomez et al. von 2007, die bei positivem Keimnachweis nach antibiotischer Behandlung keine Eradikation der intrauterinen Besiedlung nachweisen konnten⁶⁰. Die Ergebnisse eben genannter Studie beziehen sich auf die Resultate zweier präpartaler Fruchtwasseruntersuchungen, vor und nach einer zehn- bis vierzehntägigen Behandlung mit Ampicillin und Erythromycin. Diese Fälle zeigen die Grenzen einer kalkulierten Antibiotikagabe, da anscheinend ein oder mehrere Faktoren dazu beigetragen haben, dass die mikrobielle Besiedlung persistieren konnte. In früheren Publikationen wird die Existenz eines Biofilms in schwangeren Frauen postuliert und vereinzelt auch nachgewiesen⁹. Diese Biofilme bilden sich an verschiedenen Oberflächen und ermöglichen den beteiligten Bakterien ein Überleben in durch Antibiotika beeinträchtigten Umgebungen⁶¹. Normalerweise wären die gewählten Medikamente bei einer nachgewiesenen Infektion wirksam, doch der Biofilm ist eine plausible Erklärung für den wiederholten Nachweis von *E.coli* und *S.aureus* in beiden Fällen auch nach der Gabe von Cefuroxim⁶¹.

Bei der Kontrollgruppe traten vier positive Abstriche auf. Dadurch ist kein statistisch signifikanter Unterschied bei $p=0.316$ zu erkennen, weshalb allein auf der Basis der Plazentaabstriche die Nullhypothese, es bestehe kein Unterschied zwischen Patientinnen mit AIS und der Kontrollgruppe, beibehalten werden muss.

Möglicherweise ist aber die alleinige Wahl eines Plazentaabstriches zur postpartalen Diagnostik eines AIS nicht geeignet. Die Ergebnisse der kulturellen Diagnostik der

Kontrollgruppe können nicht mit denen der anschließend erfolgten PCR und FISH in Einklang gebracht werden, daher handelt es sich tendenziell eher um eine Kontamination der Proben an einer nicht identifizierbaren Stelle des Arbeitsablaufes. Diese Erklärung steht im Kontrast zur Hypothese von Steel et al. 2005, die ein natürliches Vorkommen von Mikroorganismen intrauterin in allen Stadien einer Schwangerschaft, unabhängig vom Schwangerschaftsverlauf postuliert².

4.2.2 FISH

In der FISH ist es gelungen, drei Fälle einer bakteriellen Besiedlung mittels der verwendeten Sonden zu identifizieren. Hierbei handelte es sich um *S.mitis/pneumoniae*, *S.aureus* und *E.coli*. Die nachgewiesenen *E.coli* wurden durch die Sonde EUB338 erfasst und erst mittels PCR genau identifiziert. Bei den eingeschlossenen Patientinnen der Fallgruppe wäre es vom verwendeten Sonden-Setting bei fünf Patientinnen möglich gewesen, mittels der FISH eine Besiedlung nachzuweisen. Das Gelingen dieses Nachweises in 60% (3/5) ist als Erfolg zu werten. Mögliche Gründe des fehlenden Nachweises in den entsprechenden zwei Fällen könnten die geringere Sensitivität der FISH als die der PCR sein sowie die Untersuchung eines anderen Anteils der entsprechenden Probe als in der PCR.

Steel et al. untersuchten 2005 ebenfalls Proben von Plazenta und Eihäuten mittels FISH². Hierbei wurde eine höhere Nachweisrate, sowohl in Patientinnen mit PPRM als auch am Termin, erzielt. Da die Probenentnahme und Probenverarbeitung aufgrund des methodischen Aufbaus nicht lückenlos steril sein konnte, müssen die Ergebnisse kritisch hinterfragt werden (siehe 4.1.1)

Kim et al. verfolgten 2009 einen ähnlichen Ansatz und untersuchten Proben einer zentralen Probenbank mittels FISH, die in drei verschiedene Gruppen eingeteilt wurden⁶². Hierbei wurde die Sonde EUB338 sowie eine Non-sense Sonde verwendet. Dementsprechend war der generelle Nachweis einer Besiedlung möglich, nicht jedoch die genaue Identifizierung der Spezies. Es fanden sich in 22% (4/18) der Fälle einer Gruppe mit positiver Fruchtwasserkultur positive FISH-Ergebnisse der Eihäute. Bei negativer Fruchtwasserkultur ergaben sich drei positive FISH-Ergebnisse der Eihäute (3/22)⁶². Die dritte Gruppe umfasste Patientinnen ohne Geburtsbestrebung am Termin, die mittels Sectio entbanden. Hierbei konnte weder durch PCR noch FISH ein positiver Befund ermittelt werden⁶². Dies deckt sich absolut mit unseren Ergebnissen.

Ebenso wurde die FISH mit der Sonde EUB338 durch Romero et al. 2008 im Rahmen der Untersuchung von „amniotic sludge“ in einem Fallbericht verwendet um nachzuweisen, dass es sich dabei um einen Biofilm handelt⁹.

Der Vergleich unserer Ergebnisse mit den Resultaten von Steel, Kim und Romero zeigt, dass die Verwendung der FISH als Ergänzung zur konventionellen Diagnostik zwar langwierig, aber durchaus sinnvoll im Rahmen der klinischen Forschung sein kann, unter der Voraussetzung einer strikt sterilen Handhabung der Proben. Im Gegensatz zu Kim et al. haben wir das Fruchtwasser nicht auf darin befindliche Mikroorganismen untersucht, gehen jedoch davon aus, dass im Falle eines positiven Nachweises auch der Oberflächenabstrich der Plazenta positiv ausfallen muss. Unsere Ergebnisse mit drei FISH-Nachweisen von 25 Patientinnen, in denen zehn sicher eine bakterielle Besiedlung aufwies, ist trotz fehlender Signifikanz als erfolgreicher Einsatz dieses molekularbiologischen Verfahrens zu werten und ähnelt den Ergebnissen von Kim et al.

In den oben genannten Studien war das Ziel der Verwendung einer FISH ausschließlich der Nachweis einer mikrobiellen Besiedlung, nicht die Identifizierung der genauen Spezies. Das hier vorliegende Sondenset hat in zwei Fällen, zusätzlich zum generellen Besiedlungsnachweis, einen genauen Nachweis erbringen können, um welches Bakterium es sich handelt. Auf diese Art und Weise wurde die FISH im geburtshilflichen Kontext bisher nicht durchgeführt und ist als sinnvolle Ergänzung und Erweiterung des diagnostischen Spektrums zu sehen. Der am häufigsten nachgewiesene Erreger, *Ureaplasma* spp., kann durch die bisher etablierten Sonden nicht nachgewiesen werden, wäre aber eine erstrebenswerte Ergänzung des bisher verwendeten Sondensets.

Bei zehn Patientinnen der AIS-Gruppe wurde kein Hinweis einer mikrobiellen Besiedlung in der FISH entdeckt. Diese Resultate konnten in vier Fällen mit gleichzeitig negativer PCR und negativem histo-pathologischem Befund als Patientinnen mit gesichert keinem AIS identifiziert werden. Auch die klinischen Ergebnisse ließen nicht auf ein AIS schließen; maternales Fieber, Tachykardie, CRP-Erhöhung und eine Leukozytose fehlten. Der Einschluss dieser Patientinnen erfolgte aufgrund eines vorzeitigen Blasensprungs.

Die Patientinnen mit positivem oder fraglich positivem DAPI-Befund können nicht als FISH positive Befunde gewertet werden. Trotzdem fand sich in vier der DAPI-positiven

Fälle eine mittels PCR mikrobielle Besiedlung. Die plausibelste Erklärung dafür ist die größere Sensitivität der PCR im Gegensatz zur FISH und den verwendeten Sonden.

Die Patientinnen der Kontrollgruppe wiesen ausschließlich negative Ergebnisse der FISH-Diagnostik auf, unterstützen somit die Ergebnisse von Kim et al. und kontrastieren die Resultate von Steel et al. Die statistische Auswertung der FISH-Ergebnisse ergab $p=0,077$, daher konnte der Unterschied im Vergleich der Fall- und Kontrollgruppe als nicht signifikant gewertet werden. Unabhängig davon ist innerhalb der Kontrollgruppe bei drei von fünf überhaupt möglichen Nachweisen eine Quote von 60% positiven Nachweisen erbracht worden.

4.2.3 PCR

Die PCR wies eine mikrobielle Besiedlung nach, die sich von den Ergebnissen der kulturbasierten Diagnostik und der FISH in einigen Punkten unterschied. Zusätzlich zu den Fällen mit Streptokokken- und Staphylokokkenbesiedlung sowie dem Nachweis von Enterobacteriaceae ließ sich in vier Fällen *Ureaplasma* spp. detektieren. In den drei Fällen der positiven FISH konnten die Ergebnisse der PCR diese Befunde validieren. Auch der postpartale Abstrich zeigte in diesen Fällen den gleichen Befund.

Waren in der FISH nur die DAPI-Sonden positiv, konnte in vier Fällen mittels PCR eine genauere Bestimmung erfolgen. Hier zeigte sich bei DAPI-positiver FISH Enterobacteriaceae, *S.mitis/pneumoniae*, sowie zweimal *Ureaplasma parvum/urealyticum*. Ureaplasmen konnten auch in zwei FISH-negativen Befunden mittels PCR nachgewiesen werden. Die Anwendung zusätzlicher molekularbiologischer Verfahren zeigt daher, dass ein anderes Erregerspektrum als im Abstrich nachgewiesen werden kann.

Jones et al. untersuchten 2009 Vorkommen und Häufigkeit der unterschiedlichen bakteriellen Spezies an Eihäuten und Plazentagewebe an Proben von am Termin und zu früh entbundenen Feten³⁷. Patientinnen, die am Termin per Sectio caesarea entbanden, zeigten in der durchgeführten PCR keine bakterielle Besiedlung³⁷. Dies lässt sich durch unsere Daten bestätigen. Patientinnen mit beginnenden Wehen und sowohl vorzeitigem Blasensprung, als auch ohne Blasensprung zeigten nach Schnittentbindung ein bakterielles Spektrum, bei dem klar *Ureaplasma* spp. überwiegt³⁷. Ebenso ist das Ergebnis, dass das plazentare Gewebe bei

nachgewiesener bakterieller Besiedlung eine deutliche histologische Entzündungsreaktion präsentiert³⁷, durch unsere Daten belegbar.

Daher ist davon auszugehen, dass die PCR im Hinblick auf die Diagnostik von Ureaplasmen eine nahezu unverzichtbare Ergänzung der diagnostischen Möglichkeiten darstellt. Nicht nur in der vorliegenden Studie, sondern auch andere Arbeitsgruppen konnten hierdurch ein differierendes bakterielles Spektrum in fetalem und maternalem Gewebe ermitteln, als jenes, welches durch die kulturbasierte Diagnostik nachweisbar ist. Die standardisierte kulturelle Diagnostik ist kostengünstig und einfach in der Handhabung. Sie hat jedoch ihre Limitationen im anaeroben Bereich sowie im Nachweis intrazellulärer Organismen. Es wurde in vier Fällen in dieser Studie der PCR-basierte Nachweis von Ureaplasmen erbracht, die intra- oder extrazellulär vorkommen und sowohl aerob, als auch teilweise anaerob leben können. Sie werden in der routinemäßigen kulturellen Diagnostik nicht erfasst. Sicherlich ist es möglich, auf Anforderung spezielle Nährböden zu verwenden, jedoch wird dies im klinischen Alltag selten genutzt. Als häufig im Genitaltrakt der Frau vorkommende Organismen ist es möglich, dass sie bei gestörter Vaginalflora eine Immunreaktion auslösen können, die zu der Entstehung einer Frühgeburt beiträgt. Diese bisherige diagnostische Lücke könnte durch die Anwendung einer gezielten kulturellen Diagnostik oder PCR im routinemäßigen Gebrauch geschlossen werden. Ureaplasmen werden ebenfalls mittels der kalkulierten Antibiotikatherapie bei vorzeitigem Blasensprung nicht erfasst, sodass auch hier eine Lücke existiert. Da Ureaplasmen in einer unauffällig verlaufenden Schwangerschaft keinen pathologischen Befund darstellen, ist dementsprechend in diesen Fällen auch kein Handlungsbedarf gegeben. Bei Anzeichen einer drohenden Frühgeburt sollte die Diagnostik routinemäßig um den Nachweis von Ureaplasmen erweitert und bei einem positiven Befund die Therapie um wirksame Antibiotika ergänzt werden.

Die PCR-Ergebnisse der Kontrollgruppe ergaben keinen positiven Befund. Dies deckt sich mit den Resultaten von Jones et al.³⁷. Die statistische Auswertung ergab daher einen signifikanten Unterschied beider Gruppen ($p=0,001$), weshalb hierbei ebenfalls die Nullhypothese abgelehnt werden kann.

4.2.4 Histo-pathologische Untersuchung

Die histo-pathologische Untersuchung ergab in 15 Fällen der AIS-Gruppe einen positiven Befund. Dieser Nachweis einer zellulären Entzündungsreaktion verifiziert nicht die bakterielle Genese des klinischen Befindens der Patientin oder den Nachweis, dass Bakterien die Ursache eines AIS sind. Jedoch ist bis auf eine Ausnahme bei allen PCR-positiven Patientinnen auch ein positiver histo-pathologischer Befund zu erheben. Daher ist in diesen Fällen ein Zusammenhang zwischen PCR-Befund und histologischem Befund wahrscheinlich und wird durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen³⁷ unterstützt.

In der Kontrollgruppe konnte keine AIS-typische Entzündungsreaktion gefunden werden. In der statistischen Auswertung zeigt sich daher ein signifikanter Unterschied ($p=0,00$) zwischen beiden Gruppen und die Nullhypothese kann verworfen werden.

4.2.5 Kontrolle

Die Abstrichdiagnostik ermittelte eine 16%ige Besiedlungsquote bei Patientinnen mit unauffälligem Schwangerschaftsverlauf und einer primären Sectio am Termin. Diese Besiedlung konnte jedoch in der FISH und PCR als sensitivere Verfahren nicht bestätigt werden. In der Pathologie zeigte sich bei zwei Patientinnen eine entzündliche Zellreaktion der Plazenta, die aber nicht zu den kultur-positiven Patientinnen gehörten. Zum einen kann dadurch von einer aseptischen Zellreaktion ausgegangen werden, zum anderen ist es wahrscheinlich, dass die kultur-positiven Patientinnen keine Infektion aufwiesen, sondern es sich um eine Kontamination im weiteren Arbeitsverlauf handelte. Durch die geringe Größe der Proben ist es ebenso nicht ausgeschlossen, dass im Abstrich erfasste Besiedlungstellen durch ihre unauffällige Makroskopie nicht bei der Probenentnahme erfasst wurden. Daher kann in diesem Fall auch kein Nachweis durch PCR und FISH erfolgen.

Aufgrund der ermittelten Ergebnisse stellen wir die Hypothese auf, dass in gesunden Patientinnen mit unauffälligem Schwangerschaftsverlauf keine latente mikrobielle Besiedlung vorhanden ist. Diese Ergebnisse decken sich mit den Aussagen von Kim et al.⁶². Bei ausreichender Immunkompetenz der Mutter zu Beginn der Schwangerschaft werden die während der Befruchtung oder zu einem späteren Zeitpunkt eingebrachten Keime erfolgreich durch das Immunsystem der Mutter bekämpft. Die Eihäute und die

verschlossene Zervix verhindern im weiteren Verlauf eine Aszension der vaginal vorhandenen Mikroorganismen.

Die Ergebnisse einer ähnlichen Studie von Steel et al. 2005 ergaben, dass 70% der Patientinnen am Termin mit einer primären Sectio bakteriell besiedelt sind². Dies lässt sich in unserer Arbeit nicht bestätigen. In der erwähnten Studie wurde das Protokoll zur Probenentnahme nicht eindeutig erläutert, sondern lediglich darauf hingewiesen, dass darauf geachtet wurde, eine Kontamination zu vermeiden. Daher kann nicht eindeutig geklärt werden, welche Unterschiede in der Akquirierung der Proben vorlagen. Steel et al. untersuchten ebenso Proben der Eihäute und konnten in allen Phasen der Schwangerschaft Bakterien mittels FISH nachweisen².

Ausschließlich in der Fallgruppe unserer Studie gelang uns ebenso der Nachweis einer bakteriellen Besiedlung durch die FISH. Die Kontrollgruppe wies jedoch keinerlei bakterielle Besiedlung auf. Unsere Ergebnisse wurden mittels einer PCR abgesichert. Daher gehen wir davon aus, dass das von uns erarbeitete Entnahmeprotokoll effektiv ist und das Risiko einer Kontamination minimiert. Es sind weiterführende Untersuchungen unter Verwendung des erarbeiteten Studienprotokolls notwendig, um die Ergebnisse zu überprüfen und das Vorkommen und die Bedeutung einer mikrobiellen Besiedlung bei unauffälligem Schwangerschaftsverlauf zu klären.

Jedoch ist abschließend festzuhalten, dass signifikante Unterschiede in der mikrobiellen Besiedlung zwischen einer unauffälligen Schwangerschaft und einer Schwangerschaft, die in einem AIS mündet, bestehen. Diese sind durch PCR, FISH und histo-pathologische Untersuchungen nachweisbar. Deutlich sichtbar, auch ohne diese Nachweismethoden, ist die signifikante Verringerung der Schwangerschaftsdauer und ebenso die verlängerte stationäre Aufenthaltsdauer im Rahmen eines Amnioninfektionssyndroms.

4.3 Ureaplasmen

Auffällig ist an den Patientinnen mit dokumentierter *Ureplasma parvum/ urealyticum* Infektion die präpartale kulturell nachgewiesene Besiedlung durch andere Bakterienarten. Aufgrund der kalkulierten Antibiotikabehandlung vor der Entbindung waren diese postpartal nicht mehr nachweisbar. Drei der vier Patientinnen entwickelten ein eindeutiges Amnioninfektionssyndrom mit histo-pathologischem Nachweis sowie

eindeutigen klinischen Infektparametern. Diskutiert werden muss nun, ob der Nachweis von Ureaplasmen in diesen Fällen eine nachfolgende Besiedlung durch eine freigewordene Nische nach Antibiotikabehandlung darstellt oder eine präexistente Besiedlung, die kulturell und daraufhin auch antimikrobiell nicht erfasst wurde und wodurch der Krankheitsverlauf ungehindert fortschreiten konnte.

Fest steht, dass in den drei Fällen, die ein histo-pathologisch nachgewiesenes AIS aufweisen, die präpartal detektierten Keime jeder für sich in der Lage ist, allein ein AIS auszulösen.

Im Rahmen der eubakteriellen PCR konnte in den AIS- Fällen durch *E. coli* oder *S. aureus* nicht zusätzlich *Ureaplasma spp.* nachgewiesen werden. Dies wiederum heißt, dass nicht zweifelsfrei geklärt werden kann, ob die Ureaplasmen bei vorbelastetem Immunsystem durch eine vorhergehende urogenitale Infektion erst in der Lage sind, sich ungehindert zu vermehren und allein ein Fortschreiten eines Amnioninfektionssyndroms bedingen. Eine alternative Erklärung ist eine Koexistenz zweier krankheitsauslösender Keime, die durch den Wegfall eines Partners nicht wesentlich beeinträchtigt wird und sich weiter ausbreitet. Sicher ist allerdings, dass Ureaplasmen als Teil der Intermediärflora regulär bei asymptomatischen Patientinnen nachgewiesen werden können^{11,29}.

Ähnlich wie in vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass bei Patientinnen mit vorzeitigem Blasensprung Ureaplasmen zu den am häufigsten nachweisbaren Keimen gehören, gefolgt von Streptokokken, Staphylokokken und Enterobakterien.

Es scheint sinnvoll, bei gefährdeten Patientinnen eine ergänzende antibiotische Behandlung im klinischen Alltag gegen Ureaplasmen in Erwägung zu ziehen. Ein hierzu alternativer Ansatz wäre es, statt vermehrt antibiotisch zu behandeln, die vaginale Substitution von Lactobazillen zu erwägen. Diese werden aufgrund ihrer wenig ausgeprägten Resistenzrate durch die antibiotische Behandlung ebenso abgetötet und hinterlassen einen freien Raum, der nach Abschluss der Behandlung von virulenten Erregern eingenommen werden kann.

4.4 Limitationen der Arbeit

Bedingt durch das kleine Patientenkollektiv, sind alle getroffenen Aussagen unter Vorbehalt zu betrachten. Die ermittelten Ergebnisse dieser Studie dienen dazu, weiterführende Untersuchungen anzuregen und Methoden zu liefern, um bisherige Erkenntnisse über das AIS und die bakterielle Besiedlung weiblicher Fortpflanzungsorgane zu erweitern und einen Ansatz zur kritischen Betrachtung bisheriger Studienergebnisse zu ermöglichen. Durch ein einheitliches steriles Entnahmeprotokoll konnte ein Werkzeug entwickelt und geprüft werden, dass eine bessere Untersuchbarkeit dieses Forschungsgebietes gewährleistet, aber an einem größeren Fallkollektiv überprüft werden sollte.

Das Studienprotokoll sieht eine Entnahme der Proben nach Durchführung des Abstriches vor. Das ist sinnvoll, da nach dem Begutachten an der unbeschädigten Plazenta alle Oberflächen problemlos abgestrichen werden können. Die Gewebeproben wurden anschließend in der Fallgruppe an makroskopisch vermutlich suspekten Bereichen entnommen und asserviert. Diese Bereiche können als Modell für die Gesamtbeschaffenheit der Plazenta gelten, bilden jedoch in den molekularbiologischen Untersuchungsmethoden nur einen Bruchteil des Gesamtorgans ab. Für eine kostengünstige Diagnostik ist das nicht anders zu realisieren, birgt aber das Risiko, möglicherweise stärker infizierte Bereiche zu übersehen oder trotz makroskopischer Auffälligkeiten in diesem Bereich keine Besiedlung durch Mikroorganismen vorzufinden. Um eine absolute Sicherheit über das Kolonisationsmuster und die Gesamtheit der vorkommenden Mikroorganismen zu erlangen, wäre es notwendig, die vollständige Plazenta inklusive der Gesamtheit der Eihäute molekularbiologisch zu untersuchen. Das ist jedoch aus Zeit- und Kostengründen nicht umsetzbar.

Nicht immer war es möglich, alle Patientinnen, die innerhalb der betrachteten 17 Monate den Kriterien entsprachen und per Sectio caesarea entbunden wurden, einzuschließen. Die Gründe hierfür sind unterschiedlicher Natur und liegen im Arbeitsablauf eines hochfrequentierten Kreißsaals begründet.

Der Erfolg des entwickelten Methodenprotokolls ist im klinischen Alltag nur mit zusätzlichem personellen Aufwand sicherzustellen. Vor Beginn der Studie müssen die Mitarbeiter in den sie betreffenden Arbeitsabläufen geschult werden, damit im Einzelfall die Benachrichtigung des Studienteams nicht unterbleibt. Die behandelnden Ärzte

müssen auf die korrekte Handhabung der Plazenta vor und nach der Lösung hingewiesen werden. Weiterhin ist es notwendig, dass ein Mitglied des Studienteams immer in Rufbereitschaft ist und innerhalb weniger Stunden im Kreißaal eintreffen kann. Der Zeitaufwand zur Begutachtung der Plazenta, Entnahme und Versand der Proben beträgt im Durchschnitt 30 Minuten. Damit die Plazenta steril bleibt, wird ein entsprechender materieller Aufwand nötig. Durch die zusätzliche zeitliche und materielle Belastung ist das Methodenprotokoll im klinischen Alltag ohne eine zusätzliche Arbeitskraft, bereitgestellt durch das Studienteam, aktuell nicht handhabbar.

Im Rahmen der FISH- und PCR-Untersuchungen wurde ein anderes Keimspektrum als in der kulturellen Diagnostik sichergestellt. Somit ist es möglich, dass eine Patientin nach Entbindung auf der Basis der kulturellen Diagnostik antimikrobiell behandelt wird und ein zusätzlich existenter, krankheitsauslösender Keim nicht erfasst werden kann. Es wäre also sinnvoll, zumindest die Ergebnisse der PCR im klinischen Alltag nutzen zu können. Damit hier eine Kontamination vermieden wird, könnte das Methodenprotokoll angepasst werden.

Möglichkeit 1: Entnahme während der Operation

In diesem Fall wäre es möglich, nach der Lösung der Plazenta diese nicht in einen sterilen Behälter zu legen und für eine separate Probenentnahme aufzubewahren. Die Plazenta kann durch den zweiten Assistenten auf einer kleinen sterilen Arbeitsfläche neben dem Operationsfeld platziert werden. Hier besteht die Möglichkeit, Abstriche zu nehmen und mittels sterilen Operationsbestecks die Proben aus suspekten Bereichen der Plazenta zu entnehmen. Die Plazenta wird danach der nicht sterilen OP-Pflegekraft übergeben und zum Versand in die Pathologie vorbereitet. Anschließend unterstützt die zweite Assistenz den Operateur und die erste Assistenz wieder bei der Beendigung der Operation. Kritisch zu sehen ist die eventuell entstehende Wartezeit des Operateurs, die mit einer generell erhöhten Operationszeit sowie einem erhöhten Blutungsrisiko der Patientin einhergehen kann. Der zusätzliche Zeitaufwand ist hierbei mit etwa fünf Minuten anzusetzen, muss aber in einem Versuchsdurchlauf erst validiert werden. Bei den Materialkosten gäbe es keinen Mehraufwand, da das OP-Feld und die OP-Instrumente obligat steril sind. Wird keine zweite Assistenz bei der Sectio caesarea eingesetzt, entfällt diese Variante der Probenentnahme, da das Gefährdungspotenzial

für die Patientin als zu hoch einzustufen ist. Weiterhin wird nicht in allen Kliniken eine Sectio caesarea mit zweitem Assistenten praktiziert.

Möglichkeit 2: Entnahme durch die Hebamme

Die Blutentnahme aus der Nabelschnur zur Bestimmung der kindlichen Blutgruppe und Blutgase ist ein gängiges Verfahren und wird in einem Nebenraum von den Hebammen durchgeführt. Im Rahmen dieses Arbeitsschrittes wäre es möglich, zusätzlich Abstriche und Proben von der Plazenta zu entnehmen. Die Vorbedingungen entsprechen denen des ursprünglichen Methodenprotokolls. Die Plazenta wird mit der Nabelschnurklemme in einen sterilen Behälter verbracht und der Hebamme übergeben, nachdem diese das Neugeborene versorgt hat. Die Hebamme bereitet im Nebenraum einen Tisch mit einem sterilen Abdecktuch vor und kleidet sich ebenfalls steril. Nun ist es möglich, Abstriche zu entnehmen und Proben von Plazenta und Eihäuten zu sichern sowie die Blutentnahme aus der Nabelschnur durchzuführen.

Hierbei ist es notwendig, die Hebammen vorher in den exakten Abläufen zu unterweisen. Eine entsprechende Schulung zur Vermeidung von Kontaminationen wird dabei erforderlich. Die Materialkosten wären ähnlich denen des ursprünglichen Protokolls. Die mit dieser Aufgabe betreute Hebamme ist für den Zeitraum des sterilen Ankleidens und der Probenentnahme nicht abkömmlich, was wiederum einen erhöhten Personalaufwand bedeutet.

Es wäre demnach möglich, ein für den Krankenhausalltag modifiziertes Entnahmeprotokoll zu etablieren, um die Diagnostik der Patientinnen mit AIS zu verbessern. Die Einbeziehung der FISH ist aufgrund der Dauer dieser Untersuchung nicht möglich, da die Patientinnen zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Ergebnisse das Krankenhaus schon verlassen haben könnten. Die PCR-Ergebnisse sind schneller verfügbar als die einer FISH und eines kulturellen Nachweises und könnten das diagnostische Spektrum zum Wohl der Patientinnen deutlich erweitern. Im Gegensatz zu den kulturbasierten Verfahren bieten FISH und PCR jedoch keine Information über das Resistenzspektrum der Mikroorganismen. Diese Information ist im heutigen Klinikalltag wichtiger als noch vor einigen Jahren, da sich einfach und mehrfach resistente Keime rasant ausbreiten. Daher können molekulardiagnostische Methoden nur als ergänzende Verfahren zur kulturellen Diagnostik gesehen werden.

5 Zusammenfassung

Ein Ziel dieser Studie war es, eine Methode zur kontaminationsarmen Gewinnung von Eihaut- und Plazentaprobe zu entwickeln und diese zur Erweiterung bisheriger Kenntnisse zu nutzen. Anhand des Vergleiches der Ergebnisse der Fall- und Kontrollgruppe konnte der Nachweis erbracht werden, dass erfolgreich eine Methode zur sterilen Handhabung der Plazenta und der sterilen Probenbehandlung entwickelt wurde.

Der Einsatz der eEPK zur Prozessdarstellung erlaubt eine detaillierte Handlungsanweisung des Arbeitsablaufes und stellt die gleiche Handhabung der unterschiedlichen Proben sicher. eEPKs ermöglichen jederzeit eine einfache Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Weiterhin war es möglich, durch die parallele Analyse der Proben mittels FISH, PCR, Erregerkultur und Histopathologie ein detailliertes Bild des AIS zu gewinnen und den Einsatz neuer molekularbiologischer Verfahren bei diesem Krankheitsbild erfolgreich zu erproben. Je nach diagnostischem Verfahren konnten unterschiedliche Erregerspektren nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der PCR können als Referenzen gesehen werden und bieten die Möglichkeit des Vergleichs mit Erregerkultur und FISH, um die Genauigkeit dieser Verfahren einzuschätzen. In den Fällen mit Erregernachweis durch PCR war auch histo-pathologisch der Nachweis einer Infekt-bedingten Gewebereaktion zu erbringen. Diese Methode eignet sich gut, um einen genauen Nachweis bakterieller Besiedlung an Plazenta und Eihaut zu erbringen.

Der Einsatz der FISH zur weiterführenden Diagnostik hat sich als erfolgreich erwiesen. In drei von fünf Fällen, in denen durch das benutzte SONDENSET ein Nachweis möglich gewesen wäre, wurde dieser erbracht. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch in der Geburtshilfe der Einsatz der FISH sinnvoll sein kann und bei Erweiterung des eingesetzten SONDENSEKTRUMS und kürzerer Untersuchungszeit eine hilfreiche Möglichkeit der Diagnostik darstellt, die eine genaue Ermittlung der Bakterienspezies ermöglicht.

Der Vergleich klinischer Untersuchungsbefunde mit der verwendeten Diagnostik zeigt, dass das Amnioninfektionssyndrom ein komplexes Krankheitsbild ist, das von weiterer, breit gefächerter Forschung profitiert. Die Ergebnisse zeigen eine in den bisherigen Untersuchungs- und Behandlungsprotokollen diagnostische und therapeutische Lücke

für *Ureaplasma* spp. Mithilfe des entwickelten Entnahmeprotokolls und einer Weiterentwicklung der verwendeten Methoden kann der Stellenwert der Ureaplasmen sowie anderer Mikroorganismen weiterführend untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet* 2012;379:2162-72.
2. Steel JH, Malatos S, Kennea N, et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr Res* 2005;57:404-11.
3. Romero R, Sirtori M, Oyarzun E, et al. Infection and labor. V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:817-24.
4. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science* 2014;345:760-
5. Born to soon: global action report for preterm birthMoD, PMNCH, Save the children, WHO, New York. 2012.
6. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:49-79.
7. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3.
8. Moter A, Göbel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods* 2000;41:85-112.
9. Romero R, Schaudinn C, Kusanovic JP, et al. Detection of a microbial biofilm in intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:135.e1-5.
10. DGGG. Bakterielle Vaginose (BV) in Gynäkologie und Geburtshilfe, S1 Leitlinie. AWMF online; 2013.
11. Donati L, Di Vico A, Nucci M, et al. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 2010;281:589-600.
12. PROJECT E-P. European Perinatal Health Report. 2008.
13. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008;371:75-84.
14. Subramaniam A, Abramovici A, Andrews WW, Tita AT. Antimicrobials for preterm birth prevention: an overview. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2012;2012:157159.
15. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500-7.
16. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG* 2006;113 Suppl 3:17-42.
17. Yoon BH, Romero R, Jun JK, et al. An increase in fetal plasma cortisol but not dehydroepiandrosterone sulfate is followed by the onset of preterm labor in patients with preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1107-14.
18. Miralles R, Hodge R, Kotecha S. Fetal cortisol response to intrauterine microbial colonisation identified by the polymerase chain reaction and fetal inflammation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008;93:F51-4.
19. Romero R, Miranda J, Chaemsaithong P, et al. Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014:1-16.
20. Korn AP, Bolan G, Padian N, Ohm-Smith M, Schachter J, Landers DV. Plasma cell endometritis in women with symptomatic bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 1995;85:387-90.
21. Sadler TW. *Medizinische Embryologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2008.
22. Lockwood CJ, Senyei AE, Dische MR, et al. Fetal fibronectin in cervical and vaginal secretions as a predictor of preterm delivery. *N Engl J Med* 1991;325:669-74.
23. Hawes SE, Hillier SL, Benedetti J, et al. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *J Infect Dis* 1996;174:1058-63.
24. Spiegel CA, Amsel R, Holmes KK. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid. *J Clin Microbiol* 1983;18:170-7.

25. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology* 2004;150:2565-73.
26. Yamamoto T, Zhou X, Williams CJ, Hochwalt A, Forney LJ. Bacterial populations in the vaginas of healthy adolescent women. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2009;22:11-8.
27. Zhou X, Brotman RM, Gajer P, et al. Recent advances in understanding the microbiology of the female reproductive tract and the causes of premature birth. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2010;2010:737425.
28. Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, et al. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG* 2011;118:533-49.
29. Leitich H, Kiss H. Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate flora as risk factors for adverse pregnancy outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007;21:375-90.
30. Usui R, Ohkuchi A, Matsubara S, et al. Vaginal lactobacilli and preterm birth. *J Perinat Med* 2002;30:458-66.
31. Simhan HN, Caritis SN, Krohn MA, Martinez de Tejada B, Landers DV, Hillier SL. Decreased cervical proinflammatory cytokines permit subsequent upper genital tract infection during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:560-7.
32. DiGiulio DB, Gervasi MT, Romero R, et al. Microbial invasion of the amniotic cavity in pregnancies with small-for-gestational-age fetuses. *J Perinat Med* 2010;38:495-502.
33. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One* 2008;3:e3056.
34. Seong HS, Lee SE, Kang JH, Romero R, Yoon BH. The frequency of microbial invasion of the amniotic cavity and histologic chorioamnionitis in women at term with intact membranes in the presence or absence of labor. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:375.e1-5.
35. DiGiulio DB, Romero R, Kusanovic JP, et al. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* 2010;64:38-57.
36. DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012;17:2-11.
37. Jones HE, Harris KA, Azizia M, et al. Differing prevalence and diversity of bacterial species in fetal membranes from very preterm and term labor. *PLoS One* 2009;4:e8205.
38. Onderdonk AB, Delaney ML, DuBois AM, Allred EN, Leviton A, Investigators ELGANES. Detection of bacteria in placental tissues obtained from extremely low gestational age neonates. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:110.e1-7.
39. Harris BA. Peripheral placental separation: a review. *Obstet Gynecol Surv* 1988;43:577-81.
40. MULLER G. [Primary amniotic fluid infection and etiological possibilities]. *Virchows Arch* 1956;328:68-97.
41. Benirschke K, Kaufmann P, Baergen RN. *Pathology of the Human Placenta*. Fifth Edition ed. New York: Springer Science+Business Media, Inc.; 2006.
42. Wolfman WL, Purohit DM, Self SE. Umbilical vein thrombosis at 32 weeks' gestation with delivery of a living infant. *Am J Obstet Gynecol* 1983;146:468-70.
43. Arias F, Victoria A, Cho K, Kraus F. Placental histology and clinical characteristics of patients with preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 1997;89:265-71.
44. Scheer A-W, Nüttgens M, Zimmermann V. *Objektorientierte Ereignisgesteuerte Prozeßkette (oEPK) - Methode und Anwendung*. Institut für Wirtschaftsinformatik Universität des Saarlandes; 1997.
45. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987;51:221-71.
46. Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:1919-25.

47. Wallner G, Amann R, Beisker W. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 1993;14:136-43.
48. Trebesius K, Leitritz L, Adler K, Schubert S, Autenrieth IB, Heesemann J. Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotising fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome by fluorescence in situ hybridisation. *Med Microbiol Immunol* 2000;188:169-75.
49. Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent In situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol* 2000;38:830-8.
50. Gescher DM, Kovacevic D, Schmiedel D, et al. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32 Suppl 1:S51-9.
51. Christensen H, Hansen M, Sorensen J. Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:1753-61.
52. Jansen GJ, Mooibroek M, Idema J, Harmsen HJ, Welling GW, Degener JE. Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 2000;38:814-7.
53. Sunde PT, Olsen I, Göbel UB, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. *Microbiology* 2003;149:1095-102.
54. 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.
55. Zijngje V, van Leeuwen MB, Degener JE, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One* 2010;5:e9321.
56. Gescher DM, Mallmann C, Kovacevic D, et al. A view on Bartonella quintana endocarditis--confirming the molecular diagnosis by specific fluorescence in situ hybridization. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60:99-103.
57. D. von Schöning JK, J. Schulze, A. Petrich, A. Moter, I. Steding, W. Henrich, A. Thomas. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zur Identifikation von Mikroorganismen in Eihäuten beim Amnioninfektionssyndrom. Kongressbeitrag 26. Deutscher Kongress für Perinatale Medizin, Berlin 2013.
58. Koch S. Einführung in das Management von Geschäftsprozessen: Six Sigma, Kaizen und TQM. Frankfurt: Springer Verlag; 2011:272.
59. Kocian C. Geschäftsprozessmodellierung mit BPMN 2.0 Business Process Model and Notation im Methodenvergleich. Neu-Ulm: HNU-Working paper No. 16; 2011:32.
60. Gomez R, Romero R, Nien JK, et al. Antibiotic administration to patients with preterm premature rupture of membranes does not eradicate intra-amniotic infection. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007;20:167-73.
61. Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 2002;292:107-13.
62. Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, et al. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. *Lab Invest* 2009;89:924-36.

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ina Steding, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Das Amnioninfektionssyndrom: Molekularbiologische Identifikation von Mikroorganismen an Eihäuten“ 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 (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) 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 (s.o.) 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.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Ina Steding hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: D. von Schöning, J. Kikhney, J. Schulze, A. Petrich, A. Moter, I. Steding, W. Henrich, A. Thomas (2013) Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zur Identifikation von Mikroorganismen in Eihäuten beim Amnioninfektionssyndrom. Kongressbeitrag 26. Deutscher Kongress für Perinatale Medizin, Berlin

Beitrag im Einzelnen: Erhebung der benötigten Daten und Materialien

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8 Lebenslauf

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

9 Danksagung

Ich danke Frau PD Dr. med. Thomas für ihre sehr gute Betreuung und immerwährende Unterstützung im Entstehungsprozess dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich Frau Dr. med. von Schöning für ihre Ratschläge und Hinweise danken, ohne die meine Dissertation in ihrer jetzigen Form nicht vorliegen würde.

Ebenso danke ich der Arbeitsgruppe des Biofilmzentrums des Deutschen Herzzentrums Berlin um Frau PD Dr. Moter für die wissenschaftliche Beratung und die sorgfältige Bearbeitung der entnommenen Plazenta- und Eihautproben.

Die Erarbeitung der Darstellung des Methodenprotokolls, die Entnahme der Proben zu jeder Tages- und Nachtzeit und der Entstehungs- und Schreibprozess dieser Dissertation wären nicht möglich gewesen ohne die geduldige Unterstützung meines Ehemannes und meiner Eltern.