

Aus der medizinischen Poliklinik (CCM)
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Veränderungen der urogenitalen Mikroflora bei Patienten mit chronisch
entzündlichen Darmerkrankungen

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

Vorgelegt der medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von Johannes Schilling
aus
Pirmasens

Datum der Promotion: 27.02.2015

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	8
Zusammenfassung	9
1 Einleitung	13
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	13
1.1.1 Geschichtliches zur Colitis ulcerosa	13
1.1.2 Geschichtliches zum Morbus Crohn	14
1.1.3 Epidemiologie der CED	14
1.1.4 Ätiologie und Pathogenese	15
1.1.5 Diagnostik	17
1.1.6 Klinisches Bild bei CED	17
1.1.7 Therapie der CED	20
1.2 Intestinale Mikroflora bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	21
1.2.1 Mukosale Flora	21
1.2.2 Fäkale Flora	21
2 Herleitung der Aufgabenstellung	23
3 Methodik	24
3.1 Patienten und Probanden	24
3.1.1 Erfasste Daten	24
3.1.2 Scores zur Erfassung der Krankheitsaktivität	26
3.2 Verblindung	29
3.3 Probenpräparation	29
3.4 Hybridisierungen	29
3.4.1 Vorbereitungen für die Hybridisierungen	29
3.4.2 Oligonukleotidsonden	30

3.4.3	Hybridisierungen	31
3.5	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Mikroskopie	32
3.5.1	Funktionsweise	32
3.5.2	Zellen	33
3.5.3	Bakterien	34
3.5.4	Pilze	36
3.5.5	Fotodokumentation	36
3.6	Statistik	36
3.7	Materialien und Geräte	37
4	Ergebnisse	39
4.1	Zellen	39
4.1.1	Epithelzellen	39
4.1.2	Leukozyten	40
4.2	Pilze	41
4.3	Bakterielle Besiedlung	42
4.3.1	Gesamtkonzentration der Bakterien	42
4.3.2	Diffus verteilte Bakterien	43
4.3.3	Adhärente Bakterien	44
4.3.4	<i>Gardnerella vaginalis</i> Biofilm	47
4.3.5	Semiquantitative Bestimmung einzelner Bakteriengruppen	52
5	Diskussion	61
5.1	Methodenkritik	61
5.1.1	Patientenauswahl	61
5.1.2	Verwendete Proben	61
5.1.3	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	62
5.1.4	Mikroskopie	63
5.2	Diskussion der Ergebnisse	63
5.2.1	Konzentrationen von Epithelzellen und Leukozyten	63
5.2.2	Gesamtbakterienkonzentration	63
5.2.3	Semiquantitative Konzentrationen einzelner bakterieller Subgruppen	64
5.2.4	Nachweis von Pilzen	64
5.2.5	Bakterielle Vaginose	64
5.2.6	<i>Gardnerella vaginalis</i> Biofilm und CED	66
5.2.7	Alter und <i>Gardnerella vaginalis</i> Biofilme	70
5.2.8	CED und Frühgeburtlichkeit	70
	Literaturverzeichnis	72

Anhang	82
Danksagung	86
Lebenslauf	87
Eigene Publikationen	88
Eidesstattliche Versicherung	90

Abbildungsverzeichnis

1.1	Mukosale Flora bei CED	22
3.1	Altersverteilung der Gruppen	25
3.2	Mechanismus von FISH	30
3.3	Aufflicht-Fluoreszenzmikroskopie	33
3.4	Differenzierung von Epithelzellen und Leukozyten	34
4.1	Epithelzellenkonzentrationen - Gruppen insgesamt	39
4.2	Leukozytenkonzentrationen – Gruppen insgesamt	41
4.3	Pilzmorphologie in DAPI	42
4.4	Gesamtbakterienkonzentration – Gruppen insgesamt	43
4.5	Konzentrationen der diffus verteilten Bakterien – Gruppen insgesamt	44
4.6	Konzentrationen der adhärennten Bakterien – Gruppen insgesamt	45
4.7	Adhärennte <i>Gardnerella vaginalis</i> mit DAPI-Gegenfärbung	45
4.8	Prozentualer Anteil der biofilmbehafteten Epithelzellen nach Diagnose	46
4.9	Epithelzellen mit anhaftendem Biofilm	48
4.10	Räumliche Verteilung von <i>Enterobacteriaceae</i>	53
4.11	Semiquantitative <i>Enterobacteriaceae</i> -Konzentrationen	53
4.12	Räumliche Verteilung von <i>Bifidobacteriaceae</i> und <i>Gardnerella vaginalis</i>	54
4.13	Räumliche Verteilung von <i>Bifidobacteriaceae</i>	55
4.14	Semiquantitative <i>Bifidobacteriaceae</i> -konzentrationen	55
4.15	Semiquantitative <i>Atopobium vaginae</i> -Konzentrationen	56
4.16	Räumliche Verteilung von <i>Lactobacillen</i>	57
4.17	Semiquantitative <i>Lactobacillen</i> -Konzentrationen	58
4.18	Räumliche Verteilung von Streptokokken	59
4.19	Semiquantitative Streptokokkenkonzentrationen	59
4.21	Semiquantitative <i>Bacteroides</i> -Konzentrationen	60
4.20	<i>Bacteroides</i> -Biofilm	60
5.1	Adhärenter <i>Gardnerella vaginalis</i> Biofilm auf Vaginalepithel	66

5.2 Adhärenter <i>Gardnerella vaginalis</i> Biofilm auf desquamierten Epithelzellen bei bakterieller Vaginose	67
--	----

Tabellenverzeichnis

1.1	Häufige extraintestinale Manifestationen bei CED	18
1.2	Häufigkeit klinischer Symptome bei CED im Vergleich	19
3.1	Patientendaten	26
3.2	Crohn's Disease Activity Index (CDAI)	27
3.3	Colitis Activity Index (CAI)	28
3.4	Oligonukleotidsonden	31
3.5	Sondenkombinationen	32
3.6	Hybridisierungs- und Waschlösung	32
3.7	Semiquantitative Bestimmung der bakteriellen Subpopulationen	36
3.8	Geräte	37
3.9	Verbrauchsmaterialien	38
3.10	Reagenzien	38
3.11	Software	38
4.1	Epithelzellenkonzentrationen - nach Geschlechtern	39
4.2	Leukozytenkonzentrationen - nach Geschlechtern	41
4.3	Gesamtbakterienkonzentration - nach Geschlechtern	43
4.4	Konzentrationen der diffus verteilten Bakterien - nach Geschlechtern	44
4.5	Konzentrationen der adhärenenten Bakterien - nach Geschlechtern	45
4.6	<i>Gardnerella</i> -Biofilm, beide Geschlechter	47
4.7	<i>Gardnerella</i> -Biofilm, nur Patientinnen und Probandinnen	47
4.8	Patientendaten	49
4.9	Chronisch aktiver Verlauf und <i>Gardnerella vaginalis</i> Biofilme	50
4.10	Orale Glucocorticoideinnahme und <i>Gardnerella vaginalis</i> Biofilme	51
7.1	Oligonukleotidsonden mit Sequenz	83
7.2	Standardgewicht von Erwachsenen	84

Abkürzungsverzeichnis

χ	Chi
λ	Lambda, Symbol für die Wellenlänge elektromagnetischer Wellen
5-ASA.....	5-Aminosalicylsäure
aqua dest.....	Destilliertes Wasser
BV.....	Bakterielle Vaginose
CAI.....	Colitis Activity Index
CARD15.....	Caspase activation and recruitment domain 15
CDAI.....	Crohn's Disease Activity Index
CED.....	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CLASI-FISH.....	Combined-labeling-and-spectral-imaging-FISH
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT.....	Computertomographie
CU.....	Colitis ulcerosa
Cy3.....	Ein Cyaninfarbstoff
Cy5.....	Ein Cyaninfarbstoff
DAPI.....	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
DOPE-FISH.....	Double-labeling-of-oligonucleotide-probes-FISH
E. coli.....	Escherichia coli
ECCO.....	European Crohn's and Colitis Organisation
FISH.....	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC.....	Fluorescein Isothiocyanat
GERD.....	Refluxkrankheit, Gastroesophageal reflux disease
GIT.....	Gastrointestinaltrakt
HCl.....	Salzsäure; Chlorwasserstoffsäure
Hg.....	Quecksilber
Hk.....	Hämatokrit
HPLC.....	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IBS.....	Irritable bowel syndrome; Reizdarmsyndrom
JPEG.....	Graphikformat nach der Norm der Joint Photographic Experts Group
M.....	Molar, mol/l

MAP	Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis
MC	Morbus Crohn
MRT	Magnetresonanztomographie
MTX	Methotrexat
NaCl	Natriumchlorid; Kochsalz
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
p-Wert	Signifikanzwert, probability value
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SD	Standard deviation; Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumlaurylsulfat
SPSS	Statistical package for the social sciences
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tris-HCl	Trisaminomethan-Hydrochlorid
°C	Grad Celsius
ÖGD	Ösophago-Gastro-Duodenoskopie

Zusammenfassung

Titel: Veränderungen der urogenitalen Mikroflora bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Autor: Johannes Schilling

Einleitung: Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) beschreiben systemisch-entzündliche Erkrankungen, die nicht nur den Gastrointestinaltrakt, sondern den gesamten Organismus betreffen. Es wurde in vorangehenden Studien gezeigt, dass eine gestörte intestinale epitheliale Barrierefunktion einen wichtigen Faktor in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Erkrankungen darstellt. Da es bislang keine Studien gibt, die die Möglichkeit einer veränderten urogenitalen mikrobiellen Flora bei CED untersuchten, war das Ziel zu untersuchen ob spezifische Änderungen in der urogenitalen mikrobiellen Flora bei Patienten mit CED nachweisbar sind.

Methodik: Es wurden Patienten mit einem Morbus Crohn (N=42), mit einer Colitis ulcerosa (N=46) und zufällig ausgewählte Patienten, die die Medizinische Poliklinik der Charité aus anderen Gründen als einer CED aufsuchten (N=49), in die Studie eingeschlossen. Von den Teilnehmern der Studie wurden als klinische Daten unter anderem Alter, Geschlecht, aktuelle Medikation, mögliche steroidabhängige/-refraktäre Verläufe, Fisteln, primär sklerosierende Cholangitis und die aktuelle Krankheitsaktivität erfasst. Es wurden Carnoy-fixierte Urinproben auf die Konzentration an Epithelzellen, Leukozyten, Pilzen sowie auf Epithelzellen adhärenente Bakterien und auf diffus verteilte Epithelzellen mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung untersucht. Hierfür wurden 7 rRNA-basierte Oligonukleotidsonden verwendet.

Ergebnisse: Die Urinproben von Patienten mit einer CED enthielten signifikant häufiger für eine bakterielle Vaginose typische adhärenente *Gardnerella vaginalis* Biofilme (MC 38%, CU 43%) als die Proben der Kontrollgruppe (16%). Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der gegenwärtigen Krankheitsaktivität, der Diagnose einer primär sklerosierenden Cholangitis, dem Auftreten von Fisteln und dem Nachweis eines *G. vaginalis* Biofilms gezeigt werden. Die Proben der Patienten mit einem steroidrefraktären oder

-abhängigen Verlauf enthielten signifikant häufiger adhärenente *G. vaginalis* Biofilme als Proben von Patienten ohne einen solchen Verlauf. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von Epithelzellen, Leukozyten und der gesamt bakteriellen Konzentration nachgewiesen werden. Weiterhin konnte kein Unterschied zwischen der MC-, der CU- und der Kontrollgruppe bezüglich der semiquantitativen Konzentrationen von *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Bacteroidaceae* und *Streptococcus* gezeigt werden.

Diskussion: Die Studie zeigte eine signifikante Korrelation zwischen CED und einem für eine bakterielle Vaginose typischen *G. vaginalis* Biofilm. Diese Beobachtung legt eine Störung der epithelialen Barriere des Urogenitaltrakts nahe, die mit der Dysfunktion der intestinalen Epithelbarriere vergleichbar ist. Da *G. vaginalis* als der wichtigste Faktor für die Entwicklung einer bakteriellen Vaginose gilt, könnte die höhere Rate an *G. vaginalis* Biofilmen bei CED-Patienten ein Faktor für das erhöhte Frühgeburtsrisiko bei CED-Patientinnen sein. Der höhere Anteil von *G. vaginalis* Biofilmen bei CED-Patienten mit einem steroidrefraktären oder -abhängigen Verlauf geben einen Hinweis eine Langzeittherapie mit Glucocorticoiden nach Möglichkeit zu vermeiden.

Abstract

Introduction: Inflammatory bowel disease (IBD) is a systemic inflammatory condition that affects the entire organism, not only the bowel. A disturbed epithelial barrier function and an impaired interaction with gastrointestinal microbiota has been shown to be an important factor for the disease in several studies. Since there is no study that has analyzed a possible alteration of urogenital microbiota in IBD we wanted to investigate if there are specific changes in the urogenital microbiota of patients with IBD.

Methods: Patients with Crohn's disease (N = 42), ulcerative colitis (N = 46), and randomly selected patients attending the General Internal Medicine Outpatient Clinic of the Charité for non-IBD related medical conditions (N = 49) were included in this study. Clinical data including age, sex, medication, possible steroid refractory/dependent disease, history of fistula, primary sclerosing cholangitis and current disease activity were obtained. Carnoy fixated urine specimens of the participants were analyzed for epithelial cells, leucocytes, fungi, bacteria adherent to desquamated epithelial cells and diffusely distributed bacteria in the urine using fluorescence in situ hybridization with 7 rRNA-based oligonucleotide probes.

Results: The urine samples of IBD patients contained significantly more often *Gardnerella vaginalis* biofilms (CD 38%, UC 43%) typical for bacterial vaginosis than those of the control group (16%). There was no significant link between current disease activity, primary sclerosing cholangitis, history of and present fistula and *G. vaginalis* biofilms. The samples of patients with steroid refractory/dependent disease were significantly more often *G. vaginalis* biofilm positive than those of patients without steroid refractory/dependent disease. No significant differences in number of epithelial cells and leukocytes, and total bacterial counts were present. Furthermore there were no significant differences in the semiquantitative concentration of *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Bacteroidaceae* and *Streptococcus* were found.

Conclusions: There is a significant correlation between IBD and *G. vaginalis* biofilm typical for bacterial vaginosis. This observation suggests an epithelial barrier dysfunction of the genital tract comparable to the impaired intestinal epithelial barrier function in IBD. Since

G. vaginalis is believed to be the most important reason responsible for bacterial vaginosis, the higher rate of *G. vaginalis* biofilms may be an important factor in the well-known higher incidence of poor reproductive outcome in IBD. Excessive *G. vaginalis* biofilms in steroid refractory/dependent disease suggests a need to avoid long-term steroid therapy.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Der Begriff „chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)“ subsummiert die Krankheitsbilder Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sowie einige weitere, seltene Erkrankungen.¹ Morbus Crohn und Colitis ulcerosa unterscheiden sich im klinischen Erscheinungsbild, dem pathohistologisch erfassbaren Befallsmuster, den genetischen Veränderungen, der intestinalen mikrobiellen Besiedlung und vielen weiteren Punkten. Was sie eint ist, dass bei beiden eine in Schüben verlaufende, chronische Entzündung des Gastrointestinaltrakts nachweisbar ist. Außerdem haben sich bei beiden Erkrankungen die pathophysiologischen Vorstellungen und Modelle in den letzten Jahren massiv geändert.¹

1.1.1 Geschichtliches zur Colitis ulcerosa

Im Jahr 1859 wurde von Sir Samuel Wilks erstmals der Begriff „Colitis ulcerosa“ eingeführt, auch wenn sich der von Wilks beschriebene Fall später als Morbus Crohn herausstellte.^{2,3} Dennoch gab es schon vorher Einzelberichte, wie zum Beispiel von Matthew Baille aus dem Jahr 1793, über Patienten, die in der Rückschau wohl an den Folgen einer Colitis ulcerosa gestorben waren. Die erste etwas genauere Charakterisierung der Colitis ulcerosa gelang Samuel Wilks und Walter Moxon im Jahr 1875. Es folgten weitere Berichte und Charakterisierungen, so zum Beispiel von Allchin (1885) und Hale-White (1888).^{2,3} Schon einige Zeit später, im Jahr 1909, entdeckte Lockhart-Mummery mithilfe der neuen elektrisch beleuchteten Sigmoidoskopie die Assoziation von Colitis ulcerosa und Kolonkarzinomen.

Bei der Suche nach der Ätiologie wurden Nahrungsmittel- und Pollenallergien genauso diskutiert wie psychiatrische Ursachen. Als sich dann zeigte, dass Sulfonamide und Penicillin die klinischen Symptome besserten, rückte die Möglichkeit einer bakteriellen Infektion in den Fokus der Diskussion. Dies änderte sich erst in den 1950er Jahren als mit dem Aufkommen von Steroiden vermehrt immunologische Ursachen diskutiert wurden.³

Wie auch der Morbus Crohn wird die Colitis ulcerosa inzwischen als eine Multisystemerkrankung gesehen, die beispielsweise mit der primär sklerosierender Cholangitis (PSC) assoziiert ist⁴ und, wenn auch etwas seltener als der Morbus Crohn, extraintestinale Manifestationen zeigt.⁵

1.1.2 Geschichtliches zum Morbus Crohn

Der Begriff Morbus Crohn geht auf den amerikanischen Arzt Burrill B. Crohn zurück, der im Jahr 1932 gemeinsam mit zwei anderen Kollegen das Krankheitsbild einer „regional ileitis“ (später: „Ileitis terminalis“) erstmals anhand von 14 Fällen beschrieb. Crohn stellte hier sowohl die führenden klinischen Symptome, also den Verlust von Körpergewicht, Fieber, Diarrhoe und abdominelle Schmerzen, als auch die pathologischen Befunde wie Stenosen und folgend multiple Fisteln heraus. Auch Begleitsymptome wie die Anämie, die Obstipation und ein auffälliger Palpationsbefund wurden hier dargelegt.⁶

Allerdings wurden schon vor Crohns Publikation krankheitstypische Veränderungen beschrieben. So veröffentlichte beispielsweise der polnische Pathologe Antoni Lesniowski eine Reihe von Artikeln, in denen er auf eine Serie von Fällen hinwies, die durch einen chronischen Entzündungsprozess im terminalen Ileum charakterisiert waren, sodass der Morbus Crohn in Polen auch als Morbus Lesniowski-Crohn bekannt ist.^{7,8} Auch davor waren in Autopsiestudien Befunde aufgefallen, die in der Rückschau an die Symptomatik des Morbus Crohn erinnern. Kirsner weist in seiner Beschreibung der geschichtlichen Entwicklung der Erforschung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hier beispielhaft auf die Darlegungen von Fabry (1612) und Morgagni (1769) hin.⁹

Nach Dr. Burrill Crohn konnte gezeigt werden, dass der Morbus Crohn nicht nur das Ileum, sondern den gesamten Gastrointestinaltrakt befällt und darüber hinaus auch extraintestinale Manifestationen auftreten.⁵ Es wurden immunologische Besonderheiten¹ und Veränderungen in der bakteriellen Besiedlung¹⁰ entdeckt sowie neue Therapiekonzepte entwickelt. Vor allem die Ätiologie des Morbus Crohn wurde und wird sehr kontrovers diskutiert, Autoimmunprozesse, bakteriell-infektiöse Ursachen, Infektionen mit *Mycobacterium avium paratuberculosis* und intestinale Maserninfektionen werden unter anderem vermutet.

Trotz allem sind weder Ätiologie noch Pathogenese abschließend geklärt und keine endgültige Heilung möglich.

1.1.3 Epidemiologie der CED

Sowohl der Morbus Crohn, als auch die Colitis ulcerosa zeigen eine unterschiedliche Inzidenz abhängig von der geographischen Lokalisation. So zeigt sich im Norden Europas eine deutlich höhere Inzidenz als im Süden.¹¹ Die Inzidenz im Süden Europas scheint zu steigen während sie sich in Nordeuropa stabilisiert hat.¹¹ In Deutschland zeigt sich, je nach Quel-

le, eine Inzidenz von ca. 3-6/100.000 für den Morbus Crohn, bzw. von ca. 3-5/100.000 für die Colitis ulcerosa.^{11,12,13} Bei beiden Krankheitsbildern liegt die höchste altersadaptierte Inzidenz im jungen Erwachsenenalter.¹¹ Die meisten Studien geben an, dass etwas mehr Männer als Frauen an der Colitis ulcerosa erkranken. Bei dem Morbus Crohn wird angegeben, dass geringfügig mehr Frauen erkranken, bzw. dass die Krankheit beide Geschlechter gleich häufig betrifft.¹⁴

Auch volkswirtschaftlich ergibt sich aufgrund des chronischen Charakters der Erkrankungen ein erhebliches Problem. Eine Studie in den skandinavischen Ländern ergab beispielsweise, dass krankheitsbedingte Fehlzeiten mit mehr als 30 % zu den Gesamtkosten der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beitragen. Zudem erhalten 15 % der Morbus Crohn Patienten nach 15 Jahren Krankheitsdauer eine Behindertenrente.¹⁵

1.1.4 Ätiologie und Pathogenese

Bei beiden maßgeblichen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind Ätiologie und Pathogenese trotz umfangreicher Forschung nicht abschließend geklärt. Derzeitig wird angenommen, dass es über eine Störung der intestinalen Barriere zu den Entzündungsreaktionen kommt, die letztendlich für das Krankheitsbild charakteristisch sind. Auch autoimmune Aspekte werden diesbezüglich in der Pathogenese diskutiert. Nachfolgend werden einzelne Punkte der Ätiologie von dem Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa näher beleuchtet.

Genetische Faktoren

Die Ursachen der Barrierestörung werden kontrovers diskutiert. Ein Faktor scheint eine genetische Prädisposition zu sein. Es lassen sich beispielsweise bei dem Morbus Crohn mit 35 %-58 % bei monozygoten Zwillingen im Vergleich zu 0 %-12 % bei dizygoten Zwillingen deutlich höhere Konkordanzraten nachweisen.^{16,17} Bei der Colitis ulcerosa lassen sich niedrigere Konkordanzraten nachweisen (monozygot: 6 %-16 % , dizygot: 0 %-5 %),^{16,17,18} was auf einen schwächeren genetischen Einfluss auf die Pathogenese als bei Morbus Crohn hinweist. Dennoch bleibt eine positive Familienanamnese sowohl beim Morbus Crohn, als auch bei der Colitis ulcerosa ein erheblicher Risikofaktor.¹⁸

Genetische Faktoren in verschiedenen ethnischen Gruppen scheinen unterschiedlich schwer zu wiegen. Yang et al. konnten beispielsweise zeigen, dass Juden, die einen CED-Patienten in ihrer Verwandtschaft ersten Grades haben, ein höheres Risiko haben, an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zu erkranken, als ein vergleichbares nicht-jüdisches Kontrollkollektiv.¹⁹ Außerdem ist die Prävalenz der CED in bestimmten Gruppen der jüdischen Bevölkerung im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung deutlich erhöht.¹⁹

In den letzten Jahren wurden auch einzelne Genmutationen, die mit CED assoziiert sind, identifiziert. Das bekannteste ist wohl das 2001 entdeckte NOD2 / CARD15-Gen auf Chromosom 16, dessen Mutationen mit dem Morbus Crohn assoziiert sind.²⁰ Hier zeigt

sich, dass Menschen mit homozygoten oder komplex-heterozygoten Mutationen des Gens ein 23- bis 44-fach erhöhtes Risiko haben, an einem Morbus Crohn zu erkranken.^{21,22} Auch heterozygot Betroffene haben ein erhöhtes Risiko zu erkranken, während NOD2-Mutationen keinen Einfluss auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit an einer Colitis ulcerosa haben.^{21,22} NOD2-Mutationen spielen sogar eine noch weitergehende Rolle, da sie nicht nur das Risiko zu erkranken erhöhen, sondern auch mit einem komplizierteren Verlauf und einer höheren Operationswahrscheinlichkeit assoziiert sind.²³

NOD2 ist bei Weitem nicht der einzige Genlocus, dessen Mutationen mit dem Morbus Crohn assoziiert sind, inzwischen sind mehr als 70 andere Genloci identifiziert worden, wobei man die Funktion der meisten Gene nicht kennt.²⁴ Wie bei dem Morbus Crohn wurden auch bei der Colitis ulcerosa in den vergangenen Jahren immer mehr Genloci gefunden, die mit der Erkrankung verbunden sind, sodass inzwischen 99 Loci bekannt sind, die mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert sind. Darunter sind ca. 30 Loci, deren Mutationen sowohl bei Morbus-Crohn-Patienten als auch bei Colitis-ulcerosa-Patienten gehäuft auftreten.²⁵

Zusammenfassend kann man sagen, dass genetische Faktoren in der Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine erhebliche Rolle spielen. Allerdings sind genetische Alterationen bei Weitem nicht der einzige Faktor, wie die Konkordanzraten bei monozygoten Zwillingen zeigen, die mit 35 %-58 % beim Morbus Crohn und 6 %-16 % bei der Colitis ulcerosa weit unter 100 % liegen. Diagnostisch werden Tests auf Mutationen in Risikogenen bislang nicht empfohlen, da sich zwar Tendenzen bezüglich Erkrankungswahrscheinlichkeit und -schwere zeigen, allerdings keine individuelle Prognose gegeben werden kann.^{26,27,28,29}

Exogene Faktoren

Unabhängig von einer genetischen Prädisposition existieren eine Reihe weiterer Risikofaktoren, die das Auftreten von CED begünstigen. Einer der wichtigsten allgemein akzeptierten Faktoren ist sicherlich das Rauchen, das die Erkrankungswahrscheinlichkeit und Schwere des Morbus Crohn erhöht, während es sich protektiv auf die Colitis ulcerosa auswirkt.^{26,28}

Auf der anderen Seite gibt es Hinweise, dass auch die Ernährung und der Lebensstil eine erhebliche Rolle spielen. Hier fällt besonders ins Auge, dass sich die Prävalenz von CED bei Immigranten derjenigen der neuen Heimat angleicht.³⁰ Ebenso fiel auf, dass die traditionell niedrigere Prävalenz von CED in Asien in den letzten Jahrzehnten anstieg, was mit der Einführung des „Western life-style“ in Verbindung gebracht wird.³⁰

Infektiöse Ursachen werden, wie oben bereits erwähnt, immer wieder intensiv diskutiert, wobei atypische Mykobakterien (*Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*; MAP) beim Morbus Crohn im Mittelpunkt der Betrachtung stehen.³¹ Allerdings gibt es eine Studie, die nach einer zweijährigen antimykobakteriellen Therapie keine klinische Besserung im

Vergleich zur Placebogruppe zeigen konnte.³²

Für eine infektiöse Komponente spricht, dass Mäuse und Ratten, die keimfrei aufgezogen wurden und deshalb keine intestinale Mikroflora hatten, keine Colitis entwickelten.³³ Die klinische Symptomatik von Patienten im Schub bessert sich ebenfalls, wenn diese Antibiotika erhalten.³⁴

1.1.5 Diagnostik

Die Diagnose einer CED wird in der Zusammenschau von vielen Befunden gestellt. Zur Diagnosestellung werden insbesondere die Anamnese, die klinische Untersuchung, die Endoskopie und die histopathologische Untersuchung herangezogen. Aber auch laborchemische Untersuchungen, die transabdominelle Sonographie und mikrobiologische Analysen haben ihren festen Platz in der initialen Diagnostik von CED.^{26,27,28,29}

Bestimmte Konstellationen, wie zum Beispiel das Auftreten von Symptomen, die für eine Beteiligung des oberen Gastrointestinaltrakts (GIT) sprechen, können weitergehende Untersuchungen notwendig machen. Beispielsweise können eine Kapselendoskopie des Dünndarms, eine Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD) oder eine Schnittbildgebung mit MRT oder CT eingesetzt werden.^{26,27,28,29}

1.1.6 Klinisches Bild bei CED

Morbus Crohn

Im Gegensatz zu einer Colitis ulcerosa kann sich ein Morbus Crohn im gesamten Gastrointestinaltrakt (GIT) manifestieren und zeigt hierbei einen diskontinuierlichen Verlauf.³⁵ Pathohistologisch ist der Morbus Crohn durch eine transmurale Entzündung, einer ödematösen Verbreiterung der Submukosa und durch intramurale Granulome gekennzeichnet.²⁶

Die klinischen Symptome des Morbus Crohn können sehr vielfältig sein, dennoch lassen sich eine chronische Diarrhoe, ein Gewichtsverlust und abdominelle Schmerzen als Leitsymptome identifizieren.^{26,27} Trotz allem treten auch andere Symptome häufig auf, so können beispielsweise erhöhte Körpertemperaturen, blutige Stühle und eine Anämie auf eine aktive Phase des Morbus Crohn hinweisen. Welche der Symptome auftreten hängt stark davon ab, in welchem Abschnitt des Verdauungssystems sich die Erkrankung zeigt und inwieweit bereits chronische Veränderungen des Verdauungstraktes aufgetreten sind.³⁵

Der Morbus Crohn ist nicht nur eine Erkrankung des Gastrointestinaltraktes, sondern vielmehr eine Multiorganerkrankung. Deutlich wird das, wenn man die extraintestinalen Manifestationen der Erkrankung betrachtet. Am häufigsten sind hierbei die Haut, die Augen und das muskuloskelettale System betroffen (s. a. Tabelle 1.1). Andere Organe, wie zum Beispiel die Niere, die Lunge und das Pankreas können jedoch ebenso pathologisch verändert sein.^{36,37}

Tabelle 1.1: Häufige extraintestinale Manifestationen bei CED

<i>Extraintestinale Manifestation</i>	<i>Betr. MC-Patienten</i>	<i>Betr. CU-Patienten</i>
<i>muskuloskelettales System</i>		
periphere inflamm. Arthropathien ^{36, 37, 39, 40}	10 % – 35 %	5 % – 21 %
Arthropathien der Wirbelsäule ³⁹	5 % – 22 %	2 % – 6 %
Osteoporose ^{36, 37}	MC und CU: 2 % – 30 %	
<i>Haut</i>		
Erythema nodosum ³⁷	MC und CU: 2 % – 20 %	
Pyoderma gangraenosum ^{36, 37}	MC und CU: 0,5 % – 2 %	
<i>Augen</i>		
Iritis ³⁷	MC und CU: bis zu 17 %	
Uveitis ³⁶	MC und CU: 0,5 % – 3 %	

Der Verlauf des Morbus Crohn wird oft durch Komplikationen erschwert, welche häufig als Fisteln, die durch die transmurale Entzündung bedingt werden, imponieren. Ebenso kann es durch die chronische Entzündung zu Strikturen und Abszessen kommen. Die erwähnten Strikturen und der Entzündungsprozess können zudem zu Passagehindernissen führen, die als Obstipation bis zum Ileus imponieren können. Außerdem ist das Kolonkarzinomrisiko im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht, wenn auch nicht so stark wie das Risiko bei Colitis ulcerosa-Patienten. Alle erwähnten Komplikationen kommen besonders dann gehäuft vor, wenn nicht nur das Ileum, sondern auch das Kolon betroffen sind.^{27, 35}

Durch die klinischen Symptome alleine ist es oft schwierig, die Krankheitsbilder des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa gegeneinander abzugrenzen. Selbst in der Kombination mit anderen Diagnoseverfahren muss die Diagnose in den Jahren nach der Erstdiagnose teilweise nochmals geändert werden.^{26, 28} Trotzdem gibt es einige Symptome, die typischer für den Morbus Crohn sind und andere, die typischer für eine Colitis ulcerosa sind. Einige häufige klinische Symptome von dem Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa sind in Tabelle 1.2 im Vergleich aufgeführt.

Um die Krankheitsaktivität im Verlauf nachvollziehbar beurteilen zu können, hat sich der Crohn's disease activity index (CDAI) nach Best in der Klinik, aber vor allem auch in der klinischen Forschung durchgesetzt.³⁸

Colitis ulcerosa

Colitis ulcerosa beginnt im Gegensatz zum Morbus Crohn im Rektum und breitet sich dann in die proximalen Colonabschnitte aus. Dabei wird nur das Colon befallen und es kann

Tabelle 1.2: Häufigkeit klinischer Symptome bei CED im Vergleich.
Modifiziert nach Baumgart.³⁵

<i>Klinisches Symptom</i>	<i>MC-Patienten</i>	<i>CU-Patienten</i>
Hämatochezie	selten	häufig
Ausscheidung von Pus oder Mucus	selten	häufig
Manifestation im Dünndarm	ja	höchstens Backwash-Ileitis
Manifestation im oberen GIT	ja	nein
Abdominelle Resistenz	manchmal	selten
Extraintestinale Manifestation	häufig	häufig
Obstruktion	häufig	selten
Fisteln	häufig	nie

allenfalls zu einer sogenannten „Backwash-Ileitis“ kommen. Die Entzündung kann bei der Colitis ulcerosa als kontinuierlich beschrieben werden und zeichnet sich histopathologisch durch eine Kryptenatrophie und -abszesse, sowie durch eine Plasmozytose aus.^{28,29}

Betroffene Patienten präsentieren sich häufig mit einer klinischen Symptomatik, die durch blutig-schleimige Durchfälle und krampfartige Schmerzen beim Stuhlgang bestimmt wird.^{28,35} Auch andere Symptome, wie beispielsweise febrile Temperaturen oder eine Anämie können sich bei CU-Patienten zeigen (s.a. Tabelle 1.2).³⁵

Die Colitis ulcerosa manifestiert sich, wie auch der Morbus Crohn, häufig auch extraintestinal (s. a. Tabelle 1.1). Sie weist allerdings weniger häufig eine Mitbeteiligung des muskuloskelettalen Systems auf.^{36,37,39,40} Außer den in Tabelle 1.1 genannten extraintestinalen Manifestationen ist vor allem die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) zu nennen, die stark mit der Colitis ulcerosa assoziiert ist und zu einer entzündungsbedingten Sklerose der Gallenwege führt. Der Anteil der Colitis-ulcerosa-Patienten mit PSC beläuft sich auf 2%–10%.^{4,29}

Zusätzlich zu den bereits erwähnten extraintestinalen Manifestationen bei der Colitis ulcerosa kann es im Verlauf zu Komplikationen durch die Krankheit selbst oder durch die eingenommenen Medikamente kommen. Bei diesen Komplikationen steht ein erhöhtes Risiko an einem Kolonkarzinom zu erkranken im Vordergrund. So liegt die Prävalenz des Kolonkarzinoms bei CU-Patienten deutlich über der Prävalenz der Normalbevölkerung.⁴¹ Liegt zusätzlich zu einer Colitis ulcerosa noch eine PSC vor, so ist das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken nochmals deutlich erhöht.⁴¹

Im Gegensatz zum Morbus Crohn konnte sich bei der Colitis ulcerosa kein Score zur Beurteilung der Krankheitsaktivität durchsetzen, vielmehr richtet sich die Therapie nach den klinischen Symptomen des Patienten.²⁸ Lediglich in klinischen Studien wird der Colitis-activity-index zur Beurteilung der gegenwärtigen Krankheitsaktivität eingesetzt.

1.1.7 Therapie der CED

Wie bei vielen chronischen Erkrankungen handelt es sich auch bei der Therapie der CED um eine dauerhafte Therapie, die nicht das Ziel verfolgt die Krankheit zu heilen, sondern die klinischen Symptome zu lindern und Komplikationen zu vermeiden.²⁷ Man kann zwischen der Erhaltungstherapie und der Therapie eines Schubes bzw. der von Komplikationen unterscheiden.^{27, 29, 42, 43} Da ein Schub einer CED oft auch Schmerzen und Einbußen an Lebensqualität beinhaltet⁴⁴ und zu schwereren Komplikationen führen kann, sollte jeder Schub therapiert werden.

Die Erhaltungstherapie wird bei der Colitis ulcerosa vor allem auf 5-Aminosalicylsäure (5-ASA, Mesalazin) aufgebaut, während bei Morbus-Crohn-Patienten vor allem Azathioprin eingesetzt wird.^{27, 29, 35, 42, 43} Supportiv können eine Anpassung der Ernährung, Sport und andere Life-Style-Modifikationen sinnvoll sein.^{45, 46}

Ob probiotische Nahrungsergänzungsmittel, wie der *E. coli*-Stamm Nissle 1917, eine wirkungsvolle Ergänzung der remissionserhaltenden Therapie sind, ist beim Morbus Crohn umstritten.⁴³ Im Gegensatz zum Morbus Crohn empfehlen die Leitlinien der European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) bei einer Colitis ulcerosa eine Therapie mit *E. coli* Nissle 1917 als Alternative zur 5-ASA-Therapie.⁴²

Kommt es trotz der remissionserhaltenden Therapie zum Schub, wird deren Dosis zunächst erhöht und eventuell durch topische Glucocorticosteroide ergänzt. Ist das nicht ausreichend, um eine Remission zu induzieren, so wird vor allem auf systemische Glucocorticosteroide und Azathioprin zurückgegriffen.^{27, 29, 35, 42, 43}

Seit Mitte der 1990er Jahre auffiel, dass Patienten mit CED eine erhöhte Produktion von TNF- α haben, entstand die Idee, die entzündliche Aktivität durch eine Blockade der TNF- α -Wirkung zu hemmen. Im Jahr 1997 wurde der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen TNF- α (z.B. Infliximab) in der Behandlung des Morbus Crohn erstmals realisiert. In den folgenden Jahren wurde die Behandlungsindikation auf die CU ausgeweitet und seitdem haben anti-TNF- α -Antikörper ihren festen Platz in der Behandlung der CED.^{35, 47}

Die letzte Option ist sowohl beim Morbus Crohn als auch bei der Colitis ulcerosa die chirurgische Intervention.

Im Gegensatz zum Morbus Crohn ist bei einer Colitis ulcerosa ausschließlich das Kolon betroffen, sodass eine Kolektomie das Fortschreiten der Erkrankung endgültig verhindert. Eine Kolektomie ist allerdings ein erheblicher Einschnitt in die Lebensqualität des Patienten, weshalb die Entscheidung zur Operation erst nach Ausschöpfung der medikamentösen Therapie getroffen wird. Lebensbedrohliche Komplikationen der Colitis ulcerosa wie das toxische Megakolon, eine Perforation oder therapierefraktäre rektale Blutungen sind die wichtigsten Indikationen für eine Notfalloperation.³⁵ Auf der anderen Seite sind ein kolo-rectales Karzinom oder ein Nichtansprechen auf die medikamentöse Therapie Indikationen für eine elektive Operation.³⁵

1.2 Intestinale Mikroflora bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Spätestens seit dem Millennium stehen die Veränderungen der intestinalen Mikroflora bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen immer mehr im Fokus der Forschung. Dieses liegt unter anderem auch daran, dass es in diesen Jahren mithilfe neuer molekulargenetischer Methoden große Erkenntnisgewinne über die intestinale Normalflora und ihre Zusammensetzung gab. Die späte Entwicklung dieses Forschungszweiges gründet auch darauf, dass etwa 60 %–80 % der intestinalen Bakterien nicht kultivierbar sind und somit ein Großteil der Flora nicht über eine Kultivierung erfassbar ist.^{48,49}

1.2.1 Mukosale Flora

Bei gesunden Probanden ist die Mukosa der Darmwand weitgehend frei von adhärenenten Bakterien, während sie bei CED-Patienten oft von einem bakteriellen Biofilm bedeckt ist, wobei die Präsenz und die Dichte dieses Biofilms gut mit der Aktivität der Erkrankung korreliert.^{10,50,51} Die dominanten Gruppen der adhärenenten Bakterien sind hierbei *Bacteroides fragilis* und *Enterobacteriaceae*, diese sind nicht nur auf der Oberfläche der Darmwand nachweisbar, sondern penetrieren teilweise die Zellen.⁵⁰ Häufig sind gerade Epithelzellen am Boden der Krypten betroffen, während die Krypten selbst frei von Bakterien sind.⁵⁰ Der Unterschied zwischen der mukosalen Oberfläche eines CED-Patienten und eines Patienten mit funktionellen Beschwerden wird in Abbildung 1.1 besonders deutlich.

Auffällig ist außerdem, dass sich nicht nur die räumliche Verteilung der Bakterien bei CED-Patienten von der gesunder Probanden unterscheidet, sondern auch die Konzentration der Bakterien bei CED-Patienten deutlich höher ist. Insbesondere die *Bacteroides*-Gruppe ist bei den Patienten in größeren Mengen vertreten.¹⁰

Die Veränderungen der bakteriellen Besiedlung der Darmwand bei CED-Patienten beschränken sich nicht auf die entzündeten Abschnitte des Kolons. Es ließ sich vielmehr nachweisen, dass sie das gesamte Kolon betreffen.¹⁰ Auffällig ist hierbei, dass die Konzentration der Bakterien gerade in weniger entzündeten Abschnitten höher ist als in solchen, die eine floride Entzündung aufweisen.¹⁰ Als möglicher Grund für diese Verteilung wird die Leukozyteninfiltration in den entzündeten Abschnitten vermutet.¹⁰

1.2.2 Fäkale Flora

Die fäkale Flora bei CED-Patienten unterscheidet sich, wie auch die mukosale Flora, signifikant von der gesunder Kontrollpersonen.^{52,53}

Eine Schlüsselrolle spielt hierbei die Spezies *Faecalibacterium prausnitzii*, ein Hauptvertreter des *Clostridium leptum*-Clusters (Stamm der *Firmicutes*). Dieser Spezies wird eine

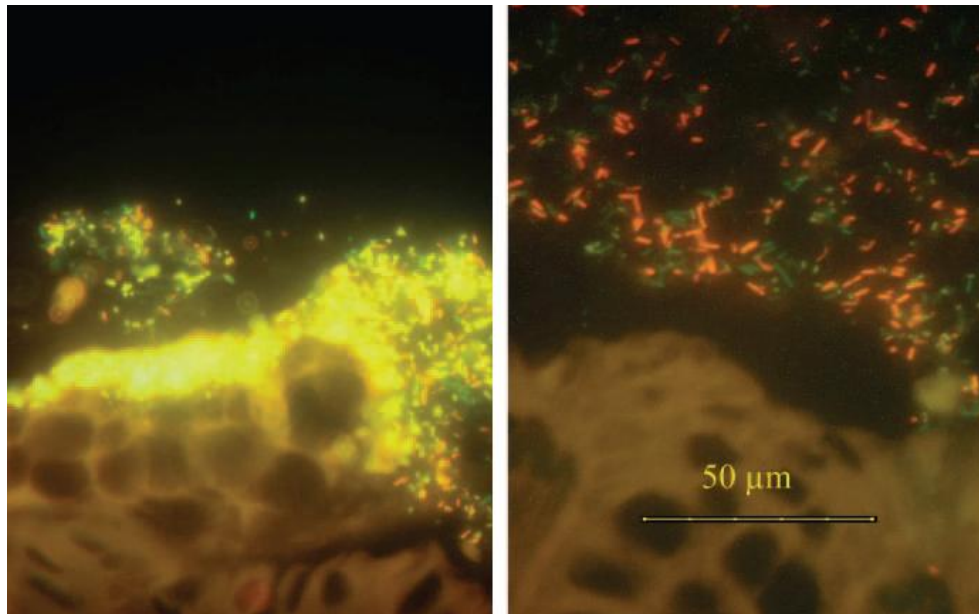


Abbildung 1.1: Mukosale Flora bei CED.

Die Abbildung links zeigt die Probe eines MC-Patienten, rechts die eines IBS-Patienten. Auffällig ist der adhärenente Biofilm und die deutlich erhöhte Konzentration von *Bacteroides fragilis* (gelb gefärbt, Cy3) im linken Bild.

Entnommen aus Swidsinski et al.: „Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease“. ⁵⁰

antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben und die Konzentration dieses Bakteriums ist im Stuhl von Patienten mit einem Morbus Crohn deutlich niedriger als bei gesunden Probanden. ^{54,55} Während die Daten zum Morbus Crohn eindeutig sind, gibt es zur Colitis ulcerosa unterschiedliche Studienergebnisse. Sokol et al. fanden auch hier eine erniedrigte Konzentration, dagegen kam eine Studie von Swidsinski et al. zu dem Ergebnis, dass hier keine erniedrigte Konzentration von *Faecalibacterium prausnitzii* vorliegt. ^{53,55}

Manichanh et al. wiesen nach, dass sich signifikant weniger *Firmicutes*-Spezies im Stuhl von CED-Patienten nachweisen lassen als bei Gesunden. ⁵⁶

Gleichzeitig stellen einige Studien eine erhöhte Konzentration von *Bacteroides*-Spezies im Stuhl von CED-Patienten fest. Der daraus resultierende *Firmicutes/Bacteroides*-Quotient scheint, im Vergleich zu Stuhlproben von gesunden Probanden, erniedrigt zu sein. ⁵⁵

Bei der Colitis ulcerosa zeigt sich außerdem, dass Bakterien der Familie der *Bifidobacteriaceae* in signifikant höheren Konzentrationen auftreten, als bei einer gesunden Kontrollgruppe oder bei einem Morbus Crohn. ⁵³

Abgesehen von Einzelgruppen ist auch die Gesamtkonzentration der fäkalen Bakterien bei CED signifikant niedriger als bei gesunden Probanden. ⁵² Interessanterweise gilt also, dass die fäkalen Bakterien bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in niedrigeren Konzentrationen auftreten, gleichzeitig aber häufiger adhärenente Bakterien an der Oberfläche des Darmepithels nachweisbar sind.

Kapitel 2

Herleitung der Aufgabenstellung

Im Lauf der vergangenen Jahre konnten viele Studien zeigen, dass die intestinale Barrierefunktion bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen empfindlich gestört ist.^{10,50,57} So wurden adhärenente Biofilme nachgewiesen und es konnte gezeigt werden, dass die Mukusschicht, die normalerweise die fäkalen Bakterien vom Darmepithel trennt, durchlässiger und dünner ist.⁵⁰ Weiterhin unterscheidet sich die Zusammensetzung der fäkalen Flora bei Patienten mit CED deutlich von derjenigen der Normalbevölkerung.^{10,50,55,56,58} Beide wesentlichen Krankheitsbilder der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa, werden inzwischen als Multiorganerkrankungen begriffen, die nicht nur den Intestinaltrakt, sondern auch extraintestinale Regionen betreffen.^{26,28}

Insbesondere die Ätiologie der gestörten Barrierefunktion rückt immer weiter in den Fokus der Forschung, allerdings ist bislang noch nicht untersucht worden, ob auch andere Epithelien von einer Barrierefunktionsstörung betroffen sind.

Williams et al. konnten beispielsweise zeigen, dass sich die Urinkonzentrationen mancher Produkte des Metabolismus gastrointestinaler Bakterien wie Hippursäure und Ameisensäure signifikant bei Patienten mit einem Morbus Crohn, einer Colitis ulcerosa und gesunden Kontrollprobanden unterscheiden.⁵⁹

Insgesamt scheint es möglich, dass es auch spezifische Unterschiede der bakteriellen Besiedlung des Urogenitaltrakts bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gibt.

Das Ziel dieser Arbeit soll sein, anhand der Untersuchung von Spontanurin mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierungsmikroskopie zu klären, ob es bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auch Unterschiede in der Zusammensetzung, der Konzentration und der räumlichen Organisation der urogenitalen Mikroflora gibt.

Kapitel 3

Methodik

3.1 Patienten und Probanden

Die Patienten und Probanden der Studie wurden in zwei gastroenterologischen Spezialprechstunden am Campus Mitte der Charité Universitätsmedizin Berlin in einem Zeitraum von sechs Monaten rekrutiert.

Es wurden Patienten mit einem klinisch, endoskopisch und histologisch gesicherten Morbus Crohn (42 Patienten), beziehungsweise einer Colitis ulcerosa (46 Patienten) eingeschlossen. Als Kontrollgruppe dienten 49 Patienten ohne anamnestisch bekannte chronisch entzündliche Darmerkrankungen, die die internistische Sprechstunde aus anderen Gründen besuchten. Die einzelnen Gruppen waren hinsichtlich der Alters- und der Geschlechtsverteilung vergleichbar (s.a. Tabelle 3.1 und Abbildung 3.1). Die Gruppe der Patienten mit aktuellen oder sanierten Fisteln wurde nochmals getrennt ausgewertet. Außerdem wurden Patienten mit einer primär sklerosierenden Cholangitis aufgrund der Assoziation mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nicht in die Kontrollgruppe eingeschlossen.

Alle Patienten und Probanden wurden mündlich und schriftlich über die Studie informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Es lag ein positives Votum der Ethikkommission der Charité vor. Zudem wurden alle Untersuchungen in Einklang mit der Erklärung von Helsinki⁶⁰ durchgeführt.

3.1.1 Erfasste Daten

Von jedem Patienten wurden folgende Daten erfasst und in der Folge statistisch erfasst:

- Alter
 - Geschlecht
 - Größe
 - Gewicht
-

- Zeitpunkt der Erstdiagnose
- aktuelle Medikation
 - insbesondere Antibiotika
 - insb. Immunmodulatoren
- aktueller Raucherstatus
- Fisteln in der Vorgeschichte
- Begleiterkrankungen
 - insb. gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD)
- Befallsmuster
- aktuelle Krankheitsaktivität
- chronisch aktive, bzw. steroidabhängige Verläufe
- Allergien

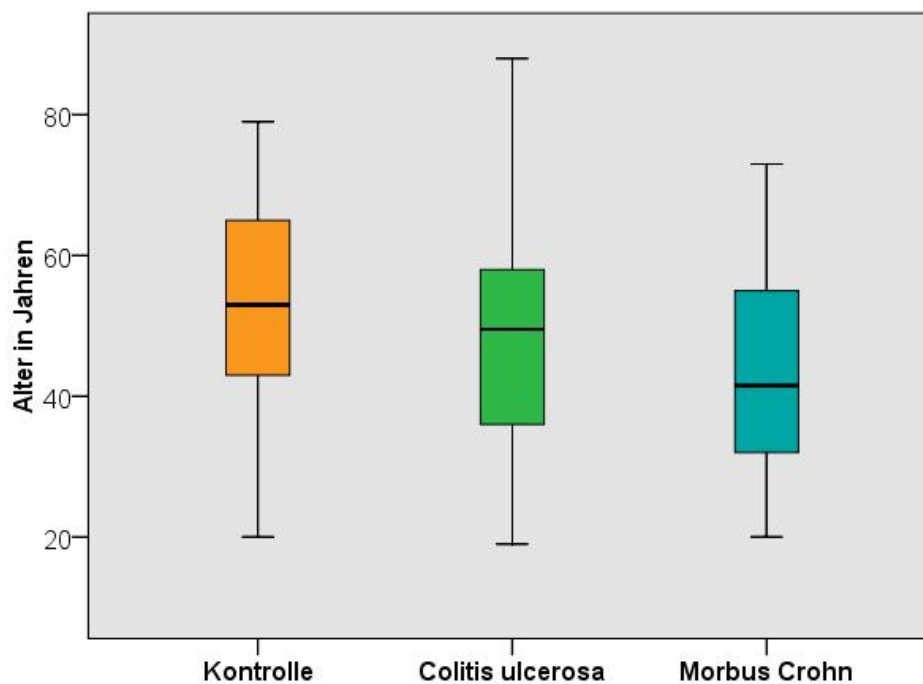


Abbildung 3.1: Altersverteilung der Gruppen

Tabelle 3.1: Patientendaten

Gruppe	Anzahl (pro- zent. Anteil)	Durchschnittsalter (Min. – Max.)	Anz. mit CAI:			Anz. mit CDAI:		
			<5	5-10	>10	<150	150-450	>450
Kontrolle	49 (100 %)	52,0 (20 – 79)						
männl.	12 (24,5 %)	50,7 (20 – 77)						
weibl.	37 (75,5 %)	54,0 (22 – 79)						
MC	42 (100 %)	44,1 (20 – 73)				22	18	2
männl.	12 (28,6 %)	45,2 (26 – 73)				8	4	0
weibl.	30 (71,4 %)	43,7 (20 – 73)				14	14	2
UC	46 (100 %)	48,4 (19 – 88)	27	15	4			
männl.	15 (32,6 %)	48,1 (19 – 75)	11	3	1			
weibl.	31 (67,4 %)	48,8 (23 – 88)	16	12	3			

3.1.2 Scores zur Erfassung der Krankheitsaktivität

Bei den Patienten mit einem Morbus Crohn wurde der Crohn's Disease Activity Index (CDAI)³⁸ nach Best erhoben (s.a. Tabelle 3.2 und zur Verteilung Tabelle 3.1). Hierbei spricht eine Punktzahl von über 150 Punkten für einen Schub, während ein Rückgang auf unter 150 Punkte für das Erreichen einer Remission anzeigt. Ab einer Punktzahl von 450 wurde ein schwerer Schub angenommen.²⁶

Bei den Colitis ulcerosa Patienten wurde der Colitis Activity Index (CAI)⁶¹ nach Lichtiger erhoben (s.a. Tabelle 3.3 und zur Verteilung Tabelle 3.1). Hier spricht eine Punktzahl von über 10 für einen schweren Schub, während eine Punktzahl von unter 5 das Erreichen einer klinischen Remission nahelegt. Ein Rückgang des CAI auf unter zehn oder um fünf oder mehr Punkte deutet ein Ansprechen auf die Therapie an.

Die Kriterien für die Berechnung des CAI und des CDAI finden sich in Tabelle 3.3 und in Tabelle 3.2. Die Tabelle mit dem Standardgewicht, welches für die Berechnung des CDAI notwendig ist, findet sich im Anhang. Sie wurde den wissenschaftlichen Tabellen nach Geigy entnommen.⁶²

Die aktuelle Krankheitsschwere der eingeschlossenen CED-Patienten finden sich auch in Tabelle 3.1.

Tabelle 3.2: Crohn's Disease Activity Index (CDAI).

Ab 150 Punkten wurde ein Schub angenommen, ein Rückgang auf unter 150 Punkte eine Remission anzeigt, ab einer Punktzahl von 450 ein schwerer Schub.

Das zur Berechnung notwendige Standardgewicht findet sich im Anhang.⁶²

Crohn's Disease Activity Index nach Best		
<i>Kriterium</i>	<i>Multiplikator</i>	<i>Ergebnis</i>
<i>Anzahl der ungeformten Stühle der letzten Woche: _____</i>	x 2	
<i>Bauchschmerzen in der letzten Woche:</i> Keine Schmerzen an _____ Tagen x 0 = _____ Leichte Schmerzen an _____ Tagen x 1 = _____ Mäßige Schmerzen an _____ Tagen x 2 = _____ Starke Schmerzen an _____ Tagen x 3 = _____ <i>Zwischensumme: _____</i>	x 5	
<i>Allgemeinbefinden über die letzte Woche:</i> Gutes Allgemeinbefinden an _____ Tagen x 0 = _____ Mäßiges Befinden an _____ Tagen x 1 = _____ Schlechtes Befinden an _____ Tagen x 2 = _____ Sehr schlechtes Befinden an _____ Tagen x 3 = _____ Unerträgliches Befinden an _____ Tagen x 4 = _____ <i>Zwischensumme: _____</i>	x 7	
<i>Extraintestinale Manifestationen:</i> Iritis/Uveitis Stomatitis aphtosa Pyoderma gangraenosum Erythema nodosum Arthralgien oder Arthritis Analfisteln oder Analfissur andere Fisteln erhöhte Körpertemperatur >37°C <i>Anzahl der zutreffenden Punkte: _____</i>	x 20	
<i>Symptomatische Durchfalltherapie:</i> Ja=30 Nein=0		
<i>Resistenz im Abdomen:</i> Nein=0 Fraglich=2 Ja=5	x 10	
<i>Hämatokrit:</i> Normen: Männer 47% ; Frauen 42% Soll-Hk - Ist-Hk= _____	x 6	
<i>Körpergewicht:</i> 1-(Gewicht in kg / Standardgewicht in kg (siehe Anhang))= _____	x 100	
<i>Gesamtsumme CDAI:</i>		

Tabelle 3.3: *Colitis Activity Index (CAI)*

Über 10 Punkten wurde ein schwerer Schub angenommen, zwischen 5 und 10 Punkten ein Schub und unter 5 Punkten eine Remission.

Colitis Activity Index nach Lichtiger	
<i>Kriterium</i>	<i>Punktzahl</i>
<i>Anzahl der Stühle pro Tag:</i>	
0–2	0
3–4	1
5–6	2
7–9	3
≥ 9	4
<i>Durchfälle während der Nacht:</i>	
Nein	0
Ja	1
<i>Anteil der Stühle mit sichtbarem Blut:</i>	
0 %	0
≤ 50 %	1
> 50 %	2
100 %	3
<i>Stuhlinkontinenz:</i>	
Nein	0
Ja	1
<i>Allgemeinbefinden:</i>	
Perfekt	0
Sehr gut	1
Gut	2
Durchschnittlich	3
Schlecht	4
Sehr schlecht	5
<i>Krämpfe oder Schmerzen im Abdomen:</i>	
Keine	0
Mild	1
Moderat	2
Schwer	3
<i>Abdomineller Druckschmerz:</i>	
Keiner	0
Mild und/oder lokalisiert	1
Moderat und/oder diffus	2
Schwer und/oder Abwehrspannung	3
<i>Symptomatische Durchfalltherapie:</i>	
Nein	0
Ja	1
<i>Gesamtsumme CAI:</i>	

3.2 Verblindung

Die im Labor eingehenden Proben wurden mit einer fortlaufenden fünfstelligen Nummer versehen. Diese Nummer erlaubte keinen Rückschluss auf jedwede Patientendaten. Die anonymisierten Patientendaten wurden mit der gleichen Nummer versehen und in einer separaten Datenbank gespeichert. Die Entblindung erfolgte erst nach der mikroskopischen Auswertung der Proben zur statistischen Analyse.

3.3 Probenpräparation

Untersucht wurden 2 ml Erststrahlurin des ersten Spontanurins des Tages. Diese Probe wurde von den Patienten mittels Pipette direkt in ein Röhrchen mit 8 ml Carnoy-Lösung (Ethanol/Essigsäure/Chloroform; 6/6/1) gegeben und dadurch fixiert.

Nach dem Probeneingang wurde die Probe nochmals durchmischt und danach 1,5 ml der Lösung in ein Eppendorfröhrchen pipettiert. Dieses Eppendorfröhrchen wurde dann für 6 Minuten bei 6000 Umdrehungen pro Minute bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand über dem Sediment mit Filterpipetten abpipettiert und 75 µl Carnoy-Lösung hinzugegeben, sodass die Probe wieder ein Volumen von 100 µl enthielt. Diese 100 µl repräsentierten nun ca. 300 µl der ursprünglichen 2 ml Spontanurin.

Bis zur Hybridisierung wurden die Eppendorfröhrchen bei 4 °C gelagert.⁶³

3.4 Hybridisierungen

3.4.1 Vorbereitungen für die Hybridisierungen

Vor der Hybridisierung wurde auf den verwendeten SuperFrost-Objektträgern ein 5 mm x 5 mm großes Feld markiert. Dazu wurde das Quadrat mittels einer Schablone mit einem PAP-Pen übertragen. Die Markierung sorgt dafür, dass sich aufgetragene Flüssigkeiten nur im definierten Bereich ausbreiten können. Die Markierung mittels PAP-Pen hat zudem den Vorteil, dass sie nicht mit den später aufgetragenen Chemikalien reagiert, temperaturstabil ist und bei der sich anschließenden Mikroskopie wenig störende Autofluoreszenzen erzeugt.

Die Probe wurde mit einem Vortex-Gerät nochmals durchmischt. Nachdem die Markierung getrocknet war, wurden in das Feld auf dem Objektträger 5 µl der durchgemischten Suspension aufgebracht. Um die Proben mit allen ausgewählten Oligonukleotidsonden untersuchen zu können, wurden jeweils 5 µl der Probe auf vier Objektträger aufgebracht. Diese wurden im Folgenden für 30 min bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet.

Nach dem Trocknen wurden drei der vier Objektträger jeder Probe mit Lysozym behandelt. Das Lysozym wurde so aufgetragen, dass das 5 mm x 5 mm große Feld komplett damit bedeckt war. Im Anschluss wurden die behandelten Proben für 15 Minuten in einer

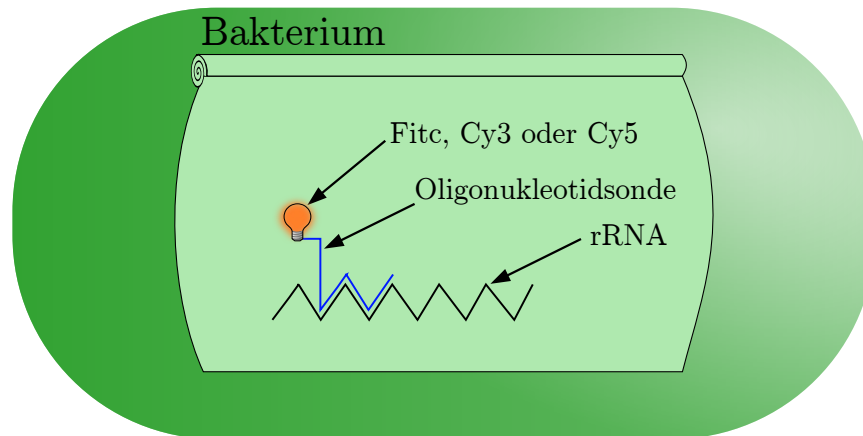


Abbildung 3.2: Mechanismus von FISH.

Die Abbildung zeigt die fluorchrommarkierte Sonde, die an bakterielle rRNA bindet.

feuchten Kammer bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gespült und erneut für 15 Minuten bei 50 °C getrocknet.⁶³

3.4.2 Oligonukleotidsonden

Oligonukleotide

Bei den verwendeten Sonden handelte es sich um rRNA-basierte Oligonukleotidsonden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. In dieser Studie wurden 16S rRNA und 23S rRNA basierte Sonden verwendet. Diese binden spezifisch an die komplementäre Zielsequenz der bakteriellen rRNA und markieren die Bakterien dadurch (siehe auch Abbildung 3.2). Insgesamt wurden acht verschiedene Oligonukleotidsonden verwendet, die entweder spezifisch alle Bakterien, einzelne Gruppen oder einzelne Spezies markieren. Welche Sonden im Einzelnen genutzt wurden ist aus Tabelle 3.4 ersichtlich. Die Sequenzen der verwendeten Sonden sind im Anhang aufgeführt, weitere Informationen wie Spezifität, Zielmolekül und Molekulargewicht, sind auf ProbeBase einsehbar.⁶⁴

Die Auswahl der Sonden erfolgte nach den Ergebnissen von Voruntersuchungen, um einen möglichst großen Teil der vorkommenden Bakterien abzubilden.^{63,65,66} Insbesondere wurden spezifische Sonden für *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Bifidobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* und *Lactobacillus* spp. verwendet, um die genitale Mikroflora zu erfassen. Außerdem wurden spezifische Sonden für *Enterobacteriaceae* und *Streptococcus* spp. eingesetzt um die häufigsten Verursacher von Zystitiden zu markieren.⁶⁷

Gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe

Beide Sondengruppen (Zielmolekül 16S rRNA oder 23S rRNA) binden also an die bakterielle rRNA und der gekoppelte Farbstoff sendet, wenn er angeregt wird, Licht aus und macht

Tabelle 3.4: Oligonukleotidsonden.

Die angegebene Referenz verweist auf die Erstbeschreibung.

<i>Sondenname</i>	<i>Ziel</i>	<i>Farbstoff</i>	<i>Referenz</i>
Eub338	Alle Bakterien, Kingdom eubacteria	FITC	Amann et al. ⁶⁹
Ato291	<i>Atopobium vaginae</i>	Cy3	Harmsen et al. ⁷⁰
Bif164	<i>Bifidobacteriaceae</i>	Cy3	Langendijk et al. ⁴⁹
Ebac	<i>Enterobacteriaceae</i>	Cy3	Bohnert et al. ⁷¹
Lab158	<i>Lactobacillus</i> spp. und <i>Enterococcus</i> spp.	Cy3	Harmsen et al. ⁷²
Bac303	<i>Bacteroidaceae</i> und <i>Prevotellaceae</i>	Cy5	Manz et al. ⁷³
GardV	<i>Gardnerella vaginalis</i>	Cy5	Swidsinski et al. ⁶⁵
Strc493	<i>Streptococcus</i> spp.	Cy5	Franks et al. ⁷⁴
DAPI	Gegenfärbung, alle DNA- (und RNA-haltigen Strukturen)		Kapuscinski et al. ⁷⁵ Tanious et al. ⁷⁶

die Bakterien so sichtbar. Insgesamt waren drei unterschiedliche Farbstoffe, Fluorescein-isothiocyanat (FITC) und die zwei Cyanine Cy3 und Cy5 an die Sonden gekoppelt (Abbildung 3.2). Die Farbstoffe werden bei unterschiedlichen Wellenlängen maximal angeregt, FITC bei $\lambda_{(\max)}=495$ nm, Cy3 bei $\lambda_{(\max)}=548$ nm und Cy5 bei $\lambda_{(\max)}=647$ nm, und emittieren die gespeicherte Energie wiederum als Licht. Auch das emittierte Licht hat je nach Farbstoff unterschiedliche Wellenlängen (FITC: $\lambda_{(\max)}=519$ nm; Cy3: $\lambda_{(\max)}=561$ nm; Cy5: $\lambda_{(\max)}=665$ nm), sodass FITC unter dem Fluoreszenzmikroskop als grün, Cy3 als orange und Cy5 als dunkelrot erscheint. Die Wellenlängen, bei denen Licht maximal absorbiert und emittiert wird, sind der Datenbank PubSpectra entnommen.⁶⁸

Bei der späteren Analyse ist zu beachten, dass die Wellenlänge des von Cy5 emittierten Lichts eine Wellenlänge hat, die vom menschlichen Auge nicht mehr oder nur noch schwach erkannt wird, sodass hier auf die Analyse von Live-Aufnahmen (Fotos) zurückgegriffen werden muss.

Die unterschiedlichen Farbspektren der Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichen es, in einem Präparat bis zu drei verschiedene Bakterienarten zu markieren und ihre Konzentration und räumliche Verteilung zu analysieren.

3.4.3 Hybridisierungen

Die Zusammensetzung der Basislösung für die anschließende Hybridisierung ist aus Tabelle 3.6 zu ersehen. Zu je 10 μ l dieser Lösung wurden dann 1 μ l der FITC gelabelten Sonde und je $\frac{1}{4}$ μ l der Cy3- und der Cy5-gelabelten Sonde gegeben. Von der so hergestellten Hybridisierungslösung wurden je 10 μ l auf die PAP-markierten Quadrate der Objektträger gegeben. Jeder der vier Objektträger der Probe wurde mit einer anderen Sondenkombination hybridisiert. Die Sondenkombinationen sind in Tabelle 3.5 beschrieben.

Tabelle 3.5: Sondenkombinationen*Mit Lysozym vorbehandelte Objektträger:*

	<i>Cy3</i>	<i>FITC</i>	<i>Cy5</i>
1. Objektträger:	Bif164	Eub338	GardV
2. Objektträger:	Lab158	Eub338	Strc493
3. Objektträger:	Ato291	Eub338	GardV

Nicht mit Lysozym vorbehandelter Objektträger:

	<i>Cy3</i>	<i>FITC</i>	<i>Cy5</i>
4. Objektträger:	Ebac	Eub338	Bac303

Nachdem die Hybridisierungslösung aufgebracht war, wurden die Präparate in einer „feuchten Kammer“ für 60 min bei 50 °C hybridisiert. Im Anschluss wurden die Präparate für 5 min in einer Waschlösung (s. Tabelle 3.6) bei 50 °C gewaschen um überschüssige, beziehungsweise ungebundene Sonden zu entfernen. Die Objektträger wurden dann erneut mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet, bevor sie mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) für 5 min gegengefärbt wurden. Der Algorithmus zur Hybridisierung von Urinproben wurde 2010 von Swidsinski et al. beschrieben.⁶³

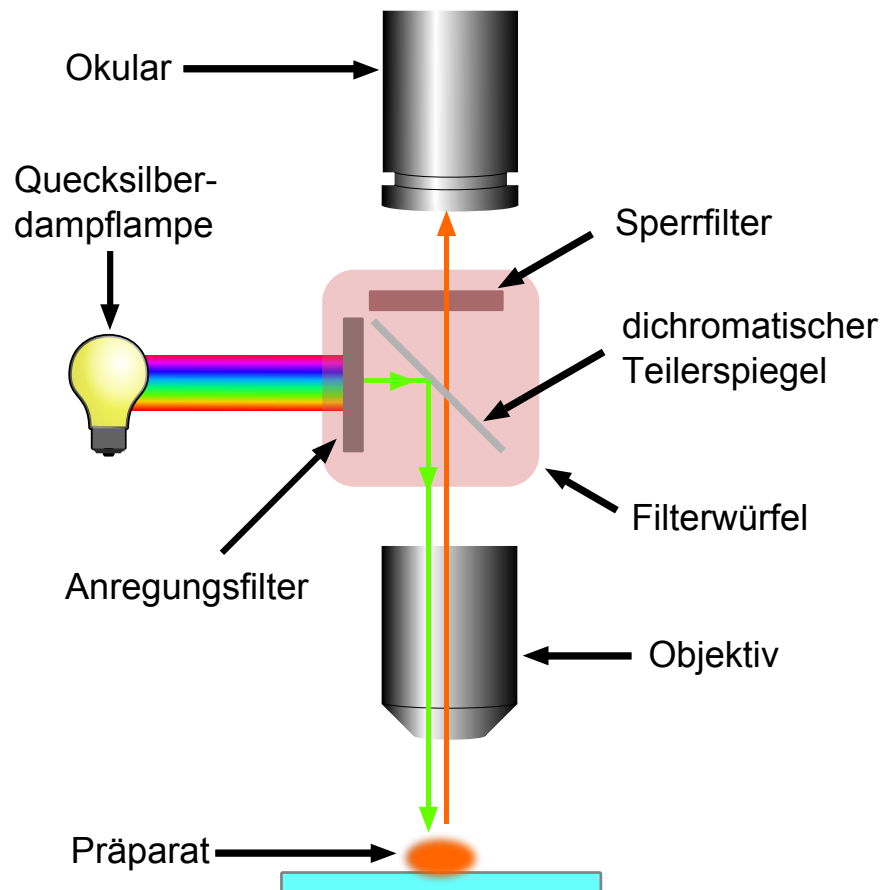
Tabelle 3.6: Hybridisierungs- und Waschlösung

<i>Für 2 ml der Basishybridisierungslösung:</i>			<i>Für 50 ml der Waschlösung:</i>		
<i>Menge</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Stoff</i>	<i>Menge</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Stoff</i>
360 µl	5M	NaCl	9 ml	5M	NaCl
40 µl	1M	Tris-HCl	1 ml	1M	Tris-HCl
10 µl	10 %	SDS	30 µl	10 %	SDS
1570 µl	100 %	Aqua dest.	40 ml	100 %	Aqua dest.
20 µl	100 %	Formamid			

3.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Mikroskopie

3.5.1 Funktionsweise

Bei einem Aufsicht-Fluoreszenzmikroskop wird das Präparat im Gegensatz zu einem Lichtmikroskop nicht von unten durchleuchtet, sondern spezifische Fluoreszenzfarbstoffe zum Leuchten angeregt. Dazu wird das Licht einer Quecksilberdampfhochdrucklampe durch



*Abbildung 3.3: Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie.
Grundlegende Funktionsweise.*

einen ersten Spektralfilter, den sogenannten Anregungsfilter, über einen Teilerspiegel auf das Präparat gelenkt. Der Anregungsfilter lässt nur ein schmales Lichtspektrum durch, und zwar eben jenes, das den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff (DAPI, FITC, Cy3 oder Cy5) maximal anregt. Der angeregte Farbstoff emittiert wiederum Licht, das dann durch einen weiteren Spektralfilter, den Sperrfilter und durch das Okular zum Auge des Untersuchers oder zu einer Kamera gelenkt wird. Der Sperrfilter hat dabei die Aufgabe, nur die Wellenlängen durchzulassen, die spezifisch für das jeweilige Fluorochrom sind und anderes Licht, wie zum Beispiel vom Präparat reflektiertes Anregungslicht, aufzuhalten. Anregungsfilter, Teilerspiegel und Sperrfilter müssen alle auf das jeweilige Fluorochrom abgestimmt sein und sind deshalb in einem für das Fluorochrom spezifischen Filterwürfel untergebracht.⁷⁷ Die Funktionsweise der Fluoreszenzmikroskopie wird auch durch Graphik 3.3 verdeutlicht.

3.5.2 Zellen

Differenzierung

Epithelzellen und Leukozyten lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Morphologie in der Gegenfärbung mit DAPI eindeutig voneinander unterscheiden. Die Epithelzellen erscheinen

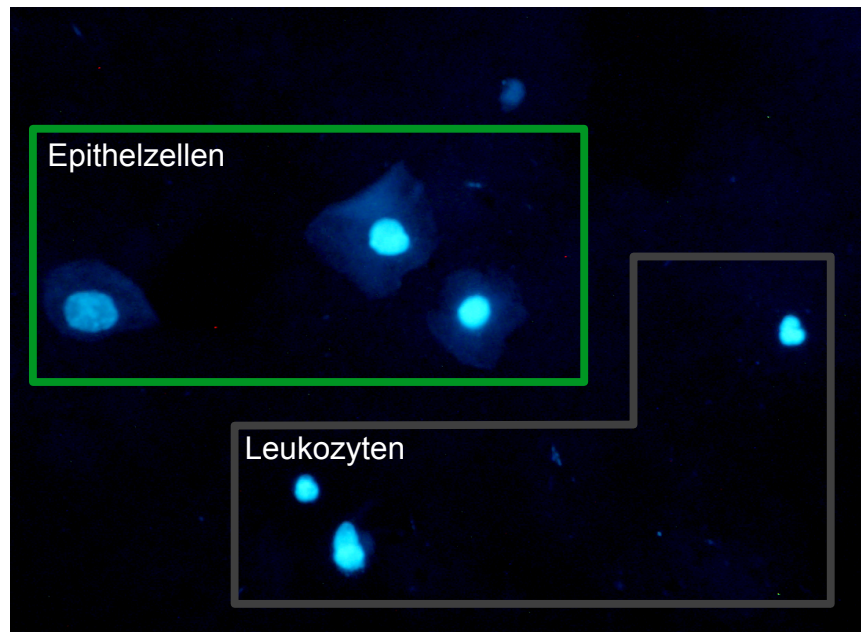


Abbildung 3.4: Differenzierung von Epithelzellen und Leukozyten.

Die Abbildung zeigt 3 Epithelzellen und 3 Leukozyten. Deutlich ist der Unterschied der Menge des Zytoplasmas von Epithelzellen und Leukozyten zu erkennen. Das Foto wurde bei einer 400-fachen Vergrößerung aufgenommen.

hier größer und mit wesentlich mehr Zytoplasma, während sich bei Leukozyten fast kein Zytoplasma zeigt. Auch die Form des Zellkerns kann als Differenzierungsmerkmal dienen. So lassen sich beispielsweise Granulozyten am gelappten Kern deutlich von Epithelzellen unterscheiden.⁶³ Die Morphologie von Epithelzellen und Leukozyten in der Gegenfärbung mit DAPI ist in Abbildung 3.4 nochmals veranschaulicht.

Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl zu schätzen, wurde ein Zählgitter (10 x 10 Felder mit je 1 mm Seitenlänge) im Okular des Mikroskops implementiert. Mithilfe des Gitters wurden die Epithelzellen und die Leukozyten pro Präparat geschätzt, indem sie bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt wurden. Diese Anzahl wurde danach auf eine Konzentration an Zellen pro Milliliter Spontanurin hochgerechnet.

3.5.3 Bakterien

Standards zur Identifikation von Bakterien

Bakterien sind aufgrund von unspezifischen Signalen oft schwierig von eukaryonten Zellverbänden und Artefakten zu unterscheiden. Um dennoch valide Aussagen über Bakterien treffen zu können, sind einige Standards notwendig. Bakterien wurden unabhängig von einem positiven Signal in der speziesspezifischen Sonde nur als solche gezählt, wenn sie auch

in der Gegenfärbung mit DAPI erkennbar waren. Es musste auch in der Eub338-Sonde, die alle Bakterien darstellt, ein positives Signal nachweisbar sein.

Zudem wurde eine bakterientypische Form gefordert, um die Gefahr der Verwechslung mit Artefakten zu minimieren. Die Bakterien durften auch nicht mit anderen Oligonucleotidsonden kreuzhybridisieren, sondern nur mit ihrer gruppen-, bzw. spezienspezifischen Sonde hybridisieren.⁷⁸

Die Detektionsgrenze für die FISH-Mikroskopie mit rRNA-gekoppelten Sonden wird für Bakterien mit $10^3 - 10^4$ /ml angegeben.^{79,80}

Biofilme

Um Biofilme zu beurteilen, wurden in der Eub338-Sonde, die alle Bakterienspezies erfasst, und in der Gegenfärbung mit DAPI die Epithelzellen analysiert. Zeigte sich ein dichter Bakterienrasen, der einer Epithelzelle adhärent anhaftete, so wurde diese Zelle als Biofilmpositiv gewertet. Insgesamt wurde hierbei der prozentuale Anteil der Epithelzellen erfasst, die mit einem Biofilm bedeckt waren. Zusätzlich zur allgemeinen Beurteilung der Biofilme wurden insbesondere auch eine Besiedlung mit adhärenenten *Gardnerella vaginalis* erfasst.

Semiquantitative Bestimmung bakterieller Subpopulationen

Um einen genaueren Überblick über die Zusammensetzung der Bakterien zu bekommen, wurde jede der beobachteten Bakteriengruppen (s.a. Tabelle 3.4) einzeln beurteilt. Die Konzentration der einzelnen Bakteriengruppen wurde mithilfe des oben erwähnten Zählgitters bei 1000-facher Vergrößerung geschätzt und semiquantitativ wiedergegeben. Die Konzentrationen wurden hierfür in 10 semiquantitativen Gruppen eingeteilt, welche in Tabelle 3.7 aufgeführt sind.

Berechnung der Bakterienlast

Um die Gesamtbakterienlast pro Milliliter zu berechnen, wurde zunächst die Konzentration der diffus im Urin verteilten Bakterien mit Hilfe des Zählgitters bestimmt, indem die Anzahl der Bakterien pro Gitter bei 1000-facher Vergrößerung ermittelt und auf die Bakterienanzahl pro Milliliter hochgerechnet wurde. Dann wurde die Anzahl der adhärenenten Bakterien pro Zelle bestimmt und mit der Zahl der Epithelzellen pro Milliliter multipliziert. Durch die Addition der diffus verteilten und der adhärenenten Bakterien ergibt sich die Gesamtbakterienlast pro Milliliter.

Tabelle 3.7: Semiquantitative Bestimmung der bakteriellen Subpopulationen

Gruppe	Bakterien pro Gitter (Vergrößerung x 1000)	Konzentration pro Milliliter
0	Keine Bakterien	Keine Bakterien
1	> 0 – 3	> 0 – $5 \cdot 10^5$
2	4 – 6	$5 \cdot 10^5$ – $10 \cdot 10^5$
3	7 – 9	$10 \cdot 10^5$ – $15 \cdot 10^5$
4	10 – 12	$15 \cdot 10^5$ – $20 \cdot 10^5$
5	13 – 15	$20 \cdot 10^5$ – $25 \cdot 10^5$
6	16 – 30	$25 \cdot 10^5$ – $50 \cdot 10^5$
7	31 – 60	$50 \cdot 10^5$ – $100 \cdot 10^5$
8	61 – 300	$100 \cdot 10^5$ – $500 \cdot 10^5$
9	301 – 600	$500 \cdot 10^5$ – $1000 \cdot 10^5$
10	> 600	> $1000 \cdot 10^5$

3.5.4 Pilze

Alle Präparate wurden zudem auf Pilze untersucht, die in DAPI deutlich zu erkennen und zu identifizieren sind (s.a. Abbildung 4.3). Erfasst wurde hier nur, ob sich Pilze nachweisen ließen, die Konzentration wurde hierbei nicht erfasst.

3.5.5 Fotodokumentation

Um die Befunde nachvollziehbar zu dokumentieren, wurden alle Präparate bei 400-facher Vergrößerung fotodokumentiert. Es wurden besonders typische Stellen der Präparate in allen Filtern (DAPI, Cy3, Cy5 und FITC) fotografiert. Die Bilder wurden, versehen mit der fünfstelligen Probennummer, anonymisiert im JPEG-Format gespeichert und archiviert.

3.6 Statistik

Die Analyse der Daten erfolgte mit SPSS, Version 16.

Die Überprüfung der Normalverteilung der Epithelzellen-, Leukozyten- und Bakterienkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests.

Die Anzahl der Bakterien pro Zelle, die Bakterienkonzentration pro Milliliter, die Epithelzellen- und die Leukozytenkonzentration wurde mithilfe von arithmetischem Mittel und Standardabweichung („standard deviation“; SD) dargestellt. Die graphische Darstellung erfolgte mit Box-Plot-Diagrammen, bei denen der Median und die beiden Quartile dargestellt wurden.

Variablen, die mit einer ausreichenden Sicherheit normalverteilt waren (Kolmogorov-Smirnov: $p > 0,05$), wurden mit dem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben nach

Student ausgewertet. Wenn die Normalverteilung nicht mit ausreichender Sicherheit gegeben war, wurde die Variable mit dem nichtparametrischen U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney (Mann-Whitney-U-Test) analysiert.

Bei den halbquantitativ erfassten Bakteriengruppen erfolgte die Darstellung mit Hilfe des Median und der Quartilen, während die Daten mit dem U-Test auf signifikante Unterschiede untersucht wurden.

Der Zusammenhang zwischen adhärennten *Gardnerella vaginalis* Biofilmen und der Diagnose, von Azathioprinallergien, von Fisteln in der Vorgeschichte und einer primär sklerosierenden Cholangitis wurde mit dem χ^2 -Test ausgewertet.

Die Korrelation zwischen den Aktivitätsscores CDAI und CAI und *Gardnerella vaginalis* Biofilmen wurde mit Spearmans Rangkorrelationskoeffizient überprüft. Ebenso wurde ein möglicher Zusammenhang des Alters und eines *Gardnerella vaginalis* Biofilms mit Spearmans Rangkorrelationskoeffizient untersucht.

Die Nullhypothese wurde auf einem Signifikanzniveau von 5 Prozent abgelehnt ($p < 0,05$). Das heißt ab $p < 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant, ab $p < 0,01$ als hochsignifikant angesehen.

3.7 Materialien und Geräte

Tabelle 3.8: Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Typ</i>	<i>Bezugsfirma</i>
CO ₂ -Inkubator	IR Auto Flow	NuAire, Plymouth, USA
Feinwaage	SAC 51	Scaltec instruments, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse 80i	Nikon, Tokio, J
Hg-Hochdrucklampe	C-SHG1	Nikon, Tokio, J
Hybridisierungssofen	Hybaid Mini Oven	MWG-Biotech, Ebersberg
Kamera	DXM 1200F	Nikon, Tokio, J
Trockenschrank	ULM400	Memmert, Schwabach
Vortexgerät	Labinco L24 Vortex	Labinco, Breden NL
Wärmeschrank	Function Line BB16	Heraeus instruments, Hanau
Wasserbad	Typ 1003	GFL, Burgwedel
Zählgitter	Okularstrichplatte MXK 23002	Nikon, Tokio, J
Zentrifuge	EBA 3S	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus instruments, Hanau

Tabelle 3.9: Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Bezugsfirma</i>
2 ml Röhrenchen	Eppendorf, Hamburg
10 ml Röhrenchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
50 ml Röhrenchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
200 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
1000 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
3,5 ml Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Langenbrinck, Emmendingen
Immersionsöl 518F	Carl Zeiss Jena, Jena
PAP-Stift	Kisker-Biotech, Steinfurt
SuperFrost plus Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen

Tabelle 3.10: Reagenzien

<i>Chemikalien</i>	<i>Bezugsfirma</i>
Bidestilliertes Wasser	Charité, Berlin
Chloroform, min. 99 %, DAB9	Merck, Darmstadt
DAPI, min. 98 %	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100 %, Rotipuran	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, 96 %, EMSURE	Merck, Darmstadt
HPLC analysiertes Wasser	J.T. Baker, Deventer NL
Lysozym aus Hühnereiweis	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
Salzsäure 37 %	Merck, Darmstadt
SDS ultra pure	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS	Merck, Darmstadt
<i>Oligonukleotidsonden</i>	
Ato291, Cy5	BioTeZ, Berlin
Bac303, Cy5	BioTeZ, Berlin
Bif164, Cy3	BioTeZ, Berlin
Ebac, Cy3	BioTeZ, Berlin
Eub338, FITC	BioTeZ, Berlin
GardV, Cy5	BioTeZ, Berlin
Lab158, Cy3	BioTeZ, Berlin
Strc493, Cy5	BioTeZ, Berlin

Tabelle 3.11: Software

<i>Software</i>	<i>Bezugsfirma</i>
Inkscape	Open-Source Projekt, sourceforge
MiKTeX	C. Schenk, Berlin
Mikroskopie Fotosoftware	Nikon, Tokio, J
MS Excel 2000	Microsoft, Redmond, USA
MS Access 2000	Microsoft, Redmond, USA
SPSS Version 16	IBM, Armonk, USA
TeXnicCenter	S. Wiegand, T. Weinkauff, Saarbrücken

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Zellen

Die Epithelzellkonzentrationen und die Leukozytenkonzentrationen wurden zur weiteren Auswertung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Hierbei ergab sich, dass die Konzentrationen in keiner Gruppe zu einer ausreichenden Wahrscheinlichkeit normalverteilt waren (Kolmogorov-Smirnov-Test in allen Gruppen $<0,05$), sodass zur weiteren statistischen Analyse der Mann-Whitney-U-Test verwendet wurde.

4.1.1 Epithelzellen

In allen Proben waren Epithelzellen nachweisbar. Bei der Kontrollgruppe waren im Durchschnitt $1,01 \cdot 10^5$ Epithelzellen pro Milliliter (Standardabweichung, SD: $1,91 \cdot 10^5$ Zellen/ml) Spontanurin enthalten. Die Proben der CED-Patienten enthielten geringfügig mehr Zellen als die der Kontrollgruppe.

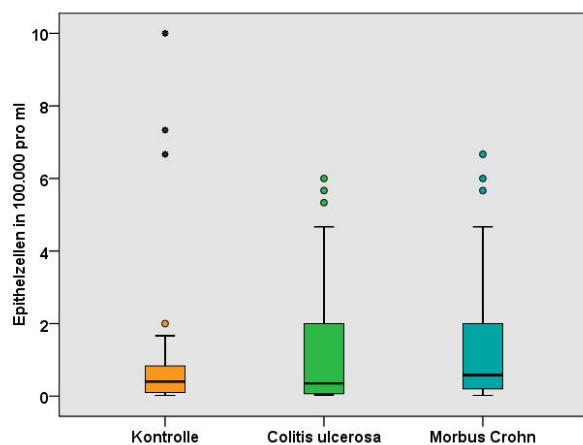


Abbildung 4.1: Epithelzellenkonzentrationen - Gruppen insgesamt

	Anzahl	Epithelzellen $\times 10^5 / ml \pm SD$
Kontrolle	N=49	$1,01 \pm 1,91$
nur männl.	N=12	$0,09 \pm 0,11$
nur weibl.	N=37	$1,31 \pm 2,12$
MC	N=42	$1,38 \pm 1,75$
nur männl.	N=12	$0,66 \pm 1,25$
nur weibl.	N=30	$1,66 \pm 1,85$
CU	N=46	$2,06 \pm 5,20$
nur männl.	N=15	$0,11 \pm 0,10$
nur weibl.	N=31	$3,01 \pm 6,15$

Tabelle 4.1: Epithelzellenkonzentrationen - nach Geschlechtern

Bei den Patienten mit einer Colitis ulcerosa waren durchschnittlich $2,06 \cdot 10^5$ Zellen pro Milliliter (SD: $5,20 \cdot 10^5$ Zellen/ml), bei Patienten mit einem Morbus Crohn durchschnittlich $1,38 \cdot 10^5$ Zellen pro Milliliter (SD: $1,75 \cdot 10^5$ Zellen/ml) nachweisbar.

Die statistische Testung der CED-Gruppen gegen die Kontrollgruppe ergab p-Werte von 0,507 für die Colitis-ulcerosa-Gruppe und 0,164 für die Morbus-Crohn-Gruppe und damit keinen signifikanten Unterschied.

Die Analyse der Epithelzellkonzentrationen der Proben der männlichen Teilnehmer lieferte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (CU: $p=0,323$ und MC: $p=0,319$) und auch die Analyse der Proben der Teilnehmerinnen der Studie zeigte keine signifikanten Unterschiede (CU: $p=0,104$ und MC: $p=0,223$).

Die Proben der Teilnehmer mit Nachweis eines *Gardnerella vaginalis*-Biofilms enthielten hochsignifikant höhere Epithelzellkonzentrationen als die Proben, bei denen kein *Gardnerella vaginalis*-Biofilm nachgewiesen werden konnte ($p<0,001$).

Die Testung der Proben der weiblichen Probandinnen und Patientinnen gegen diejenigen der männlichen zeigte, dass die Konzentration an desquamierten Epithelzellen bei Frauen hochsignifikant höher ist als diejenige der Männer ($p<0,001$).

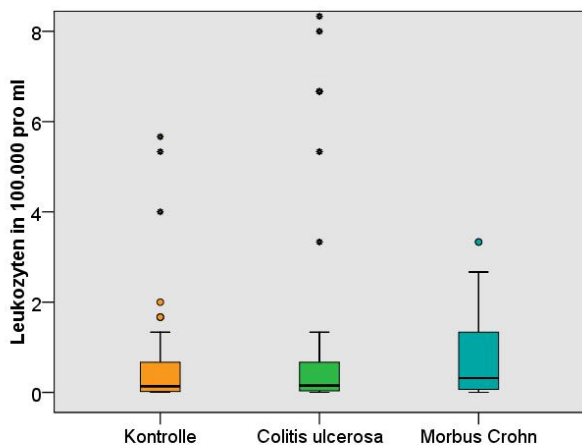
4.1.2 Leukozyten

Im Gegensatz zu den Epithelzellen waren Leukozyten nicht in jeder Probe nachweisbar. Die Proben der Kontrollgruppe enthielten durchschnittlich $1,09 \cdot 10^5$ Leukozyten pro Milliliter (SD: $2,56 \cdot 10^5$ Leukozyten/ml), wohingegen in den Proben der Colitis-ulcerosa-Gruppe im Schnitt $1,51 \cdot 10^5$ Leukozyten pro Milliliter (SD: $2,79 \cdot 10^5$ Leukozyten/ml) und in denen der Morbus-Crohn-Gruppe $2,98 \cdot 10^5$ Leukozyten pro Milliliter (SD: $7,86 \cdot 10^5$ Leukozyten/ml) enthalten waren.

Die beobachteten Unterschiede, die sich in den Konzentrationen der Leukozyten zeigen, sind jedoch nicht signifikant, so wurde in der statistischen Testung für die Colitis-ulcerosa-Gruppe ein p-Wert von 0,564 und für die Morbus-Crohn-Gruppe ein p-Wert von 0,128 errechnet.

Testet man die Leukozytenkonzentrationen der Proben der Patientinnen und Probandinnen gegeneinander, so findet sich ebenso kein signifikanter Unterschied (CU: $p=0,236$ und MC: $p=0,285$ gegen die Kontrollgruppe). Weiterhin können auch keine signifikanten Unterschiede bei den Leukozytenkonzentrationen der männlichen Teilnehmer nachgewiesen werden (CU: $p=0,683$ und MC: $p=0,052$ gegen die Kontrollgruppe).

Im Weiteren wurden die Leukozytenkonzentrationen der Proben der Studienteilnehmer mit nachgewiesenem *Gardnerella vaginalis*-Biofilm gegen die Proben ohne *Gardnerella vaginalis*-Biofilm getestet und es zeigt sich eine signifikant höhere Leukozytenkonzentration bei den Proben mit Biofilmnachweis ($p=0,012$).



	Anzahl	Leukozyten $\times 10^5/ml \pm SD$
Kontrolle	N=49	1,09 \pm 2,56
nur männl.	N=12	1,15 \pm 3,84
nur weibl.	N=37	1,06 \pm 2,06
MC	N=42	2,98 \pm 7,86
nur männl.	N=12	0,24 \pm 0,23
nur weibl.	N=30	4,07 \pm 9,11
CU	N=46	1,51 \pm 2,79
nur männl.	N=15	0,14 \pm 0,34
nur weibl.	N=31	2,18 \pm 3,20

Abbildung 4.2: Leukozytenkonzentrationen – Gruppen insgesamt

Tabelle 4.2: Leukozytenkonzentrationen - nach Geschlechtern

4.2 Pilze

Pilze waren aufgrund von Form und Größe in der DAPI-Gegenfärbung gut von Epithelzellen, Leukozyten und Bakterien abgrenzbar. Die nachgewiesenen Pilze zeigen sich entweder als fadenförmige Hyphen, oder auch als Sporen (s.a. Abbildung 4.3).

Es waren nur in 8 Proben des gesamten Kollektivs Pilze nachweisbar. Zwei dieser Proben entfielen auf die Morbus-Crohn-Gruppe (4,8 % des MC-Kollektivs), fünf auf die Colitis-ulcerosa-Gruppe (10,9 % des CU-Kollektivs) und eine auf das Kontrollkollektiv (2,0 %). Damit ergaben sich mit dem χ^2 -Test p-Werte von 0,469 für Morbus Crohn und 0,077 für Colitis ulcerosa.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Pilzen und der Diagnosegruppe gibt.

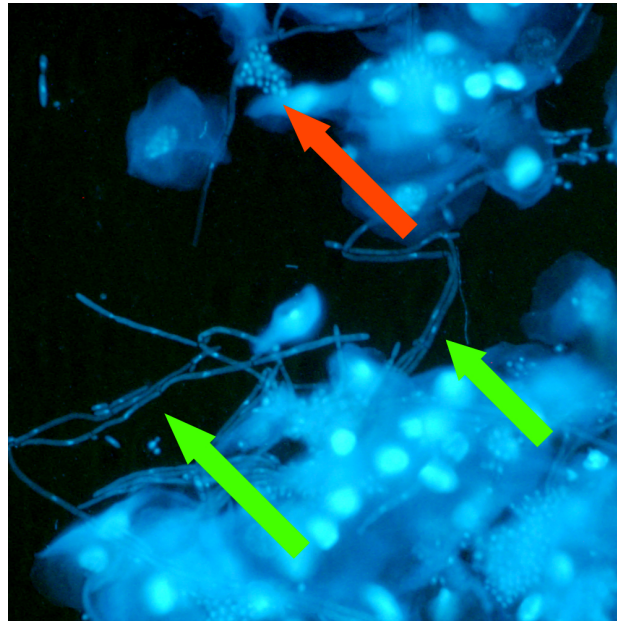


Abbildung 4.3: Pilzmorphologie in DAPI.

Aufnahme bei 400-facher Vergrößerung.

Man kann deutlich die Sporen (z.B. oranger Pfeil) und die fadenförmigen Hyphen (z.B. grüne Pfeile) zwischen den Epithelzellen unterscheiden.

4.3 Bakterielle Besiedlung

4.3.1 Gesamtkonzentration der Bakterien

Die bakterielle Gesamtkonzentration pro Milliliter wurde, wie auch die der Zellen, mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests ausgewertet, da eine Normalverteilung nach Testung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test nicht mit ausreichender Sicherheit gegeben war. Es fanden sich höhere Bakterienkonzentrationen in den Proben von CED-Patienten, der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

In den Proben der Kontrollgruppe fand sich eine durchschnittliche Konzentration von $2,05 \cdot 10^6$ Bakterien pro Milliliter (SD: $6,81 \cdot 10^6$ Bakterien/ml). Die Proben der Patienten mit einem Morbus Crohn enthielten eine Konzentration von durchschnittlich $2,57 \cdot 10^6$ Bakterien pro Milliliter (SD: $9,03 \cdot 10^6$ Bakterien/ml), während sich bei den Proben der Colitis-ulcerosa-Patienten eine Durchschnittskonzentration von $3,17 \cdot 10^6$ Bakterien pro Milliliter (SD: $10,13 \cdot 10^6$ Bakterien/ml) zeigte. Beim Vergleich der Morbus-Crohn-Gruppe mit der Kontrollgruppe ergab sich beim Mann-Whitney-U-Test ein p-Wert von 0,128, bei der Colitis-ulcerosa-Gruppe ein p-Wert von 0,181. Ein signifikanter Unterschied der Konzentrationen konnte somit nicht nachgewiesen werden, wenn beide Geschlechter gemeinsam untersucht werden.

Betrachtet man allein die Proben der weiblichen Studienteilnehmer, so konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (MC: $p=0,228$ und CU: $p=0,151$).

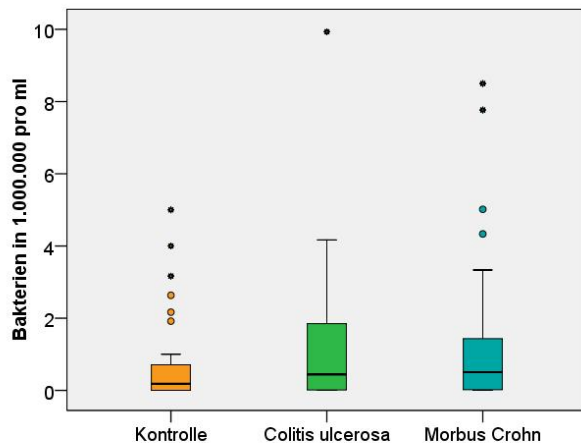


Abbildung 4.4: Gesamtbakterienkonzentration – Gruppen insgesamt

	Anzahl	Bakterien $\times 10^6/\text{ml} \pm \text{SD}$
Kontrolle	N=49	2,05 \pm 6,81
nur männl.	N=12	0,00 \pm 0,02
nur weibl.	N=37	2,71 \pm 7,74
MC	N=42	2,57 \pm 9,03
nur männl.	N=12	0,37 \pm 0,67
nur weibl.	N=30	3,45 \pm 10,59
CU	N=46	3,17 \pm 10,13
nur männl.	N=15	4,55 \pm 17,21
nur weibl.	N=31	2,50 \pm 3,77

Tabelle 4.3: Gesamtbakterienkonzentration - nach Geschlechtern

Die Analyse der Proben der männlichen Teilnehmer alleine lieferte jedoch signifikante Ergebnisse in der Testung. Es zeigte sich hier, dass die Proben der Patienten mit einem Morbus Crohn ($p=0,422$) und die Proben der Colitis-ulcerosa-Patienten ($p=0,014$) signifikant mehr Bakterien pro Milliliter enthielten als die Proben in der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse werden auch in Graphik 4.4 und in Tabelle 4.3 dargestellt.

4.3.2 Diffus verteilte Bakterien

Die räumliche Anordnung der Bakterien und deren Assoziation zu epithelialen Zellen erlaubt eine grobe Zuordnung ihrer Herkunft. Diffus verteilte Bakterien ohne direkten räumlichen Kontakt zu den Epithelzellen wurden als „urinary tract associated“ gewertet, während epithelzell-adhärenente Bakterien als dem genitalen Epithel zugehörige Bakterien gewertet wurden.⁶³

Die Konzentrationen der diffus verteilten Bakterien waren nicht mit ausreichender Sicherheit normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test p -Wert $<0,05$) und wurden deshalb mit dem Mann-Whitney-U-Test ausgewertet.

Insgesamt zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den bakteriellen Gesamtkonzentrationen. Die Konzentrationen in den Proben der Kontrollgruppe sind mit durchschnittlich $1,71 \cdot 10^6$ Bakterien pro Milliliter (SD: $6,41 \cdot 10^6$ Bakterien/ml) am niedrigsten, während bei den UC-Patienten durchschnittlich $2,56 \cdot 10^6$ Bakterien pro Milliliter (SD: $9,91 \cdot 10^6$ Bakterien/ml) und bei den Proben der MC-Patienten $2,32 \cdot 10^6$ Bakterien pro Milliliter (SD: $9,00 \cdot 10^6$ Bakterien/ml) nachweisbar waren (s.a. Abbildung 4.5 und Tabelle 4.4).

Der Unterschied in den Konzentrationen der „urinary tract associated bacteria“ war bei der Colitis ulcerosa mit einem p -Wert von 0,118 nicht signifikant, während er beim Morbus Crohn mit einem p -Wert von 0,087 ebenso nicht signifikant war. Werden nur die Proben

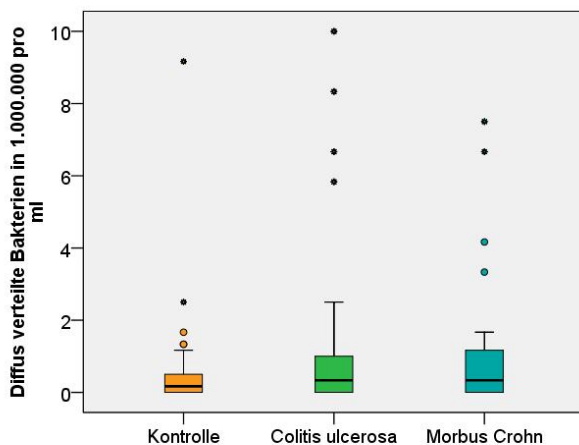


Abbildung 4.5: Konzentrationen der diffus verteilten Bakterien – Gruppen insgesamt

	Anzahl	Bakterien $\times 10^6/ml \pm SD$
Kontrolle	N=49	1,71 \pm 6,41
nur männl.	N=12	0,00 \pm 0,02
nur weibl.	N=37	2,26 \pm 7,32
MC	N=42	2,32 \pm 9,00
nur männl.	N=12	0,25 \pm 0,36
nur weibl.	N=30	3,15 \pm 10,58
CU	N=46	2,56 \pm 9,91
nur männl.	N=15	4,53 \pm 17,19
nur weibl.	N=31	1,61 \pm 2,54

Tabelle 4.4: Konzentrationen der diffus verteilten Bakterien - nach Geschlechtern

der Studienteilnehmerinnen untersucht, so finden sich ebenso keine signifikanten Unterschiede (MC: $p=0,170$ und UC: $p=0,092$). Betrachtet man nur die männlichen Studienteilnehmer, so finden sich knapp signifikant mehr diffus verteilte Bakterien in der Morbus Crohn-Gruppe und in der Colitis ulcerosa-Gruppe als in der Kontrollgruppe (MC: $p=0,039$ und CU: $p=0,047$).

4.3.3 Adhärenente Bakterien

Epithelzellen anhaftende Bakterien wurden, wie oben beschrieben, als dem Genitaltrakt zugehörig gewertet.⁶³

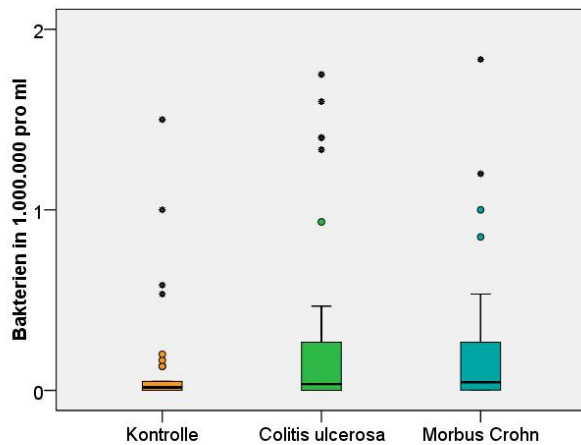
Hierbei wurden Bakterien, die Bestandteil des einer Epithelzelle anhaftenden Biofilms waren, als adhärenente Bakterien gezählt.

Die Konzentrationen der adhärenenten Bakterien wurden, wie auch die Gesamtkonzentrationen der Bakterien, mit dem Mann-Whitney-U-Test ausgewertet, da sie nicht mit ausreichender Sicherheit normalverteilt waren (Kolmogorov-Smirnov-Test p -Wert $<0,05$).

Die Proben des Kontrollkollektivs enthielten im arithmetischen Mittel $0,34 \cdot 10^6$ adhärenente Bakterien pro Milliliter (SD: $0,86 \cdot 10^6$ Bakterien/ml), die der Colitis ulcerosa Gruppe im Mittel $0,60 \cdot 10^6$ adhärenente Bakterien pro Milliliter (SD: $1,29 \cdot 10^6$ Bakterien/ml) und die Proben der Morbus Crohn Gruppe $0,33 \cdot 10^6$ adhärenente Bakterien pro Milliliter (SD: $0,71 \cdot 10^6$ Bakterien/ml). Graphisch sind die Ergebnisse auch in Abbildung 4.6 dargestellt.

Die höhere Konzentration an adhärenenten Bakterien war jedoch statistisch nicht signifikant, so ergab sich in der Testung gegen das Kontrollkollektiv für die CU-Gruppe ein p -Wert von $0,283$ und für die MC-Gruppe ein p -Wert von $0,161$.

Wertet man die Proben geschlechtsgetrennt aus, so zeigen die Proben der männlichen CU-Patienten ($p=0,022$) und die Proben der männlichen MC-Patienten ($p=0,008$) eine



	Anzahl	Bakterien $\times 10^6/ml \pm SD$
Kontrolle	N=49	0,34 \pm 0,86
nur männl.	N=12	0,00 \pm 0,00
nur weibl.	N=37	0,45 \pm 0,97
MC	N=42	0,33 \pm 0,71
nur männl.	N=12	0,12 \pm 0,34
nur weibl.	N=30	0,41 \pm 0,80
CU	N=46	0,60 \pm 1,29
nur männl.	N=15	0,02 \pm 0,04
nur weibl.	N=31	0,88 \pm 1,50

Abbildung 4.6: Konzentrationen der adhärennten Bakterien – Gruppen insgesamt

Tabelle 4.5: Konzentrationen der adhärennten Bakterien - nach Geschlechtern

signifikant höhere Konzentration an adhärennten Bakterien als die Proben der männlichen Probanden der Kontrollgruppe.

Während bei der Analyse der Proben der männlichen Studienteilnehmer ein signifikanter Unterschied gezeigt werden konnte, so konnte dieser bei der Testung der Proben der weiblichen CED-Patientinnen gegen die Proben der Kontroll-Probandinnen nicht gezeigt werden (MC: $p=0,370$ und CU: $p=0,170$).

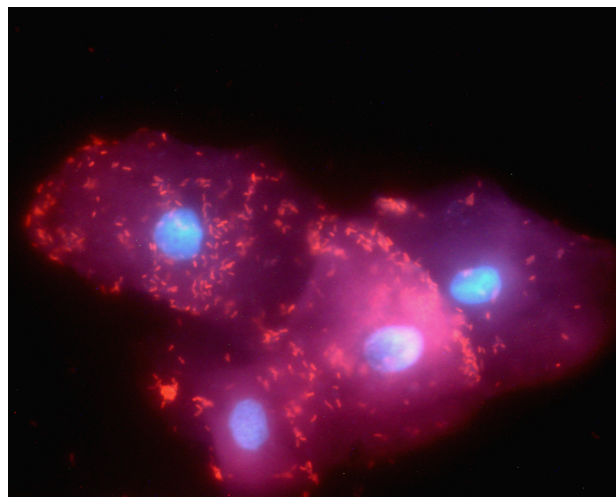


Abbildung 4.7: Adhärennte Gardnerella vaginalis mit DAPI-Gegenfärbung. Aufnahme bei 1000-facher Vergrößerung. Deutlich kann man die adhärennten Bakterien erkennen, zur besseren Visualisierung wurden Bilder mit DAPI-Filter und Cy5-Filter übereinandergelegt.

Anteil der Epithelzellen mit anhaftendem Biofilm

Ein Biofilm ist ein flächendeckender bakterieller Bewuchs einer Oberfläche, wobei sowohl die enthaltenen Bakterien, als auch ihre extrazelluläre Matrix als Bestandteile gezählt werden.

Viele epitheliale Zellen waren mit einem bakteriellen Biofilm besiedelt. Der Aufbau dieses Biofilms unterschied sich nicht nur in der räumlichen Anordnung, sondern auch in der Zusammensetzung der Bakterienspezies. Ein Biofilm auf einer Epitheloberfläche ist aber immer ein Indikator für eine gestörte epitheliale Funktion, weshalb wir den prozentualen Anteil der mit einem Biofilm besetzten Epithelzellen an den insgesamt in der Probe enthaltenen Epithelzellen ermittelten. Die ermittelten Werte der Gruppen wurden dann mit dem Mann-Whitney-U-Test gegeneinander getestet. Um einen optischen Eindruck von Epithelzellen mit einem bakteriellen Biofilm zu gewinnen, sei auf die Abbildung 4.9 verwiesen.

Im Median waren in den Proben aller Gruppen 0% der Epithelzellen mit einem Biofilm bedeckt. Die statistische Testung der CU-Gruppe und der MC-Gruppe gegen das Kontrollkollektiv ergab keine signifikanten Unterschiede. Es ergaben sich p-Werte von 0,644 für die CU-Gruppe und 0,934 für die MC-Gruppe.

Auch in der geschlechtsgetrennten statistischen der Ergebnisse zeigten sich weder für die männlichen Studienteilnehmer (MC: $p=0,317$ und CU: $p=0,058$) alleine noch für die weiblichen Studienteilnehmer (MC: $p=0,216$ und CU: $p=0,053$) alleine signifikante Unterschiede im prozentualen Anteil der mit einem Biofilm bedeckten Epithelzellen.

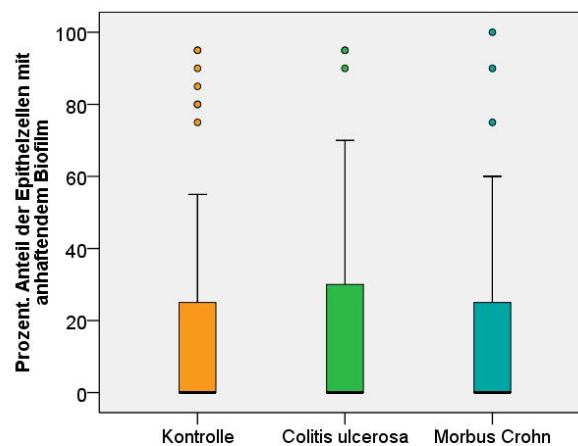


Abbildung 4.8: Prozentualer Anteil der biofilmbelasteten Epithelzellen nach Diagnose.

Im Median waren in den Proben aller Gruppen 0% der Epithelzellen mit einem Biofilm bedeckt.

4.3.4 *Gardnerella vaginalis* Biofilm

Auswertung des Gesamtkollektivs

Bei den Untersuchungen zum *Gardnerella*-Biofilm fällt in der statistischen Analyse auf, dass er bei CED-Patienten wesentlich häufiger nachweisbar ist, als in der Kontrollgruppe. Die Proben der CU-Gruppe enthielten zu 43,48 % Epithelzellen mit anhaftendem *Gardnerella vaginalis* Biofilm und damit hochsignifikant ($p=0,004$) öfter als die der Kontrollgruppe (16,33 %). Dieser Biofilm war in 38,10 % der Proben von MC-Patienten nachweisbar, was signifikant häufiger ($p=0,019$) war als in den Proben des Kontrollkollektivs.

Die absoluten Häufigkeiten, der relative Anteil an den Proben der Gruppe und die p -Werte sind nochmals in Tabelle 4.6 dargestellt.

Tabelle 4.6: *Gardnerella*-Biofilm, beide Geschlechter

Diagnose		<i>Gardnerella</i> Biofilm pos. (prozentualer Anteil)	<i>Gardnerella</i> Biofilm neg. (prozentualer Anteil)	p -Wert
Kontrolle	(n=49)	n=8 (16,33 %)	n=41 (83,67 %)	
CU	(n=46)	n=20 (43,48 %)	n=26 (56,52 %)	$p=0,004$
MC	(n=42)	n=16 (38,10 %)	n=26 (61,90 %)	$p=0,019$

Geschlechtsgetrennte Auswertung von *Gardnerella vaginalis* Biofilmen

Tabelle 4.7: *Gardnerella*-Biofilm, nur Patientinnen und Probandinnen

Diagnose		<i>Gardnerella</i> Biofilm pos. (prozentualer Anteil)	<i>Gardnerella</i> Biofilm neg. (prozentualer Anteil)	p -Wert
Kontrolle	(n=37)	n= 8 (21,62 %)	n=29 (78,38 %)	
CU	(n=31)	n=15 (48,39 %)	n=16 (51,61 %)	$p=0,020$
MC	(n=30)	n=14 (46,67 %)	n=16 (53,33 %)	$p=0,030$

Analysiert man nur die Proben der männlichen Patienten und Probanden, so finden sich keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens von *Gardnerella vaginalis* Biofilmen bei der Morbus Crohn-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,140$), allerdings finden sich signifikant öfter *Gardnerella vaginalis* Biofilme in den Proben der Colitis ulcerosa Patienten als in den Proben der männlichen Kontrollprobanden ($p=0,027$).

Betrachtet man nur die Patientinnen und Probandinnen, so finden sich auch hier signifikante Häufigkeitsdifferenzen. Es enthalten 21,62 % der Kontrollgruppe, 48,39 % der CU-Gruppe und 46,67 % der MC-Gruppe Epithelzellen mit biofilmartig adhärenen *Gardnerella vaginalis*. Aus den Daten ergibt sich für die CU ein p -Wert von 0,020 und für den MC ein p -Wert von 0,030 im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv (s.a. Tabelle 4.7).

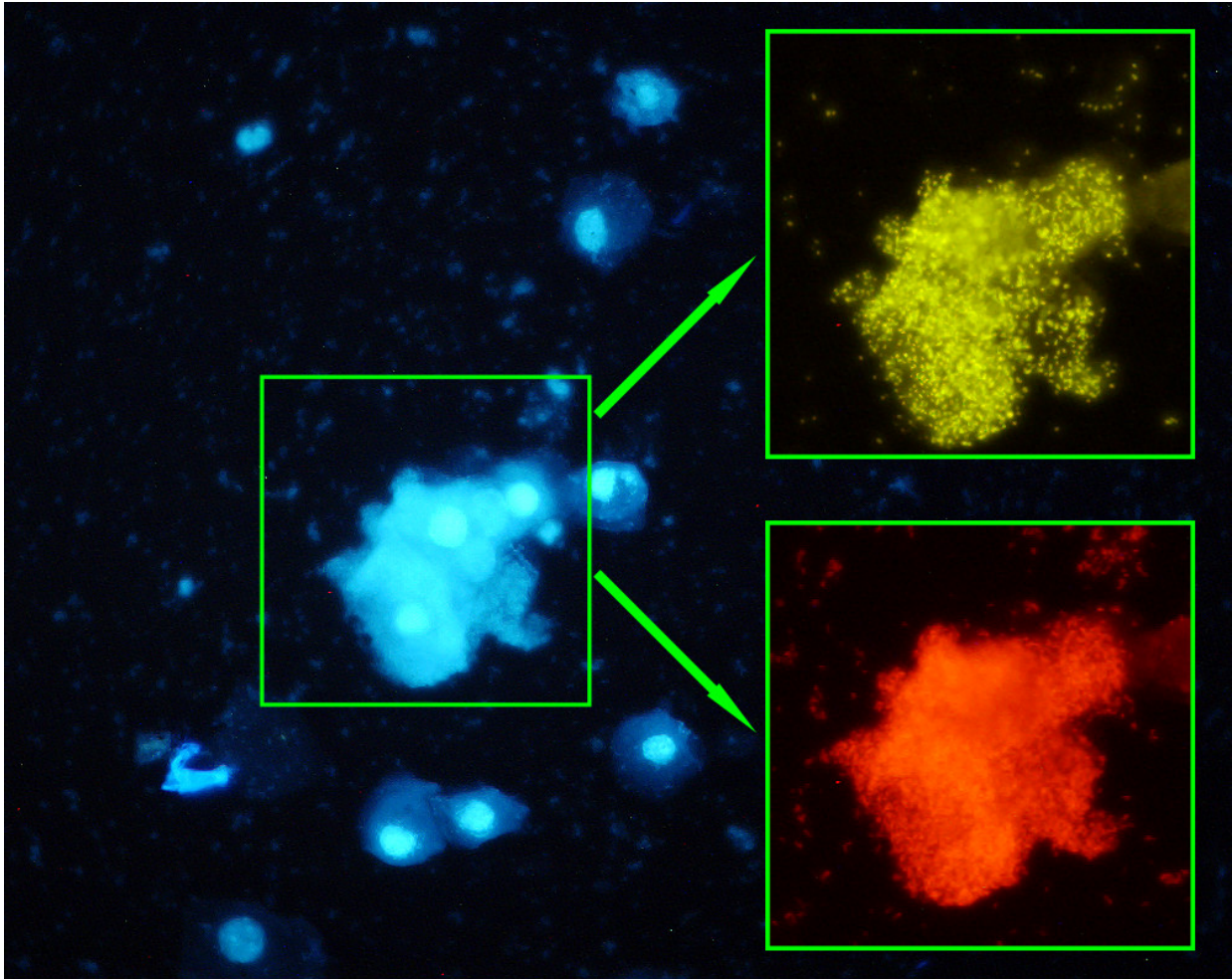


Abbildung 4.9: Epithelzellen mit anhaftendem Biofilm.

Aufnahme bei 400-facher Vergrößerung. Das Bild zeigt die Gegenfärbung in DAPI mit blauer Fluoreszenz, in der oberen Vergrößerung sieht man die Atopobium-Sonde in gelb/orange (Cy3) und im unteren Bild die Gardnerella-Sonde in rot (Cy5). Man erkennt in allen Bildern deutlich den bakteriellen Biofilm, der in diesem Fall vor allem aus *Atopobium vaginae* und *Gardnerella vaginalis* besteht.

Die höheren p-Werte dieser Auswertung im Vergleich zur Auswertung beider Geschlechter ergeben sich durch den geringeren Stichprobenumfang.

Aktuelle Erkrankungsaktivität und *Gardnerella vaginalis* Biofilme

Für die Analyse eines Zusammenhangs zwischen Erkrankungsaktivität und einem *Gardnerella vaginalis* Biofilm wurden die Patientenkollektive in je drei Gruppen eingeteilt. Hierbei wurde entsprechend Tabelle 4.8 zwischen schwerem Schub, Schub und Remission unterschieden. Die statistische Analyse zeigte keine signifikanten Ergebnisse. Bei der Colitis ulcerosa Gruppe ergab sich ein p-Wert von 0,492 (Korrelationskoeffizient: 0,104) und bei der Morbus Crohn Gruppe ein p-Wert von 0,385 (Korrelationskoeffizient: 0,138).

Tabelle 4.8: Patientendaten

Gruppe	Anzahl (prozent. Anteil)	Durchschnittsalter (Min. – Max.)	Anz. mit CAI:			Anz. mit CDAI:		
			<5	5-10	>10	<150	150-450	>450
Kontrolle	49 (100 %)	52,0 (20 – 79)						
männl.	12 (24,5 %)	50,7 (20 – 77)						
weibl.	37 (75,5 %)	54,0 (22 – 79)						
MC	42 (100 %)	44,1 (20 – 73)				22	18	2
männl.	12 (28,6 %)	45,2 (26 – 73)				8	4	0
weibl.	30 (71,4 %)	43,7 (20 – 73)				14	14	2
UC	46 (100 %)	48,4 (19 – 88)	27	15	4			
männl.	15 (32,6 %)	48,1 (19 – 75)	11	3	1			
weibl.	31 (67,4 %)	48,8 (23 – 88)	16	12	3			

Steroidabhängige oder steroidrefraktäre Verläufe und *Gardnerella vaginalis* Biofilme

Ein chronisch aktiver Verlauf ist definitionsgemäß gekennzeichnet durch ein Persistieren der klinischen Symptome unter einer adäquaten medikamentösen Therapie. Die medikamentöse Therapie bewirkt zwar eine Besserung, kann jedoch keine vollständige und dauerhafte Remission erreichen. Außerdem wird die Notwendigkeit einer Dauertherapie mit Glukokortikosteroiden oder ein steroidrefraktärer Verlauf gefordert.²⁹

Als Notwendigkeit einer Dauertherapie wird definiert, dass Patienten nach dem Absetzen der Glukokortikoide innerhalb von 3 Monaten einen neuen Schub entwickeln oder dass die Steroide innerhalb von 3 Monaten nach dem Beginn der Therapie nicht ausgeschlichen werden können, ohne dass es zu einem Schub kommt. Als steroidrefraktärer Verlauf wird ein Verlauf definiert, bei dem es trotz einer vierwöchigen Glukokortikoidtherapie nicht zu einer Remission kommt^{26,28}

Bei den 46 in die Studie eingeschlossenen Colitis-ulcerosa-Patienten wurde bei 15 Patienten (32,6 %) ein steroidabhängiger oder -refraktärer Verlauf festgestellt. Die verbleibenden

31 Patienten hatten keinen chronisch aktiven Verlauf.

Tabelle 4.9: Chronisch aktiver Verlauf und *Gardnerella vaginalis* Biofilme

Gruppe		Biofilm pos. (prozentualer Anteil)	Biofilm neg. (prozentualer Anteil)	p-Wert
MC				
insgesamt	(n=42)	16 (38,1 %)	26 (61,9 %)	
chron. aktiv	(n=19)	13 (68,4 %)	6 (31,6 %)	p<0,001
nicht chron. aktiv	(n=23)	3 (13,0 %)	20 (87,0 %)	
UC				
insgesamt	(n=46)	20 (43,5 %)	26 (56,5 %)	
chron. aktiv	(n=15)	12 (80,0 %)	3 (20,0 %)	p=0,001
nicht chron. aktiv	(n=31)	8 (25,8 %)	23 (74,2 %)	

Die Probanden des Morbus Crohn Kollektivs wiesen in 19 von 42 Fällen (45,2 %) einen chronisch aktiven Verlauf auf, während die verbliebenen 23 Patienten keinen chronisch aktiven Verlauf zeigten.

In den Proben des CU-Kollektivs war in 12 von 15 (80,0 %) Proben der Patienten mit chronisch aktivem Verlauf biofilmartig adhärente *Gardnerella vaginalis* nachweisbar, während das nur bei 9 von 30 (26,7 %) Proben der Patienten ohne chronisch aktiven Verlauf der Fall war.

Bei den Proben des MC-Kollektivs offenbarte sich ein ähnliches Bild. Die Urinproben der Untergruppe der MC-Patienten mit chronisch aktivem Verlauf enthielten in 14 von 19 (68,4 %) Fällen einen *Gardnerella vaginalis* Biofilm, demgegenüber enthielten die Proben der Patienten ohne chronisch aktivem Verlauf nur in 3 von 23 (13,0 %) Fällen diesen Biofilm.

In der statistischen Testung mit dem χ^2 -Test zeigte sich für die Colitis-ulcerosa-Gruppe (p-Wert = 0,001) und für die Morbus-Crohn-Gruppe (p-Wert < 0,001) ein hochsignifikanter Unterschied in der Häufigkeit eines *Gardnerella-vaginalis*-Biofilms zwischen chronisch aktivem und nicht chronisch aktivem Verlauf.

Eine Übersicht der Daten zum Zusammenhang zwischen chronisch-aktiven Verläufen und *Gardnerella vaginalis* Biofilmen findet sich in Tabelle 4.9.

Aktuelle orale Medikation mit Glucocorticoiden und *Gardnerella vaginalis* Biofilme

Nachdem weiter oben bereits eine Assoziation zwischen steroidrefraktären und -abhängigen Verläufen und dem Auftreten eines *Gardnerella vaginalis* Biofilms gezeigt werden konnte, soll in diesem Abschnitt untersucht werden, ob auch eine kurzfristiger Medikation mit Glucocorticoiden mit einem gehäuften Auftreten eines *Gardnerella vaginalis* Biofilms assoziiert ist.

Tabelle 4.10: Orale Glucocorticoideinnahme und *Gardnerella vaginalis* Biofilme. Die p -Werte beziehen sich auf die Testung mit dem χ^2 -Test gegen die jeweilige Patientengruppe ohne Glucocorticoideinnahme. Bezüglich der Häufigkeit eines *Gardnerella vaginalis* Biofilms ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit Glucocorticoideinnahme und ohne Glucocorticoideinnahme.

Gruppe	Biofilm pos.	Biofilm neg.	p -Wert
Kontrollgruppe			
insgesamt (n=49)	8 (16,3 %)	41 (83,7 %)	
Glucocorticoide (n=6)	0 (0,0 %)	6 (100,0 %)	p=0,248
keine Glucocorticoide (n=43)	8 (18,6 %)	35 (81,4 %)	
MC			
insgesamt (n=42)	16 (38,1 %)	26 (61,9 %)	
Glucocorticoide* (n=6)	0 (0,0 %)	6 (100,0 %)	p=0,270
keine Glucocorticoide (n=17)	3 (17,6 %)	14 (82,4 %)	
UC			
insgesamt (n=46)	20 (43,5 %)	26 (56,5 %)	
Glucocorticoide* (n=9)	4 (44,4 %)	5 (55,5 %)	p=0,129
keine Glucocorticoide (n=22)	4 (18,2 %)	18 (81,8 %)	

* Medikation mit Glucocorticoiden ohne steroidabhängige oder -refraktäre Verläufe

In Tabelle 4.10 sind die Daten zu einer möglichen Assoziation zwischen einer aktuellen Glucocorticoidmedikation und eines epithelialen *Gardnerella vaginalis* Biofilms aufgeführt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es keine signifikante Häufung von *Gardnerella vaginalis* Biofilmen in den Urinproben von Patienten mit einer Glucocorticoidtherapie gibt, wenn man die nur die Patienten mit einer Therapie mit Glucocorticoiden ohne die Patienten mit einem steroidabhängigen oder -refraktäem Verlauf betrachtet.

Primär sklerosierende Cholangitis (PSC) bei der Colitis ulcerosa und *Gardnerella vaginalis* Biofilme

Die 46 erfassten Colitis-ulcerosa-Patienten hatten in 12 Fällen eine gesicherte PSC und in 34 Fällen keine PSC. Im Vergleich zur einschlägigen Literatur kommt im untersuchten Kollektiv PSC deutlich häufiger vor (26,1 % in der vorliegenden Studie vs. <7,5 % in der Literatur),⁴ was daran liegen kann, dass es sich um Spezialsprechstunden einer Universitätsambulanz handelte.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen PSC und einem *Gardnerella vaginalis* Biofilm wurde mithilfe des χ^2 -Tests ausgewertet. In den Proben der 12 Patienten mit einer PSC war in 7 Proben (58,3 %) ein Biofilm nachweisbar. Bei den 34 Colitis-ulcerosa Patienten ohne PSC waren es 13 Patienten (38,2 %). In der statistischen Testung ergab sich ein p -Wert von 0,227 und somit kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Fisteln und *Gardnerella vaginalis* Biofilme

Die Patienten der Morbus-Crohn-Kohorte hatten in 14 von 42 (33,3 %) Fällen Fisteln zum Zeitpunkt der Probenabgabe, oder aber Fisteln in der Vorgeschichte. Hierbei spielte es keine Rolle, um welche Fisteln es sich handelte, oder ob multiple Fisteln in der Vorgeschichte auftraten.

Die erhobenen Daten decken sich damit mit Angaben aus der Literatur, wo Prävalenzen von ca. 17 % bis zu 50 % angegeben werden.

In der Auswertung zeigte sich, dass die Proben von 7 der 14 (50,0 %) Patienten mit Fisteln Epithelzellen enthielten, die mit einem *Gardnerella vaginalis* Biofilm bewachsen waren. Im Gegensatz dazu enthielten nur 9 von 28 (32,1 %) Proben der Patienten ohne Fisteln Zellen mit einem solchen Biofilm.

Wie schon bei der PSC wurden die Daten anschließend mithilfe des χ^2 -Tests ausgewertet. Hier zeigte sich ein p-Wert von 0,261 und somit kein signifikanter Unterschied zwischen MC-Patienten mit Fisteln und ohne Fisteln bezüglich der Häufigkeit eines *Gardnerella vaginalis* Biofilms.

Alter und *Gardnerella vaginalis* Biofilme

Die Korrelationsanalyse mit dem Spearmans Rangkorrelationskoeffizient von Alter und einem *Gardnerella* Biofilm zeigte sich, dass tendenziell bei CED-Patienten eher bei jüngeren Patienten ein Biofilm nachweisbar ist, während sich bei der Kontrollgruppe keine Tendenz (p-Wert: 0,539; Korrelationskoeffizient: $r=0,090$) nachweisen lässt.

Bei der Testung des Colitis-ulcerosa-Kollektivs lies sich mit einem p-Wert von 0,053 ($r=0,288$) allerdings kein signifikanter Unterschied nachweisen. Im Gegensatz dazu ergab sich Morbus-Crohn-Kollektiv ein p-Wert von 0,042 ($r=0,316$) und damit eine signifikante Korrelation zwischen einem jüngeren Patientenalter und einem *Gardnerella vaginalis* Biofilm.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Biofilm vor allem bei jüngeren CED-Patienten nachweisbar ist.

4.3.5 Semiquantitative Bestimmung einzelner Bakteriengruppen

Die statistische Analyse der einzelnen Bakterienspezies erfolgte semiquantitativ entsprechend der vorher festgelegten Einteilung, die auch in Tabelle 3.7 einsehbar ist. Die statistische Testung erfolgte mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests.

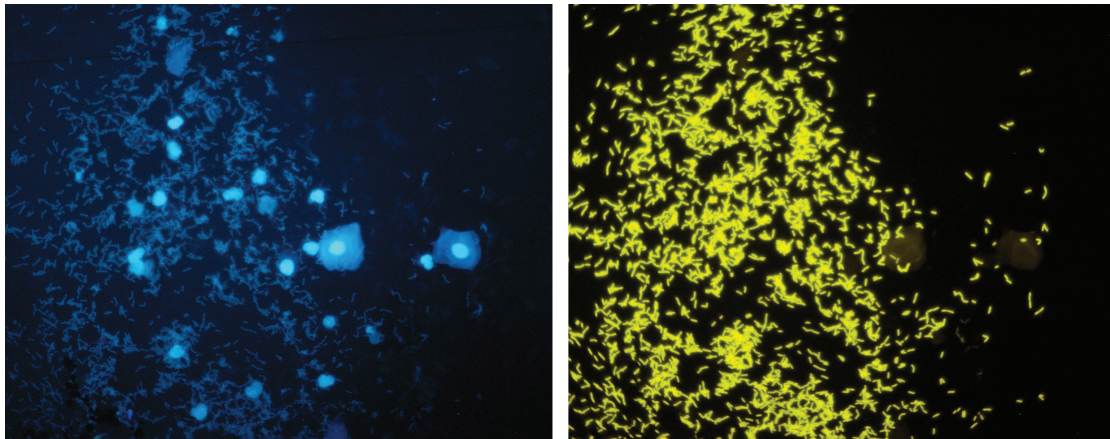
Enterobacteriaceae

Abbildung 4.10: Räumliche Verteilung von Enterobacteriaceae

Im linken Bild ist die Gegenfärbung in DAPI zu sehen und im rechten Bild die Enterobacteriaceae-Sonde in Cy3. Die diffuse Verteilung der Bakterien ist deutlich erkennbar.

Aufnahme bei 400-facher Vergrößerung.

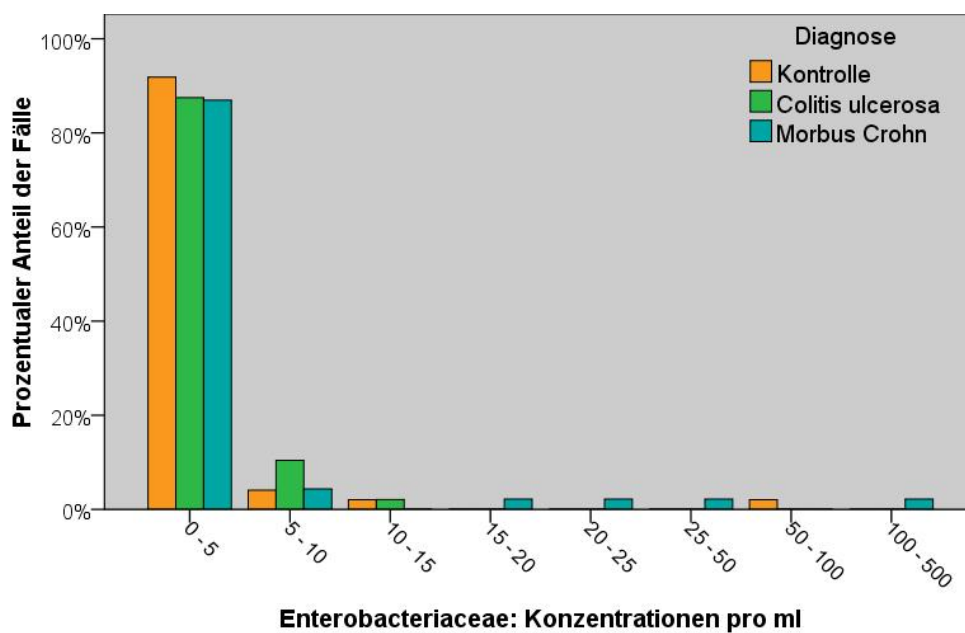


Abbildung 4.11: Semiquantitative Enterobacteriaceae-Konzentrationen

Die bakteriellen Konzentrationen sind in der Abbildung mit einem Faktor von $\times 10^5$ skaliert. Die Gruppen entsprechen der in Tabelle 3.7 beschriebenen Einteilung

Der Hauptvertreter dieser Gruppe ist *Escherichia coli* (E. coli) und seine verschiedenen Stämme. E. coli ist der häufigste Erreger von Harnwegsinfekten, wobei davon ausgegangen wird, dass es sich hierbei um eine fäkale Schmierinfektion handelt.⁶⁷

In der Untersuchung der Proben zeigte sich, dass die markierten *Enterobacteriaceae* meist diffus verteilt vorlagen, was beispielhaft in Graphik 4.10 gezeigt wird. Die Proben der Kontrollgruppe enthielten in 4 von 49 Fällen (8,2 %; Median: 0), die der Colitis-ulcerosa-Gruppe in 5 von 46 Fällen (10,9 %; Median: 0) und die der Morbus-Crohn-Gruppe in 5 von 42 Fällen *Enterobacteriaceae* (11,9 %; Median: 0).

In der statistischen Testung gegen das Kontrollkollektiv war weder für die Colitis-ulcerosa-Gruppe (p-Wert: 0,692), noch für die Morbus-Crohn-Gruppe (p-Wert: 0,534) ein signifikanter Unterschied nachweisbar. In der Abbildung 4.11 werden die semiquantitativen Konzentrationen in den Unterschiedlichen Kollektiven nochmals dargestellt.

Bifidobacteriaceae

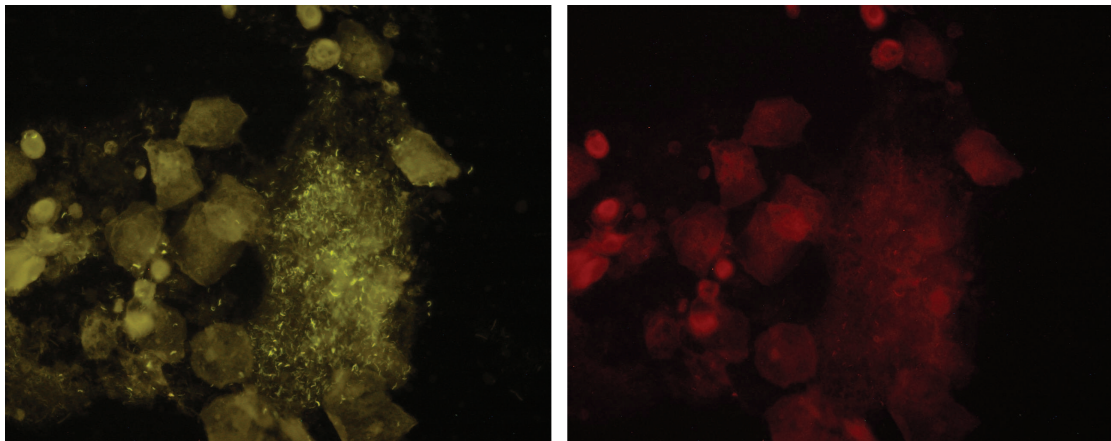


Abbildung 4.12: Im linken Bild ist die Färbung mit der Bifidobacteriaceae-Sonde in Cy3 zu sehen und im rechten Bild die Färbung mit der Gardnerella-vaginalis-Sonde in Cy5. Im Vergleich der beiden Bilder wird ersichtlich, dass die Bifidobacteriaceae-Sonde Bakterien anfärbt, während die Gardnerella-vaginalis-Sonde diese nicht färbt. Dieser Unterschied zeigt, dass es sich um andere Bifidobacteriaceae handelt als Gardnerella vaginalis. Aufnahme bei 400-facher Vergrößerung.

Die Familie der *Bifidobacteriaceae* umfasst unter anderem *Gardnerella vaginalis*, aber auch andere Gattungen, wie zum Beispiel die klassischen Bifidobakterien (s.a. Abbildung 4.12). In der jetzigen Untersuchung fanden sich jedoch ganz überwiegend nur *Bifidobacteriaceae*, die auch durch die *Gardnerella-vaginalis*-Sonde markiert wurden, also zu dieser Gattung gehörten.

Insgesamt waren bei der Kontrollgruppe in 12 von 49 (24,5 %) Fällen, bei der Colitis-ulcerosa-Gruppe in 20 von 46 (43,5 %) und in der Morbus-Crohn-Gruppe in 16 von 42 (38,1 %) Fällen *Bifidobacteriaceae* nachweisbar. Der Median der Konzentrationen war jeweils 0. In der statistischen Testung mit dem Mann-Whitney-U-Test gegen die Kontrollgruppe ergaben sich für die CU-Gruppe ein p-Wert von 0,077 und für die MC-Gruppe ein

p-Wert von 0,197 und somit keine signifikanten Unterschiede in den erfassten *Bifidobacteriaceae*-Konzentrattionen. Die markierten *Bifidobacteriaceae* waren hierbei überwiegend Epithelzellen adhärent (s.a. Abbildung 4.13). Die nachgewiesenen semiquantitativen Konzentrationen werden in Abbildung 4.14 nochmals visualisiert.

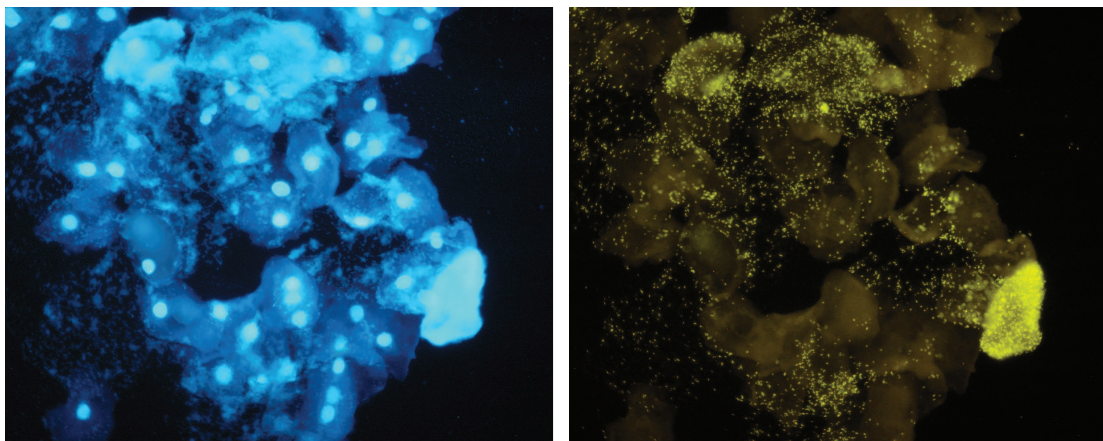


Abbildung 4.13: Im linken Bild ist die Gegenfärbung in DAPI zu sehen und im rechten Bild die Bifidobacteriaceae-Sonde in Cy3. Die überwiegend adhärente Verteilung der Bakterien ist deutlich erkennbar, jedoch sind auch diffus verteilte Bakterien sichtbar. Aufnahme bei 400-facher Vergrößerung.

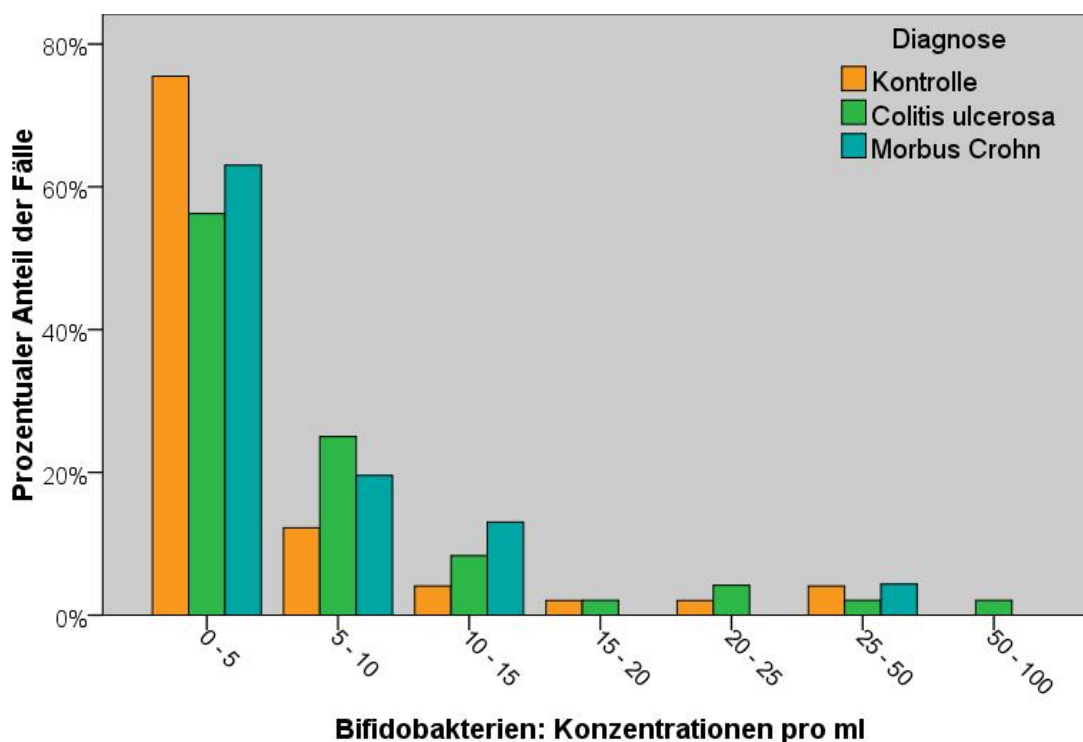


Abbildung 4.14: Semiquantitative Bifidobacteriaceae-konzentrationen
Die bakteriellen Konzentrationen sind in der Abbildung mit einem Faktor von $\times 10^5$ skaliert. Die Gruppen entsprechen der in Tabelle 3.7 beschriebenen Einteilung

Atopobium vaginae

Atopobium vaginae ist ein typischer Bestandteil des Biofilms, der für eine bakterielle Vaginose typisch ist.⁶⁵ Auch in dieser Untersuchung fand sich *Atopobium vaginae* nahezu ausschließlich als Teil eines adhärenen Biofilms, dessen Hauptbestandteil *Gardnerella vaginalis* war (s.a. Abbildung 4.9).

Bei der mikroskopischen Auswertung lies sich in 6 von 49 (12,2%) Proben der Kontrollgruppe, in 10 von 46 (21,7%) Proben von Patienten mit einer Colitis ulcerosa und in 6 von 46 (14,3%) von Patienten mit einem Morbus Crohn *Atopobium vaginae* nachweisen. Bei jeder der Gruppen war der Median der semiquantitativen Auswertung demnach 0.

Die statistische Testung mit dem Mann-Whitney-U-Test ergab keine signifikanten Unterschiede, so ergab sich für das Colitis-ulcerosa-Kollektiv ein p-Wert von 0,267 und für das Morbus-Crohn-Kollektiv ein p-Wert von 0,850.

Allerdings waren ein *Gardnerella vaginalis* Biofilm in der Analyse mit dem χ^2 -Test hochsignifikant ($p < 0,001$) mit dem Nachweis von *Atopobium vaginae* verknüpft. Hierbei konnte in 21 der 44 (47,7%) der Proben mit einem *Gardnerella vaginalis* Biofilm *Atopobium vaginae* festgestellt werden, während nur in 1 von 93 (1,1%) Proben ohne Biofilm *Atopobium vaginae* nachweisbar war.

Eine Aufschlüsselung der semiquantitativen *Atopobium vaginae*-Konzentrationen der drei Patientengruppen findet sich in Abbildung 4.15.

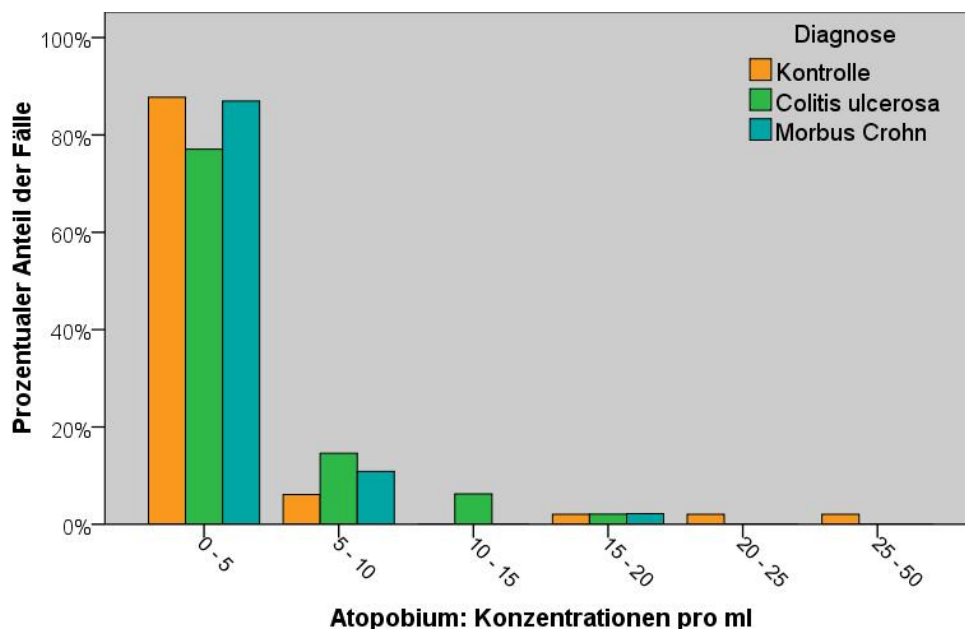


Abbildung 4.15: Semiquantitative *Atopobium vaginae*-Konzentrationen

Die bakteriellen Konzentrationen sind in der Abbildung mit einem Faktor von 10^5 skaliert. Die Gruppen entsprechen der in Tabelle 3.7 beschriebenen Einteilung

Lactobacillen

Die Gattung *Lactobacillus* sind meist in der vaginalen Flora enthalten und sind Hauptbestandteil der als physiologisch geltenden „Döderlein-Flora“.⁸¹

In dieser Studie war die Morphologie der *Lactobacillen* sehr divergent. Sie waren sowohl als kurze, als auch als lange Stäbchen nachweisbar und lagen sowohl adhärent, als auch diffus vor.

In den Proben des Kontrollkollektivs waren in 18 von 49 (36,7%, Median: 0) Proben *Lactobacillen*, bei der Colitis-ulcerosa-Gruppe in 24 von 46 (52,2%, Median: $< 5 \cdot 10^5$ pro ml) und in der Morbus-Crohn-Gruppe in 20 von 42 (47,6%, Median: 0) Proben feststellbar.

Die semiquantitativen Konzentrationen von *Lactobacillen* waren bei der Colitis-ulcerosa-Gruppe höher als bei der Kontrollgruppe (s.a. Abbildung 4.17), der Unterschied war jedoch nicht signifikant (p-Wert: 0,084). Bei der Morbus-Crohn-Gruppe waren die Unterschiede noch geringer, hier ergab sich ein p-Wert von 0,408.

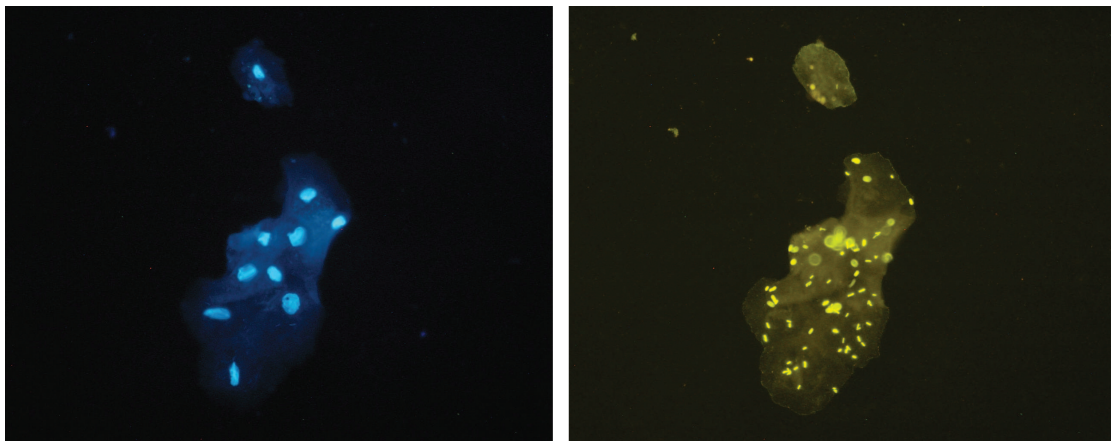


Abbildung 4.16: Im linken Bild ist die Gegenfärbung in DAPI zu sehen und im rechten Bild die *Lactobacillus*-Sonde in Cy3. Die adhärente Verteilung der Bakterien ist deutlich erkennbar.
Aufnahme bei 400-facher Vergrößerung.

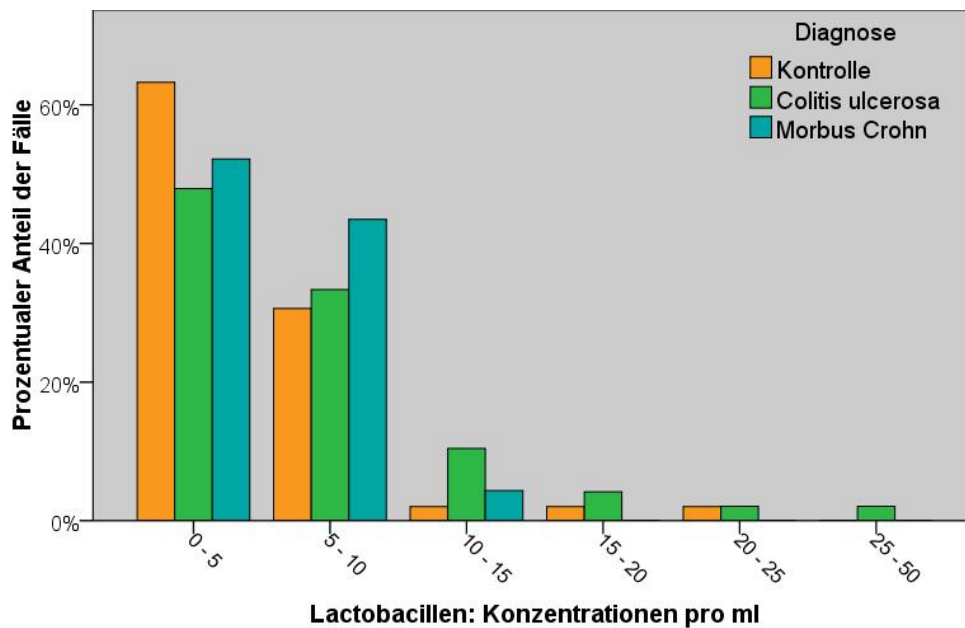


Abbildung 4.17: Semiquantitative Lactobacillen-Konzentrationen

Die bakteriellen Konzentrationen sind in der Abbildung mit einem Faktor von $x10^5$ skaliert. Die Gruppen entsprechen der in Tabelle 3.7 beschriebenen Einteilung

Streptococcus spp.

Die nachgewiesenen Streptokokken waren eher diffus in der Probe verteilt und bildeten nur selten Aggregate (s.a. Abbildung 4.18).

Insgesamt waren nur bei recht wenigen der untersuchten Proben Streptokokken nachweisbar. Die Proben der Kontrollgruppe enthielten in 7 von 49 (14,3 %) Fällen Streptokokken (Median: 0), die der Colitis-ulcerosa-Gruppe in 9 von 46 (19,6 %; Median: 0) und die der Morbus-Crohn-Gruppe in 4 von 42 Proben (9,5 %; Median: 0) Streptokokken.

In der statistischen Testung gegen das Kontrollkollektiv mit dem Mann-Whitney U-Test ergaben sich p-Werte von 0,533 für Colitis ulcerosa und 0,439 für Morbus Crohn.

Es konnte also keine signifikanter Unterschied der Streptokokkenkonzentration zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Graphik 4.19 zeigt schematisch wie oft die semiquantitativen Gruppen in den jeweiligen Proben vorgekommen sind.

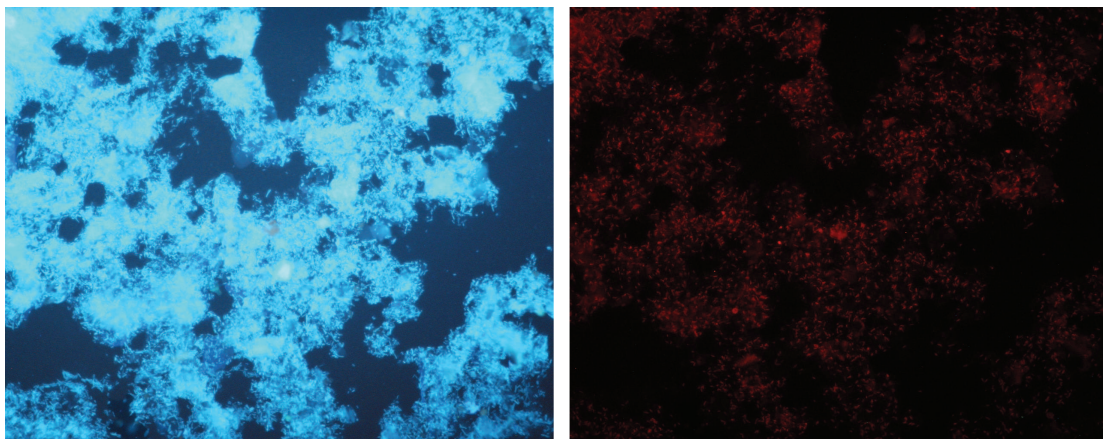


Abbildung 4.18: Im linken Bild ist die Gegenfärbung in DAPI zu sehen und im rechten Bild die Streptokokken-Sonde in Cy5. In DAPI ist deutlich ein dichter Bakterienrasen zu erkennen. Vergleicht man das linke mit dem rechten Bild, erkennt man, dass ein Teil des Bakterienrasens von Streptokokken gebildet wird. Insgesamt sind die Streptokokken eher diffus verteilt. Aufnahme bei 400-facher Vergrößerung.

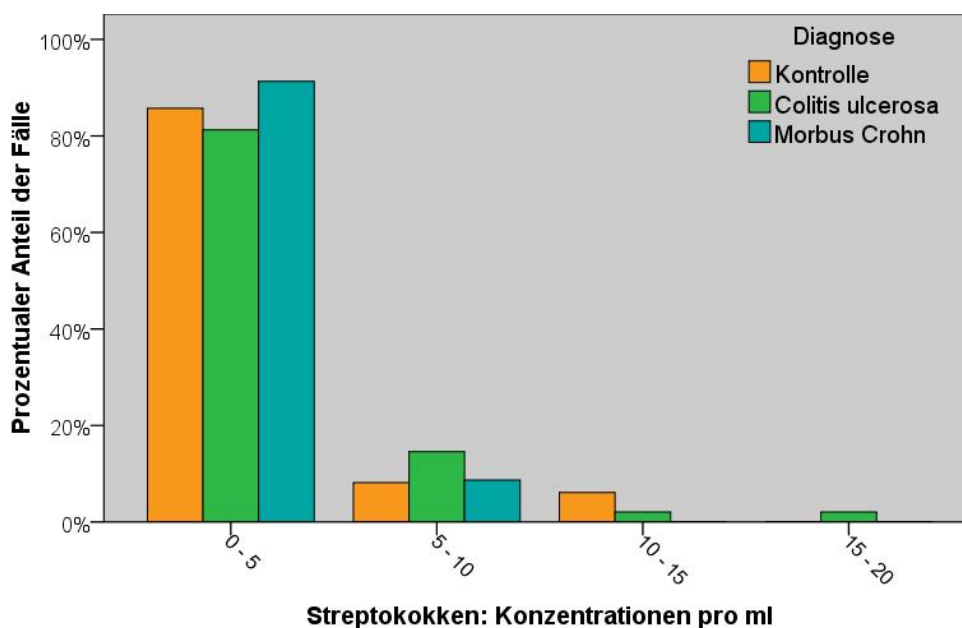


Abbildung 4.19: Semiquantitative Streptokokkenkonzentrationen
Die bakteriellen Konzentrationen sind in der Abbildung mit einem Faktor von $\times 10^5$ skaliert. Die Gruppen entsprechen der in Tabelle 3.7 beschriebenen Einteilung

Bacteroides

Bacteroides sind in der Regel in Gruppen angeordnet oder bilden Biofilme auf dem Epithel (s.a. Abbildung 4.20).

In den Präparaten der Kontrollproben war *Bacteroides* in 12 von 49 (24,5%) Fällen

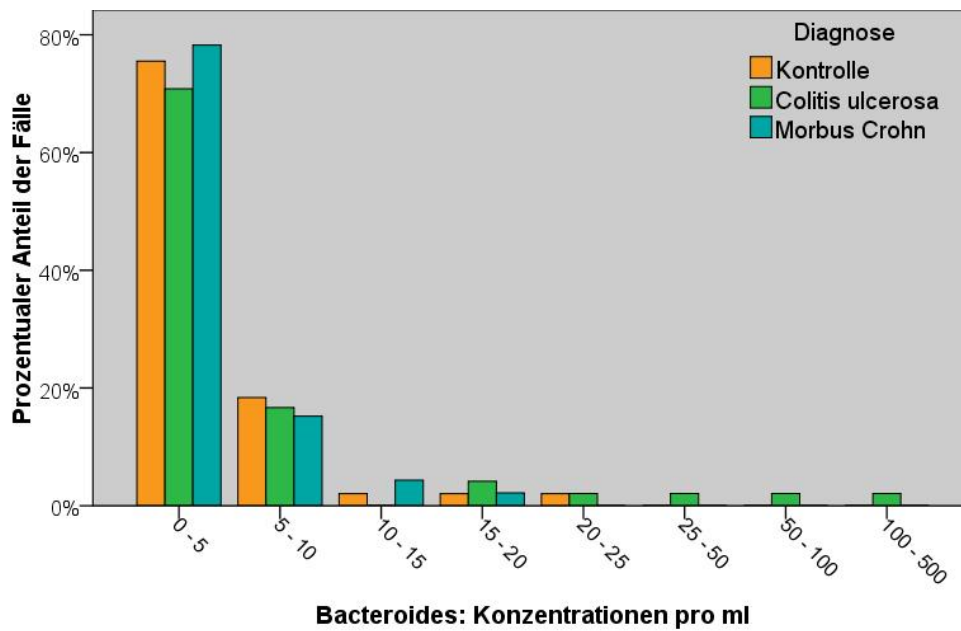


Abbildung 4.21: Semiquantitative Bacteroides-Konzentrationen

Die bakteriellen Konzentrationen sind in der Abbildung mit einem Faktor von $\times 10^5$ skaliert. Die Gruppen entsprechen der in Tabelle 3.7 beschriebenen Einteilung

enthalten, in denen der Colitis-ulcerosa-Patienten in 13 von 46 (28,3 %) und in denen der Morbus-Crohn-Patienten in 10 von 42 (23,8 %) Fällen. Es war kein signifikanter Unterschied der Konzentrationen feststellbar, so ergab sich für Colitis ulcerosa ein p-Wert von 0,582 und für Morbus Crohn ein p-Wert von 0,949.

Die semiquantitativen Konzentrationen sind auch in Abbildung 4.21 dargestellt.

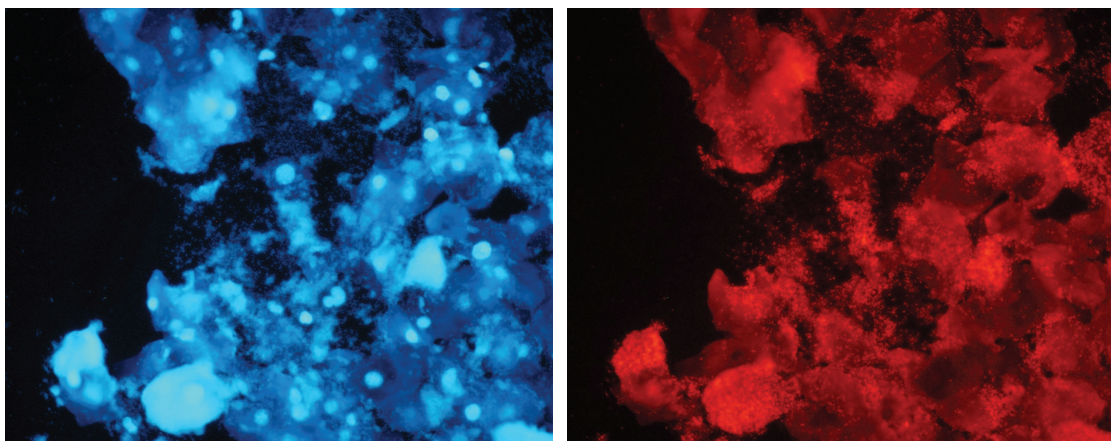


Abbildung 4.20: Bacteroides-Biofilm. Im linken Bild ist die Gegenfärbung in DAPI zu sehen und im rechten Bild die Bacteroides-Sonde in Cy5. Man kann einen dichten Biofilm erkennen, der von Bacteroides gebildet wird. Aufnahme bei 400-facher Vergrößerung.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Methodenkritik

5.1.1 Patientenauswahl

In der vorliegenden Studie erfolgte für die Kollektive aufgrund des zusätzlichen Aufwands und der Verfügbarkeit von Proben und Patienten kein Matching nach Geschlecht und Alter. Die drei Patientengruppen sind jedoch in der jetzigen Untersuchung ausreichend ähnlich was Altersstruktur und Geschlechtsverteilung angeht, um belastbare Ergebnisse in der Untersuchung von Zusammensetzung, räumlicher Verteilung und Konzentration der bakteriellen urogenitalen Flora zu erzielen.

In den nachfolgenden Untersuchungen sollte jedoch ein Matching erfolgen, um eine bessere Vergleichbarkeit der Kollektive und eine höhere Aussagekraft der Ergebnisse zu erreichen.

Wir haben uns außerdem entschlossen, nicht nur Frauen, sondern auch Männer in die Untersuchungen einzuschließen, um zusätzliche Proben zu gewinnen und um keine zusätzlichen Informationen auszuschließen. Die wichtigsten Auswertungen wurden allerdings auch geschlechtsgetrennt ausgeführt, um eine Verzerrung der Ergebnisse durch die Geschlechtsverteilung zu vermeiden.

Desweiteren haben wir uns in dieser Untersuchung für Patienten aus der Poliklinik und nicht für gesunde Probanden als Kontrollgruppe entschieden, um vergleichbarere Populationen im Bezug auf Multimedikation und chronische Erkrankungen zu gewinnen.

5.1.2 Verwendete Proben

Urinproben haben im Vergleich zu Biopsien aus dem Urogenitaltrakt sicherlich den Nachteil, dass nur einzelne Epithelzellen und nicht das Epithel als Ganzes beurteilt werden können.

Die Entnahme von Biopsien ist jedoch ein invasiver Eingriff und erfordert dennoch die Untersuchung einer Urinprobe, um eine bakterielle Besiedlung der harnableitenden Organe

zu beurteilen. Wir entschlossen uns deshalb zur alleinigen Untersuchung von Urinproben, zumal Swidsinski et al. nachweisen konnten, dass es möglich ist, die bakterielle Vaginose mithilfe von Urinproben zu diagnostizieren und zu überwachen.^{63,82}

Wie schon Swidsinski et al.^{63,82} zeigen konnten, so waren auch in der vorliegenden Studie in jeder der untersuchten Urinproben desquamierte Epithelzellen enthalten, sodass sowohl eine Aussage über die „urinary tract associated bacteria“ als auch über die mikrobielle Besiedlung des Genitaltrakts eine Aussage getroffen werden konnte.

Neuere Studien, wie beispielsweise die Untersuchungen von Dong und Nelson, konnten nachweisen, dass auch bei Männern die molekulargenetische Untersuchung des Erststrahlurins eine adäquate Methode ist, um die bakterielle Besiedlung der distalen Urethra zu beurteilen.⁸³ Außerdem konnte in von Nelson et al. gezeigt werden, dass auch bei Männern eine Veränderung der mikrobiellen Flora mit einer Überrepräsentation von Anaerobiern mit einer erhöhten Prävalenz für sexuell übertragbare Infektionen einhergeht.⁸⁴ Diese Ergebnisse kann man als analoges Ergebnis zu der gehäuften Prävalenz von sexuell übertragbaren Erkrankungen bei bakterieller Vaginose betrachten.

5.1.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung hat den Vorteil, dass sie sowohl eine Aussage über die Konzentration von Bakterien, als auch über ihre räumliche Verteilung liefern kann, was mit herkömmlichen Kultur- und PCR-Techniken nicht gelingt.

Gegenüber konventionellen Färbemethoden gelingt mittels FISH eine Bakterienidentifikation auf Speziesebene, wodurch eine deutlich exaktere Aussage über die vorhandenen Spezies und deren Verteilung möglich ist.

Trotz der großen Möglichkeiten der beschriebenen Methoden gab es in letzter Zeit einige Entwicklungen, die die Möglichkeiten von FISH noch deutlich erweitern könnten. Die verwendete Methodik, die Standard-rRNA-FISH, verlangte, dass vier verschiedene Objektträger verwendet werden, um acht verschiedene Bakteriengruppen zu analysieren. Diese Herangehensweise hatte den Nachteil, dass die verschiedenen Bakterienspezies nicht auf ihre räumliche Verteilung zueinander untersucht werden konnten. Um diese Untersuchung zu ermöglichen, könnte man in Folgestudien den Ansatz der „combined labeling and spectral imaging – fluorescence in situ hybridization“ (CLASI-FISH) anwenden. Hierbei werden bis zu 8 verschiedene Fluorochrome eingesetzt, wodurch allerdings der Einsatz eines konfokalen Lasermikroskops unerlässlich wird.⁸⁵

Durch CLASI-FISH würde dann die gleichzeitige Analyse von bis zu 28 verschiedenen Spezies ermöglicht. Auf diese Art und Weise könnte auch die Anzahl der untersuchten Bakterien deutlich erhöht werden.

Allerdings ist dieser Ansatz noch unzureichend validiert, sodass dieser erst in Zukunft eine Alternative zur jetzigen Methodik darstellt.

Die Standard-rRNA-FISH hat zudem den Nachteil, dass Bakterien nur markiert werden, wenn sie eine gewisse Anzahl an Ribosomen enthalten, also stoffwechselaktiv sind.

Um die Leuchtkraft und somit die Sensitivität der Sonden zu erhöhen, hätten auch doppelt gelabelte Sonden (DOPE-FISH) verwendet werden können. Diese sind sowohl am 3'-Ende, als auch am 5'-Ende mit einem Fluorochrom markiert, wodurch die zum Nachweis benötigte Ribosomenanzahl in Bakterien deutlich reduziert wird.⁸⁶

Diese Sonden waren zum Zeitpunkt der Studie leider noch nicht verfügbar bzw. für Urinproben noch nicht ausreichend getestet.

5.1.4 Mikroskopie

Um eine möglicherweise exaktere Konzentrationsschätzung zu erreichen, hätte ein konfokales Lasermikroskop zum Einsatz kommen können und eine anschließende computergestützte Auswertung.

In dieser Studie haben wir uns aufgrund der einfacheren Verfügbarkeit und der leichteren Identifizierung von Artefakten für die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie entschieden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Konzentrationen von Epithelzellen und Leukozyten

Die Konzentrationen von Epithelzellen und Leukozyten zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten-, bzw. Probandengruppen, allerdings war die Streuung in beiden CED-Gruppen deutlich größer (s.a. Graphik 4.1 und 4.2). Der fehlende Unterschied in den Leukozytenkonzentrationen wird auch von den Beobachtungen von Peyrin-Biroulet et al. gestützt, die keine erhöhte Prävalenz von Harnwegsinfekten bei hospitalisierten CED-Patienten feststellen konnten.⁸⁷

Weiterhin zeigten sich in der vorliegenden Untersuchung hochsignifikant mehr Epithelzellen im Urin der weiblichen Probandinnen als im Urin der männlichen Probanden, was sich durch die anatomischen Verhältnisse leicht erklären lässt, denn die Anatomie des weiblichen Urogenitaltrakts ergibt eine deutlich größere Fläche, auf der Epithelzellen abgespült werden können.

5.2.2 Gesamtbakterienkonzentration

Bei den Gesamtkonzentrationen aller Bakterien ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei den Epithelzellen. Hier zeigte sich, wie auch bei den Untersuchungen von Epithelzellen und Leukozyten, kein signifikanter Unterschied zwischen den drei untersuchten Kollektiven. Allerdings war auch hier die Konzentration bei Frauen deutlich höher als bei Männern.

Der fehlende Unterschied in den Konzentrationen aller Bakterien und insbesondere der fehlende Unterschied der *Enterobacteriaceae*-Konzentrationen deckt sich auch hier mit den Beobachtungen von Peyrin-Biroulet.⁸⁷

5.2.3 Semiquantitative Konzentrationen einzelner bakterieller Subgruppen

Entgegen der initialen Erwartung zeigte sich in der Untersuchung bei keiner der untersuchten bakteriellen Subgruppen (*Bifidobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* spp. und *Enterococcus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus* spp., *Bacteroidaceae* und *Prevotellaceae*, *Atopobium vaginae*) ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen der MC-Gruppe, der CU-Gruppe und der Kontrollgruppe.

Eine Überwucherung des Urogenitaltrakts mit intestinalen Erregern scheint damit unwahrscheinlicher, was umso erstaunlicher ist, als dass es massive Änderungen der intestinalen und fäkalen Flora bei CED Erkrankten gibt, wobei unter anderem *Bacteroides* in deutlich höheren Konzentrationen vertreten ist.^{10, 50, 51}

Das körpereigene Milieu des Urogenitaltraktes scheint trotz der höheren Belastung eine dauerhafte Besiedlung durch intestinale Bakterien wirksam verhindern zu können.

5.2.4 Nachweis von Pilzen

Es wurde in vorangegangenen Untersuchungen festgestellt, dass der Gastrointestinaltrakt von Patienten, die an einem Morbus Crohn erkrankt sind, signifikant häufiger mit *Candida albicans* besiedelt ist als bei Gesunden.⁸⁸ Trotz dieses Unterschieds in der Besiedlung des GIT konnte in der vorliegenden Studie kein signifikanter Unterschied der Besiedlung mit Pilzen in den Urinproben der einzelnen Patientenpopulationen gezeigt werden.

Das Vorliegen von Fisteln hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die mikroskopisch feststellbare Besiedlung mit Pilzen.

Die fehlende Häufung von nachweisbaren Pilzen zeigt, wie schon vorher beschrieben, dass anscheinend kein wesentlicher unmittelbarer Überwuchs ad continuum mit Erregern (Pilzen oder Bakterien) aus einem intestinalen Reservoir stattfindet, insbesondere, da bei nahezu 50 % der MC-Patienten *Candida* im Gastrointestinaltrakt nachweisbar ist⁸⁸ und bei keinem der hier untersuchten MC-Patienten mit Fisteln mikroskopisch Pilze im Urin festgestellt werden konnten.

5.2.5 Bakterielle Vaginose

Die Bakterielle Vaginose (BV) ist mit einer Prävalenz von bis zu 30 % die häufigste Form der Vaginitis.⁸⁹ Sie wurde im Jahr 1955 von Gardner und Dukes erstmals als Infektion mit einem Erreger, den sie „*Haemophilus vaginalis*“ nannten, beschrieben und von der

unspezifischen Vaginitis abgegrenzt.⁹⁰ Einige Jahre später wurde ebenfalls von Gardner gezeigt, dass die Krankheit durch sogenannte „Clue cells“, mikroskopisch sichtbare, dicht mit Bakterien bewachsene abgeschlifferte Epithelzellen, gekennzeichnet ist.

Im Jahr 1980 erfolgte dann von Greenwood und Picket die Einordnung von *Gardnerella* als eigene Gattung mit *Gardnerella vaginalis* als einzige Spezies, da mit *Haemophilus* keine genetische Ähnlichkeit gefunden werden konnte.⁹¹

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur eine Besiedlung mit *Gardnerella vaginalis* mit einer bakterieller Vaginose assoziiert ist, sondern auch ein Überwuchs durch andere Anaerobier, wie beispielsweise *Atopobium vaginae*, *Prevotella*, *Bacteroides* oder *Peptostreptococcus*, wobei *Gardnerella vaginalis* stets die prädominante Spezies ist.^{65,89}

Trotz vieler Publikationen und Studien zu dem Thema ist die Ätiologie der bakteriellen Vaginose bis heute nicht abschließend geklärt. Es scheint, dass die BV keine Infektionskrankheit ist, die durch einen einzelnen pathogenen Stamm ausgelöst wird, sondern dass es vielmehr einen Biofilm aus verschiedenen Bakterienspezies (s.a. Abbildung 5.1) benötigt, um eine symptomatische Erkrankung auszulösen.^{65,63}

Viele Autoren gehen davon aus, dass BV sexuell übertragbar ist.⁶³ Allerdings bleibt auch weiterhin die Frage, ob es sich um eine sexuell übertragbare Erkrankung im klassischen Sinn handelt, da eine Infektion nach der Übertragung von *Gardnerella vaginalis* in Reinkultur nicht stattfindet. Eine weitere Erklärung ist eine endogene Infektion durch intestinale Bakterien über eine ano-vaginale Schmierinfektion.⁹²

Trotz vieler Studien, die eine sexuelle Übertragung nahelegen, wird die Mitbehandlung des Partners der Patientin in Deutschland bislang nicht empfohlen.⁹³

Die Bakterielle Vaginose ist eine relativ symptomarme Erkrankung und klinisch lediglich durch vermehrten, übelriechenden Ausfluss gekennzeichnet. Schmerzen oder eine massive lokale Entzündungsreaktion gehören klassischerweise nicht zum Krankheitsbild.⁸⁹ Die allgemein anerkannten Kriterien zur Diagnose einer bakteriellen Vaginose beziehen sich entweder auf die klinisch orientierten Amselkriterien oder den sogenannten Nugentscore, der sich auf die Gramfärbung eines Vaginalabstrichs bezieht.^{94,95}

Swidsinski et al. konnten zeigen, dass sich die bakterielle Vaginose auch auf Grundlage von Vaginalbiopsien⁶⁵ und sogar von desquamierten Epithelzellen im Erststrahlurin betroffener Frauen (s.a. Abbildung 5.2) diagnostizieren und außerdem auch der Therapieerfolg überprüfen lässt.^{63,82} Weiterhin konnte hier gezeigt werden, dass ein *Gardnerella vaginalis* Biofilm obligat für eine bakterielle Vaginose ist, während diffus verteilte *Gardnerella vaginalis* auch bei gesunden Probandinnen nachweisbar waren.⁶³

Die eigentliche Bedeutung der bakteriellen Vaginose liegt darin, dass die betroffenen Patientinnen ein deutlich erhöhtes Risiko haben, an anderen sexuell übertragbaren Krankheiten zu erkranken.⁸⁹ Darüber hinaus haben Frauen mit nachgewiesener bakterieller Vaginose

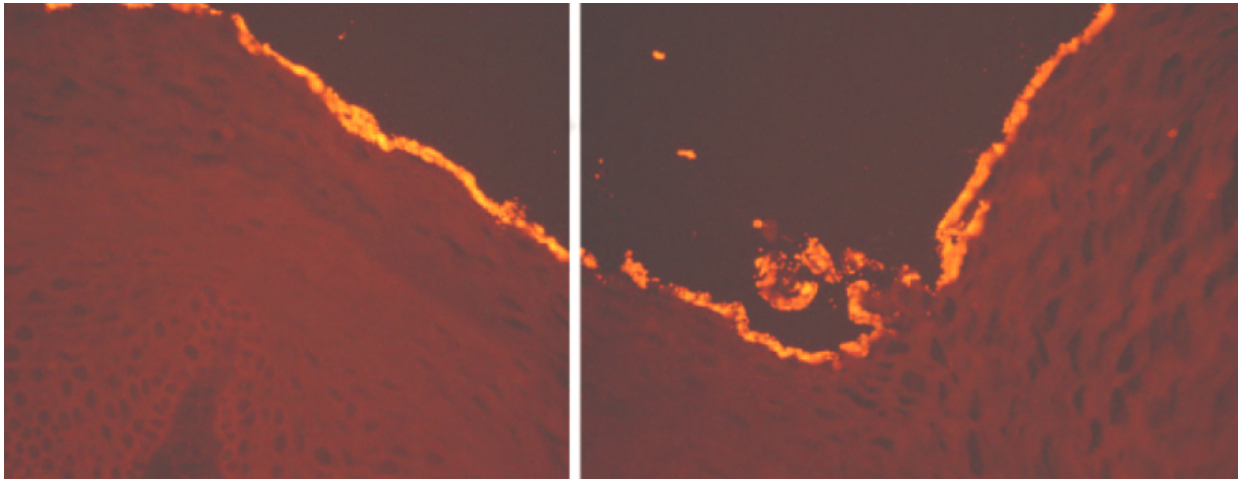


Abbildung 5.1: Adhärenter *Gardnerella vaginalis* Biofilm auf dem Epithel einer Vaginalbiopsie einer Patientin mit bakterieller Vaginose. Die Abbildung ist einer Publikation von Swidsinski et al. entnommen.⁶⁵ Man sieht zwei Sichtfelder bei 400-facher Vergrößerung. Man kann deutlich den dichtgepackten Biofilm erkennen der das Epithel teppichartig bedeckt.

während der Schwangerschaft ein etwa zweifach erhöhtes Risiko für eine Frühgeburt und ein bis zu neunfach erhöhtes Risiko eines Spontanaborts.⁹⁶

Die bakterielle Vaginose wird, insbesondere wenn sie im ersten Trimenon nachweisbar ist, als der größte Risikofaktor für Frühgeburtlichkeit angesehen, dennoch wird ein Screening und die folgende antibiotischen Sanierung der BV in der Schwangerschaft weiterhin kontrovers diskutiert. Die nationale BV-Leitlinie Deutschlands⁹³ kommt zu dem Ergebnis, dass ein Screening prinzipiell wünschenswert ist, während die Leitlinien Kanadas und der USA zu einem gegenteiligen Ergebnis kommen.^{97,98}

Der Diskussion liegt vor allem die fehlende oder nur geringgradige Besserung des Frühgeburtlichkeitsrisikos nach antibiotischer Sanierung zugrunde, die unter anderem auch in den hohen mikroskopisch nachweisbaren Rezidivraten begründet sein könnte.^{82,99}

5.2.6 *Gardnerella vaginalis* Biofilm und CED

Die vorliegende Untersuchung wurde nicht mit der Hypothese gestartet, eine spezifische Änderung von Konzentration und räumlicher Verteilung einer einzelnen bakteriellen Spezies zu finden, vielmehr wurde damit gerechnet, allgemeinere Unterschiede in der Konzentration mehrerer Spezies und der bakteriellen Gesamtkonzentration festzustellen.

Es konnte hier allerdings gezeigt werden, dass sich im Erststrahlurin von Patientinnen mit einem Morbus Crohn und Patientinnen mit einer Colitis ulcerosa signifikant häufiger desquamierte Epithelzellen, die mit einem dichten *Gardnerella vaginalis* Biofilm besiedelt waren, nachweisen ließen. Der hier festgestellte Biofilm war von seiner Struktur und Zusammensetzung identisch mit dem bei bakterieller Vaginose nachweisbaren Biofilm (s.a.

Abbildungen 4.9, 5.2). Es waren hier, wie auch bei der bakteriellen Vaginose,^{65,63} nicht nur *Gardnerella vaginalis* im Biofilm nachweisbar, sondern häufig auch andere Bakterien wie beispielsweise *Atopobium vaginae*, wobei *Gardnerella* stets die prädominante Spezies des Biofilms war.

Der Nachweis von *Atopobium vaginae* war hochsignifikant mit dem Vorliegen eines *Gardnerella* Biofilms assoziiert, was wiederum ebenfalls für das Vorliegen eines BV-typischen Biofilms spricht.

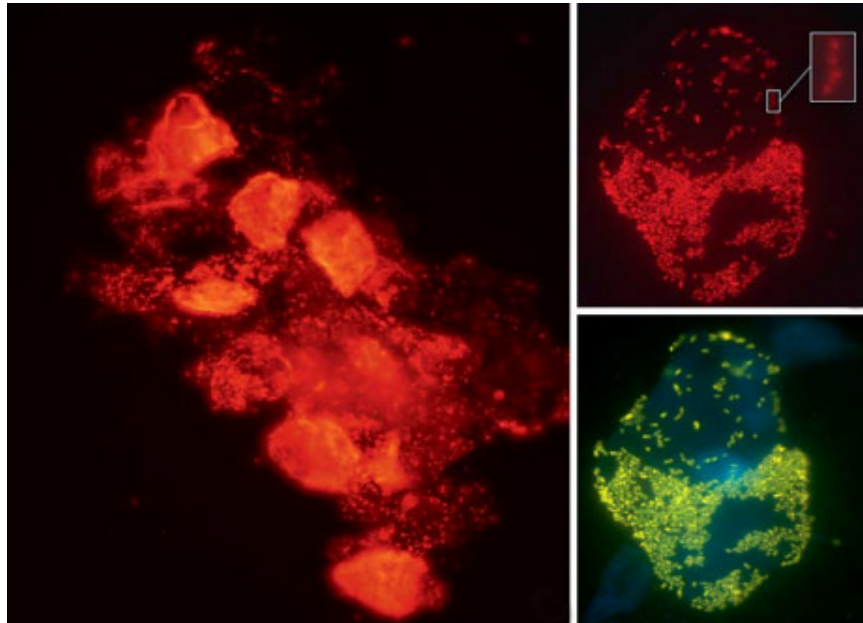


Abbildung 5.2: Adhärenter *Gardnerella vaginalis* Biofilm auf desquamierten Epithelzellen im Erststrahlurin einer Patientin mit bakterieller Vaginose.

Die Abbildung ist einer Publikation von Swidsinski et al. entnommen.⁶³ Man sieht desquamierte Epithelzellen, die dicht mit *Gardnerella vaginalis* (rote Fluoreszenz, Cy5) bewachsen sind. Die Ausschnittsvergrößerungen zeigen, dass sich *Gardnerella* sowohl mit der spezifischen Sonde (rote Fluoreszenz, Cy5), als auch mit der Bifidobacteriaceae-Sonde (gelbe/orange Fluoreszenz, Cy3) anfärben lassen.

Der Biofilm bei bakterieller Vaginose Patientinnen und der in der vorliegenden Studie festgestellte Biofilm (s.a. Abb. 4.9) sind in Zusammensetzung und Aufbau vergleichbar.

Linkes Bild mit 400-facher Vergrößerung, rechte Bilder mit 1000 facher Vergrößerung.

Bis zum Zeitpunkt dieser Untersuchung wurde keine Studie veröffentlicht, die einer möglichen Assoziation von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit einer vermehrten Besiedlung mit *Gardnerella vaginalis*, bzw. mit einer bakteriellen Vaginose nachging.

Eine Untersuchung von Weber et al. aus dem Jahr 1995 konnte allerdings bei 40 % der CED-Patientinnen einen symptomatischen vaginalen Ausfluss feststellen,¹⁰⁰ der das Leitsymptom der bakteriellen Vaginose ist.

Der gehäufte Nachweis eines für bakterielle Vaginose typischen *Gardnerella vaginalis* Biofilms bei CED-Patienten, sowie die schon zuvor beschriebene Häufung eines symptomatischen vaginalen Ausflusses bei CED-Patientinnen legen nahe, dass tatsächlich eine erhöhte Prävalenz an bakterieller Vaginose bei Frauen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vorliegt.

Die gegenwärtige Medikation der Patienten mit immunmodulatorischer oder -suppressiver Therapie war weder bei der CED-Gruppe, noch bei der Kontrollgruppe signifikant mit einer erhöhten Rate an *Gardnerella vaginalis* Biofilmen verbunden.

Interessanterweise ändert sich also die urogenitale Besiedlung mit *Gardnerella vaginalis* nicht signifikant durch die aktuelle Medikation der Patienten, obwohl eine Therapie mit Azathioprin in einer Studie von Swidsinski et al. mit einer signifikant erhöhten Häufigkeit an adhärenenten Bakterien am Darmwandepithel assoziiert war.¹⁰¹

Außerdem war auch eine gegenwärtig erhöhte Krankheitsaktivität nicht signifikant mit einem solchen Biofilm assoziiert.

Beide Ergebnisse zeigen, dass ein *Gardnerella vaginalis* Biofilm eine langfristige Änderung der urogenitalen mikrobiellen Flora bedeutet und nicht nur eine kurzfristige Alteration der bakteriellen Besiedlung aufgrund von Krankheitsaktivität oder gegenwärtiger Medikation.

Die Hypothese, dass es sich bei dem festgestellten Biofilm um einen Überwuchs von *Gardnerella vaginalis* und anderen *Bifidobacteriaceae* aus einem intestinalen Reservoir über eine ano-genitale Schmierinfektion handelt, wird teilweise durch eine Untersuchung von Swidsinski et al.⁷⁹ entkräftet. Die Autoren konnten hier zeigen, dass die bakteriellen *Bifidobacteriaceae*-Spezies von Anokutanabstrichen und Urinproben von Patientinnen mit bakterieller Vaginose signifikant unterschiedlich waren, insbesondere konnte in der Untersuchung der Anokutanabstriche *Gardnerella vaginalis* nicht nachgewiesen werden.⁷⁹

Obwohl diese Studie an Proben von Patientinnen mit nachgewiesener bakterieller Vaginose durchgeführt wurde, lassen die beschriebenen Ergebnisse einen einfachen bakteriellen Überwuchs aus einem intestinalen Reservoir auch bei Patientinnen mit CED zumindest unwahrscheinlicher erscheinen.

Fisteln

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der bakteriellen Besiedlung des Urogenitaltrakts zwischen MC-Patienten mit bzw. ohne bekannte enterogenitale oder enterovesikale Fisteln nachgewiesen werden.

Insbesondere der fehlende Unterschied in der Testung der Häufigkeit eines *Gardnerella vaginalis* Biofilms bei MC-Patienten mit Fisteln gegen die Gruppe der MC-Patienten ohne

Fisteln spricht ebenfalls gegen die These eines bakteriellen Überwuchses mit *Gardnerella vaginalis* ad continuum aus einem intestinalen Reservoir und deckt sich hier mit den Ergebnissen von Swidsinski et al.⁷⁹

Steroidabhängige oder steroidrefraktäre Verläufe

Steroidabhängige und steroidrefraktäre Verläufe waren in dieser Untersuchung signifikant mit einer erhöhten Häufigkeit von *Gardnerella vaginalis* Biofilmen assoziiert. Dieser Zusammenhang legt die Vermutung nahe, dass durch den dauerhaften Einfluss von Glucocorticoiden ein Milieu geschaffen wird, in dem das urogenitale Epithel anfälliger für eine Dysbiose und insbesondere anfälliger für die Entwicklung eines *Gardnerella vaginalis* Biofilms ist.

Während steroidabhängige und -refraktäre Verläufe mit einer erhöhten Häufigkeit eines Biofilms assoziiert waren, konnte das nicht für die aktuelle Medikation oder die aktuelle Krankheitsaktivität festgestellt werden. Dieser scheinbare Widerspruch könnte ein Indikator dafür sein, dass es sich bei den beobachteten Auffälligkeiten um Langzeitänderungen der bakteriellen Besiedlung handelt, die durch eine langfristige Glucocorticoid-Therapie begünstigt werden. Eine andere Erklärung für die erhöhte Prävalenz von *Gardnerella vaginalis* Biofilmen bei der Gruppe der CED-Patienten mit steroidabhängigen oder -refraktären Verläufen könnte allerdings auch die dauerhaft erhöhte entzündliche Aktivität der Erkrankung sein.

In dieser Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass nur die Häufigkeit eines *Gardnerella vaginalis* Biofilms bei CED-Patienten signifikant unterschiedlich im Vergleich mit der Kontrollgruppe war, während die anderen untersuchten Bakterienspezies bzw. -gruppen sich in ihrer Konzentration nicht signifikant unterschieden. Weiterhin wies auch die bakterielle Gesamtkonzentration keine signifikanten Unterschiede auf.

Der ausschließliche Unterschied in der Häufigkeit des beschriebenen Biofilms könnte auf eine spezifischen Lücke der epithelialen Immunfunktion des urogenitalen Epithels hinweisen, die entweder durch die Erkrankung selbst prädisponiert ist oder aber durch die immunsuppressive/-modulatorische Therapie verursacht wird.

Die Tatsache, dass steroidabhängige und -refraktäre Verläufe mit einer höheren Prävalenz an *Gardnerella vaginalis* Biofilmen assoziiert sind und damit wahrscheinlich auch mit einer höheren Prävalenz an bakterieller Vaginose, stellt einen weiteren Grund dar, langanhaltende Medikationen mit Glucocorticoiden wann immer möglich zu vermeiden.

Primär sklerosierende Cholangitis

Die Proben der Gruppe der Patienten, die an einer Colitis ulcerosa sowie einer primär sklerosierenden Cholangitis erkrankt sind, zeigten in der vorliegenden Untersuchung kein gehäuftes Auftreten eines *Gardnerella vaginalis* Biofilms im Vergleich zu den Proben von CU-Patienten, bei denen keine PSC nachgewiesen werden konnte.

Die leichte Erhöhung der relativen Häufigkeit eines Biofilms bei den Patienten mit PSC zeigte in der statistischen Untersuchung keinen signifikanten Unterschied, wobei ein möglicherweise tatsächlich vorliegender Unterschied der Prävalenz eines *Gardnerella vaginalis* Biofilms auch aufgrund der relativ geringen Fallzahlen der Untersuchung entging. Um einem möglichen Unterschied der Prävalenz weiter nachzugehen, müsste eine Studie mit einer deutlich größeren Fallzahl durchgeführt werden.

5.2.7 Alter und *Gardnerella vaginalis* Biofilme

Nur die MC-Gruppe zeigte eine signifikante Korrelation von einem jüngeren Patientenalter und dem Nachweis eines *Gardnerella vaginalis* Biofilms. Bei der CU-Gruppe war ein solcher Biofilm zwar auch häufiger bei jungen Patienten feststellbar, allerdings wurde hier keine signifikante Korrelation nachgewiesen, und bei der Kontrollgruppe zeigte sich kein Trend zu einer Häufung bei jungen Patienten.

Eine Erklärung für die Korrelation bei CED-Patienten kann im Augenblick noch nicht gegeben werden und erfordert weitere Studien, allerdings zeigt sich auch, dass im gebärfähigen Alter bei CED-Patientinnen häufiger eine Dysmenorrhoe auftritt¹⁰⁰ als bei gesunden Frauen.

5.2.8 CED und Frühgeburtlichkeit

Es ist schon seit längerem bekannt, dass Patientinnen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein etwa zweifach erhöhtes Frühgeburtlichkeitsrisiko^{102,103} und ein erhöhtes Risiko, ein Kind mit einem geringen Geburtsgewicht (<2500 g)¹⁰³ zu gebären, haben. Weiterhin ist auch eine väterliche Erkrankung mit einer CED mit einem erhöhten Risiko assoziiert, dass das Kind vor der 37. Schwangerschaftswoche geboren wird.¹⁰³

Die Ursache der höheren Frühgeburtsrate bei Frauen mit einer CED ist nicht abschließend geklärt, so wurde lange Zeit eine medikamentenassoziierte Ursache vermutet, allerdings konnten neuere Studien zeigen, dass weder eine Medikation mit Azathioprin,¹⁰⁴ noch 5-ASA-Präparate,¹⁰⁵ eine Therapie mit TNF- α -Antikörpern¹⁰⁶ oder eine Therapie mit oralen Glucocorticoiden¹⁰⁷ mit einem signifikant erhöhten Frühgeburtlichkeitsrisiko bei CED-Patienten verknüpft sind, sodass die Medikation als Ursache zunehmend unwahrscheinlicher erscheint.

Der in der vorliegenden Studie nachgewiesene Zusammenhang von einer CED und *Gardnerella vaginalis* Biofilmen zeigt einen wahrscheinlichen Zusammenhang zwischen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und einer bakteriellen Vaginose. Die Ursache dieses Zusammenhangs konnte hier nicht abschließend geklärt werden, jedoch gibt die Häufung des

Biofilms bei den steroidabhängigen bzw. -refraktären Verläufe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen einen Hinweis darauf, dass eine dauerhafte Glucocortikoidmedikation bei CED-Patienten ein Risikofaktor für eine Besiedlung mit adhärenen *Gardnerella vaginalis* ist.

Zieht man in Betracht, dass die bakterielle Vaginose einer der Hauptrisikofaktoren für Frühgeburtlichkeit ist, so erscheint die Häufung von *Gardnerella vaginalis* Biofilmen bei CED-Patientinnen als ein Teil der Erklärung für die Frühgeburtlichkeit bei Patientinnen mit CED. Weitere Studien müssen zeigen, ob sich die hier nachgewiesenen mikrobiologischen Änderungen auch in einer klinisch manifesten bakteriellen Vaginose zeigen. Gegebenenfalls müsste dann untersucht werden, ob die BV-Prävalenz bei schwangeren CED-Patientinnen erhöht ist und ob durch eine frühzeitige antibiotische Sanierung eine Senkung des Risikos einer Frühgeburt erreicht werden kann.

Literaturverzeichnis

- [1] Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: Cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627–1640; pmid: 17499605.
 - [2] De Dombal FT. Ulcerative colitis: Definition, historical background, aetiology, diagnosis, naturel history and local complications. *Postgrad Med J* 1968;44:684–692; pmid: 5705372.
 - [3] Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001; 7:175–184; pmid: 11819757.
 - [4] Worthington J, Chapman R. Primary sclerosing cholangitis. *Orphanet J Rare Dis* 2006;1(41):1–7; pmid: 17062136.
 - [5] Greenstein AJ, Janowitz HD, Sachar DB. The extra-intestinal complications of Crohn's disease and ulcerative colitis: A study of 700 patients. *Medicine (Baltimore)* 1976;55:401–412; pmid: 957999.
 - [6] Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: Pathological and clinical entity. *JAMA* 1932;99:1323–1329; pmid: keine vergeben; doi:10.1001/jama.1932.02740680019005.
 - [7] Lichtarowicz AM, Mayberry JF. Antoni Lesniowski and his contribution to regional enteritis (Crohn's disease). *J R Soc Med* 1988;81:468–470; pmid: 3047387.
 - [8] Bartnik W. Inflammatory bowel disease – Polish contribution. *J Physiol Pharmacol* 2003;54 Suppl 3:205–210; pmid: 15075474.
 - [9] Crohn BB. Granulomatous diseases of the small and large bowel. A historical survey. *Gastroenterology* 1967;52:767–772; pmid: 6024888.
 - [10] Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44–54; pmid: 11781279.
 - [11] Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: Is there a difference between north and south? Results of the
-

- European Collaborative Study on inflammatory bowel disease (EC-IBD). *Gut* 1996; 39:690–697; pmid: 9014768.
- [12] Timmer A, Goebell H. Incidence of ulcerative colitis, 1980-1995 – A prospective study in an urban population in Germany. *Z Gastroenterol* 1999;37:1079–1084; pmid: 10604221.
- [13] Timmer A, Breuer-Katschinski B, Goebell H. Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: A prospective analysis in an urban population in Germany. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:79–84; pmid: 10338375.
- [14] Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504–1517; pmid: 15168363.
- [15] Timmer A. How often and for how long are IBD patients expected to be sick, off work, or in hospital each year? *Inflamm Bowel Dis* 2008;14 Suppl 2:48–49; pmid: 18816673.
- [16] Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: Results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:968–976; pmid: 18253950.
- [17] Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29:990–996; pmid: 3396969.
- [18] Binder V. Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 1998;16:351–355; pmid: 10207221.
- [19] Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: Differences between Jews and non-Jews. *Gut* 1993;34:517–524; pmid: 8491401.
- [20] Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603–606; pmid: 11385577.
- [21] Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122:867–874; pmid: 11910337.
- [22] Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599–603; pmid: 11385576.
-

-
- [23] Adler J, Rangwala SC, Dwamena BA, Higgins P. The Prognostic Power of the NOD2 Genotype for Complicated Crohn's Disease: A Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* 2011;106:699–712; pmid: 21343918.
- [24] Franke A, McGovern DPB, Barrett JC, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 2010; 42:1118–1125; pmid: 21102463.
- [25] Anderson CA, Boucher G, Lees CW, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 2011;43:246–252; pmid: 21297633.
- [26] Van Assche G, Dignass A, Panes J, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2010;4:7–27; pmid: 21122488.
- [27] Hoffmann JC, Preiss JC, Autschbach F, et al. S3–Leitlinie Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn. *Z Gastroenterol* 2008;46:1094–1146; pmid: 18810679.
- [28] Stange EF, Travis SP, Vermeire S, et al. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2008;2:1–23; pmid: 21172194.
- [29] Hoffmann JC, Zeitz M, Bischoff SC, et al. Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa. Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen zusammen mit dem Kompetenznetzwerk chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Z Gastroenterol* 2004;42:979–983; pmid: 15455267.
- [30] Goh K, Xiao SD. Inflammatory bowel disease: A survey of the epidemiology in Asia. *J Dig Dis* 2009;10:1–6; pmid: 19236540.
- [31] Autschbach F, Eisold S, Hinz U, et al. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* 2005;54:944–949; pmid: 15951539.
- [32] Selby W, Pavli P, Crotty B, et al. Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology* 2007; 132:2313–2319; pmid: 17570206.
- [33] Rath HC, Schultz M, Freitag R, et al. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* 2001;69:2277–2285.
-

-
- [34] Thukral C, Travassos WJ, Peppercorn MA. The role of antibiotics in inflammatory bowel disease. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2005;8:223–228; pmid: 15913511.
- [35] Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: Clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007;369:1641–1657; pmid: 17499606.
- [36] Rothfuss KS, Stange EF, Herrlinger KR. Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006;12:4819–4831; pmid: 16937463.
- [37] Larsen S, Bendtzen K, Nielsen OH. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: Epidemiology, diagnosis, and management. *Ann Med* 2010;42:97–114; pmid: 20166813.
- [38] Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976; 70:439–444; pmid: 1248701.
- [39] Rodríguez-Reyna TS, Martínez-Reyes C, Yamamoto-Furusho JK. Rheumatic manifestations of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2009;15:5517–5524; pmid: 19938189.
- [40] Vavricka SR, Brun L, Ballabeni P, et al. Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort. *Am J Gastroenterol* 2011;106:110–119; pmid: 20808297.
- [41] Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: A meta-analysis. *Gut* 2001;48:526–535; pmid: 11247898.
- [42] Travis SPL, Stange EF, Lémann M, et al. European evidence-based Consensus on the management of ulcerative colitis: Current management. *J Crohns Colitis* 2008; 2:24–62; pmid: 21172195.
- [43] Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis* 2010;4:28–62; pmid: 21122489.
- [44] Schirbel A, Reichert A, Roll S, et al. Impact of pain on health-related quality of life in patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2010;16:3168–3177; pmid: 20593502.
- [45] Narula N, Fedorak RN. Exercise and inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol* 2008;22:497–504; pmid: 18478136.
-

-
- [46] Rajendran N, Kumar D. Role of diet in the management of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2010;16:1442–1448; pmid: 20333783.
- [47] Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2009;136:1182–1197; pmid: 19249397.
- [48] Suau A, Bonnet R, Sutren M, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:4799–4807; pmid: 10543789.
- [49] Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, et al. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium spp.* with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:3069–3075; pmid: 7487040.
- [50] Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005;43:3380–3389; pmid: 16000463.
- [51] Swidsinski A, Loening-Baucke V, Herber A. Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 6:61–71; pmid: 20224153.
- [52] Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, et al. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:106–111; pmid: 16432374.
- [53] Swidsinski A, Loening-Baucke V, Vanechoutte M, Doerffel Y. Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:147–161; pmid: 18050295.
- [54] Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16731–16736; pmid: 18936492.
- [55] Sokol H, Seksik P, Furet JP, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1183–1189; pmid: 19235886.
- [56] Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006;55:205–211; pmid: 16188921.
- [57] Laukoetter MG, Nava P, Nusrat A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:401–407; pmid: 18200662.
-

-
- [58] Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meuwissen SG. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: Current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2001;234:29–40; pmid: 11768558.
- [59] Williams HRT, Cox IJ, Walker DG, et al. Characterization of inflammatory bowel disease with urinary metabolic profiling. *Am J Gastroenterol* 2009;104:1435–1444, pmid: 19491857.
- [60] World Medical Association inc. Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. *J Indian Med Assoc* 2009;107:403–405; pmid: 19886379.
- [61] Lichtiger S, Present DH, Kornbluth A, et al. Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N Engl J Med* 1994;330:1841–1845; pmid: 8196726.
- [62] Diem K, Lentner C. *Dokumenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen*. Georg Thieme Verlag, 1978.
- [63] Swidsinski A, Doerffel Y, Loening-Baucke V, et al. *Gardnerella* biofilm involves females and males and is transmitted sexually. *Gynecol Obstet Invest* 2010;70:256–263; pmid: 21051845.
- [64] Loy A, Maixner F, Wagner M, Horn M. probeBase – An online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: New features 2007. *Nucleic Acids Res* 2007;35:800–804; pmid: 17099228.
- [65] Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, et al. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 2005;106:1013–1023; pmid: 16260520.
- [66] Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, et al. Desquamated epithelial cells covered with a polymicrobial biofilm typical for bacterial vaginosis are present in randomly selected cryopreserved donor semen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010;59:399–404; pmid: 20497224.
- [67] Wagenlehner FME, Schmiemann G, Hoyme U, et al. National S3 guideline on uncomplicated urinary tract infection: recommendations for treatment and management of uncomplicated community-acquired bacterial urinary tract infections in adult patients. *Urologe A* 2011;50:153–169; pmid: 21312083.
- [68] McNamara G, Gupta A, Reynaert J, Coates TD, Boswell C. Spectral imaging microscopy web sites and data. *Cytometry A* 2006;69:863–871; pmid: 16969821.
-

-
- [69] 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;56:1919–1925; pmid: 2200342.
- [70] Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Grijpstra J, Knol J, Degener JE, Welling GW. Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:4523–4527; pmid: 11010909.
- [71] Bohnert J, Hübner B, Botzenhart K. Rapid identification of Enterobacteriaceae using a novel 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Int J Hyg Environ Health* 2000; 203:77–82; pmid: 10956593.
- [72] Harmsen HJM, Elfferich P, Schut F, Welling GW. A 16S rRNA-targeted probe for detection of *lactobacilli* and *enterococci* in faecal samples by fluorescence in situ hybridization. *Microb Ecol Health Dis* 1999;1:3–12; pmid: keine vergeben; doi:10.1080/089106099435862.
- [73] 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;142:1097–1106; pmid: 8704951.
- [74] Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3336–3345; pmid: 9726880.
- [75] Kapuscinski J. DAPI: A DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 1995; 70:220–233; pmid: 8580206.
- [76] Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: Minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 1992;31:3103–3112; pmid: 1372825.
- [77] Spring K, Davidson M. Introduction to fluorescence microscopy. Nikon Microscopy, <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>, retrieved 2014-03-01.
- [78] Swidsinski A. Standards for bacterial identification by fluorescence In situ hybridization within eukaryotic tissue using ribosomal rRNA-based probes. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:824–826; author reply 826–7; pmid: 16917237.
-

-
- [79] Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, et al. Dissimilarity in the occurrence of *Bifidobacteriaceae* in vaginal and perianal microbiota in women with bacterial vaginosis. *Anaerobe* 2010;16:478–482; pmid: 20620215.
- [80] Wagner M, Horn M, Daims H. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* 2003;6:302–309; pmid: 12831908.
- [81] Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, et al. The vaginal microbiome: New information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG* 2011;118:533–549; pmid: 21251190.
- [82] Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, Schilling J, Mendling W. Response of *Gardnerella vaginalis* biofilm to 5 days of moxifloxacin treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011;61:41–46; pmid: 20955467.
- [83] Dong Q, Nelson DE, Toh E, et al. The microbial communities in male first catch urine are highly similar to those in paired urethral swab specimens. *PLoS One* 2011; 6(e19709):1–5; pmid: 21603636.
- [84] Nelson DE, Dong Q, Van der Pol B, et al. Bacterial communities of the coronal sulcus and distal urethra of adolescent males. *PLoS One* 2012;7(e36298):1–9; pmid: 22606251.
- [85] Valm AM, Welch JLM, Rieken CW, et al. Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:4152–4157; pmid: 21325608.
- [86] Stoecker K, Dorninger C, Daims H, Wagner M. Double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:922–926; pmid: 19966029.
- [87] Peyrin-Biroulet L, Pillot C, Oussalah A, et al. Urinary tract infections in hospitalized inflammatory bowel disease patients: A 10-year experience. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18:697–702; pmid: 21739531.
- [88] Standaert-Vitse A, Sendid B, Joossens M, et al. *Candida albicans* colonization and ASCA in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2009;104:1745–1753; pmid: 19471251.
- [89] Sobel JD. Bacterial vaginosis. *Annu Rev Med* 2000;51:349–356; pmid: 10774469.
-

-
- [90] Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. Am J Obstet Gynecol 1955; 69:962–976; pmid: 14361525.
- [91] Greenwood JR, Pickett MJ. Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a New Genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) comb. nov. . IJSEM 1980;30:170–178; pmid: keine vergeben; doi: 10.1099/00207713-30-1-170.
- [92] Holst E. Reservoir of four organisms associated with bacterial vaginosis suggests lack of sexual transmission. J Clin Microbiol 1990;28:2035–2039; pmid: 2229386.
- [93] Martius J, Hoyme U, Mendling W. Vaginose in Gynäkologie und Geburtshilfe. AWMF-Leitlinie 2013;Nr. 015–028.
- [94] Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. Am J Med 1983;74:14–22; pmid: 6600371.
- [95] Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. J Clin Microbiol 1991;29:297–301; pmid: 1706728.
- [96] Leitich H, Bodner-Adler B, Brunbauer M, Kaider A, Egarter C, Husslein P. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: A meta-analysis. Am J Obstet Gynecol 2003;189:139–147; pmid: 12861153.
- [97] Yudin MH, Money DM, Infectious Diseases Committee. Screening and management of bacterial vaginosis in pregnancy. J Obstet Gynaecol Can 2008;30:702–716; pmid: 18786293.
- [98] US Preventive Services Task Force. Screening for bacterial vaginosis in pregnancy to prevent preterm delivery: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. Ann Intern Med 2008;148:214–219; pmid: 18252683.
- [99] Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, et al. An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists after standard therapy with oral metronidazole. Am J Obstet Gynecol 2008;198:1.e1–1.e6; pmid: 18005928.
- [100] Weber AM, Ziegler C, Belison JL, Mitchinson AR, Widrich T, Fazio V. Gynecologic history of women with inflammatory bowel disease. Obstet Gynecol 1995;86(5):843–847; pmid: 7566861.
- [101] Swidsinski A, Loening-Baucke V, Bengtmark S, Lochs H, Dörffel Y. Azathioprine and mesalazine-induced effects on the mucosal flora in patients with IBD colitis. Inflamm Bowel Dis 2007;13:51–56; pmid: 17206639.
-

-
- [102] Elbaz G, Fich A, Levy A, Holcberg G, Sheiner E. Inflammatory bowel disease and preterm delivery. *Int J Gynaecol Obstet* 2005;90:193–197; pmid: 16043179.
- [103] Bengtson MB, Solberg IC, Aamodt G, et al. Relationships between inflammatory bowel disease and perinatal factors: Both maternal and paternal disease are related to preterm birth of offspring. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:847–855; pmid: 19795509.
- [104] Shim L, Eslick GD, Simring AA, Murray H, Weltman MD. The effects of azathioprine on birth outcomes in women with inflammatory bowel disease (IBD). *J Crohns Colitis* 2011;5:234–238; pmid: 21575887.
- [105] Rahimi R, Nikfar S, Rezaie A, Abdollahi M. Pregnancy outcome in women with inflammatory bowel disease following exposure to 5-aminosalicylic acid drugs: A meta-analysis. *Reprod Toxicol* 2008;25:271–275; pmid: 18242053.
- [106] Schnitzler F, Fidder H, Ferrante M, et al. Outcome of pregnancy in women with inflammatory bowel disease treated with antitumor necrosis factor therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:1846–1854; pmid: 21213289.
- [107] Molnár T, Farkas K, Nagy F, et al. Pregnancy outcome in patients with inflammatory bowel disease according to the activity of the disease and the medical treatment: A case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2010;45:1302–1306; pmid: 20602569.
-

Anhang

Table 7.1: Oligonukleotidsonden mit Sequenz

Sonde	Ziel	Sequenz	Fluorochrom
Eub338	Alle Bakterien, Kingdom eubacteria	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	FITC
Bif164	<i>Bifidobacteriae</i>	CAT CCG GCA TTA CCA CCC	Cy3
Ebac	<i>Enterobacteriaceae</i>	CGT GTT TGC ACA GTG CTG	Cy3
Lab158	<i>Lactobacillus</i> und <i>Enterococcus</i>	GGT ATT AGC A(C/T)C TGT TTC CA	Cy3
GardV	<i>Gardnerella vaginalis</i>	CCA CCG TTA CAC CGC GAA	Cy5
Strc493	<i>Streptococcus</i> spp.	GTT AGC CGT CCC TTT CTG	Cy5
Bac303	<i>Bacteroidaceae</i> und <i>Prevotellaceae</i>	CCA ATG TGG GGG ACC TT	Cy5
Ato291	<i>Atopobium vaginae</i>	GGT CGG TCT CTC AAC CC	Cy5
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Gegenfärbung; DNA- und RNA-haltigen Strukturen		

*Tabelle 7.2: Standardgewicht von Erwachsenen***Standardgewicht von Erwachsenen in Kilogramm⁶²**

Größe in cm	Frauen							
	15-16 Jahre	17-19 Jahre	20-24 Jahre	25-29 Jahre	30-39 Jahre	40-49 Jahre	50-59 Jahre	>60 Jahre
148	44,4	45,3	46,6	48,9	52,4	55,6	56,9	57,8
149	44,9	45,8	47,2	49,4	52,8	55,9	57,3	58,2
150	45,4	46,3	47,7	50,0	53,1	56,3	57,7	58,6
151	46,0	46,9	48,2	50,5	53,7	56,9	58,2	58,9
152	46,5	47,4	48,8	51,0	54,2	57,4	58,8	59,3
153	47,1	48,1	49,4	51,6	54,8	57,9	59,3	59,8
154	47,9	48,8	50,1	52,1	55,3	58,5	59,8	60,3
155	48,6	49,5	50,8	52,6	55,8	59,0	60,4	60,8
156	49,3	50,2	51,3	53,2	56,3	59,5	60,9	61,3
157	50,0	50,9	51,9	53,7	56,9	60,0	61,4	61,9
158	50,6	51,5	52,4	54,3	57,4	60,6	62,1	62,5
159	51,1	52,1	53,0	54,8	58,0	61,1	62,8	63,2
160	51,7	52,6	53,5	55,3	58,5	61,7	63,5	63,9
161	52,2	53,3	54,0	55,9	59,0	62,4	64,2	64,7
162	52,8	54,0	54,6	56,5	59,6	63,1	64,9	65,4
163	53,4	54,8	55,2	57,0	60,1	63,8	65,7	66,1
164	54,1	55,5	55,9	57,7	60,7	64,3	66,4	66,8
165	54,8	56,2	56,6	58,5	61,2	64,8	67,1	67,5
166	55,5	56,7	57,3	59,2	61,9	65,5	67,8	68,2
167	56,2	57,3	58,1	59,9	62,6	66,2	68,5	68,9
168	56,9	57,8	58,7	60,5	63,2	66,9	69,2	69,7
169	57,4	58,3	59,2	61,1	63,8	67,6	69,9	70,4
170	58,0	58,9	59,8	61,6	64,3	68,4	70,6	71,1
171	58,6	59,6	60,5	62,3	65,0	69,1	71,3	71,8
172	59,4	60,3	61,2	63,0	65,7	69,8	72,1	72,5
173	60,1	61,0	61,9	63,7	66,4	70,5	72,8	73,2
174	60,8	61,7	62,6	64,4	67,1	71,2	73,5	73,9
175	61,5	62,4	63,3	65,1	67,9	71,9	74,2	74,7
176	62,2	63,1	64,0	65,8	68,6	72,8	75,1	75,4
177	62,9	63,8	64,7	66,6	69,3	73,7	75,9	76,1
178	63,6	64,6	65,5	67,3	70,0	74,6	76,8	76,8
179		65,5	66,4	68,2	70,9	75,5	77,7	
180		66,4	67,3	69,1	71,8	76,4	78,6	
181		67,3	68,2	70,0	72,7	77,2	79,6	
182		68,2	69,1	70,9	73,6	78,1	80,7	
183		69,1	70,0	71,8	74,5	79,0	81,8	
184		70,0	70,9	72,7	75,4	79,9	82,9	
185		70,9	71,8	73,6	76,3	80,8	83,9	

Männer

Größe in cm	15-16 Jahre	17-19 Jahre	20-24 Jahre	25-29 Jahre	30-39 Jahre	40-49 Jahre	50-59 Jahre	>60 Jahre
153	44,9	51,7	55,7	58,4	59,7	61,1	62,0	60,7
154	45,6	52,1	56,2	58,9	60,3	61,6	62,5	61,2
155	46,3	52,6	56,7	59,5	60,8	62,2	63,1	61,7
156	47,2	53,2	57,2	60,0	61,3	62,7	63,6	62,2
157	48,1	53,7	57,8	60,5	61,9	63,2	64,1	62,8
158	49,0	54,3	58,4	61,2	62,5	63,9	64,7	63,3
159	49,9	55,1	59,1	61,9	63,2	64,6	65,2	63,9
160	50,8	55,8	59,9	62,6	63,9	65,3	65,8	64,4
161	51,7	56,5	60,6	63,1	64,7	66,0	66,5	65,1
162	52,6	57,2	61,3	63,7	65,4	66,7	67,2	65,8
163	53,5	58,0	61,9	64,2	66,1	67,5	67,9	66,6
164	54,4	58,7	62,5	64,8	66,8	68,2	68,6	67,3
165	55,3	59,4	63,0	65,3	67,5	68,9	69,4	68,0
166	56,1	60,1	63,5	66,0	68,2	69,6	70,0	68,7
167	57,0	60,8	64,1	66,7	68,9	70,3	70,8	69,4
168	57,9	61,6	64,6	67,3	69,7	71,1	71,5	70,2
169	58,8	62,2	65,1	67,9	70,4	72,0	72,4	71,1
170	59,7	62,9	65,7	68,4	71,1	72,9	73,3	72,0
171	60,6	63,6	66,4	69,1	71,8	73,6	74,1	72,7
172	61,5	64,3	67,1	69,8	72,5	74,3	74,8	73,4
173	62,4	65,1	67,8	70,5	73,2	75,0	75,5	74,2
174	63,3	65,8	68,5	71,2	73,9	75,8	76,2	75,1
175	64,2	66,5	69,2	71,9	74,7	76,5	76,9	76,0
176	64,9	67,2	69,9	72,6	75,5	77,3	77,8	76,9
177	65,7	67,9	70,6	73,4	76,4	78,2	78,7	77,8
178	66,4	68,6	71,4	74,1	77,3	79,1	79,6	78,7
179	67,1	69,3	72,1	74,8	78,0	79,8	80,5	79,5
180	67,8	70,1	72,8	75,5	78,7	80,5	81,3	80,4
181	68,5	70,9	73,6	76,3	79,5	81,3	82,2	81,3
182	69,2	71,8	74,5	77,2	80,4	82,2	83,1	82,2
183	70,0	72,7	75,4	78,1	81,3	83,1	84,0	83,1
184	70,9	73,4	76,1	79,0	82,0	83,8	84,7	84,0
185	71,7	74,1	76,8	79,9	82,7	84,5	85,4	84,9
186	72,6	74,8	77,5	80,8	83,5	85,3	86,2	85,8
187	73,5	75,5	78,2	81,7	84,4	86,2	87,1	86,7
188	74,4	76,2	79,0	82,6	85,3	87,1	88,0	87,6
189	75,3	76,9	79,7	83,3	86,2	88,0	88,9	88,5
190	76,2	77,7	80,4	84,0	87,1	88,9	89,8	89,4
191	77,1	78,4	81,0	84,7	88,1	89,9	90,8	90,3
192	78,0	79,1	81,5	85,4	89,2	91,0	91,9	91,4
193		79,8	82,1	86,2	90,2	92,0	92,9	92,5
194		80,5	82,6	86,9	91,3	93,1	94,0	93,6
195		81,2	83,2	87,6	92,4	94,2	95,1	94,6

Danksagung

Frau Professor Yvonne Dörffel möchte ich an erster Stelle für die Überlassung des Themas der vorgelegten Dissertation danken. Ohne Ihre fortwährende Unterstützung wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. In jeder Phase dieser Arbeit war Frau Professor Dörffel eine professionelle, verständnisvolle und warmherzige Mentorin. Die stets konstruktiven Diskussionen über das Thema und darüber hinaus waren für mich eine große persönliche Bereicherung. Vielen Dank!

Mein weiterer Dank gilt Herrn Doktor Alexander Swidsinski für die Möglichkeit in seinem Labor die experimentellen Untersuchungen durchzuführen und in seinem Labor zu arbeiten und zu lernen. Außerdem möchte ich ihm für intensive, teils uferlose fachliche und philosophische Diskussionen danken.

Weiterhin möchte ich Frau Gabriele May und Frau Petra Schlien für die Hilfe bei den Hybridisierungen und der Verarbeitung der Proben danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern für den dauerhaften Zuspruch und das mir gewährte Vertrauen bedanken. Ohne ihre finanzielle und emotionale Unterstützung wären weder mein Studium noch die Durchführung dieser Dissertation möglich gewesen.

Curriculum vitae

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

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

Eigene Publikationen

- [1] Alexander Swidsinski, Yvonne Dörffel, Vera Loening-Baucke, Werner Mendling, Hans Verstraelen, Stefan Dieterle, and **Johannes Schilling**. Desquamated epithelial cells covered with a polymicrobial biofilm typical for bacterial vaginosis are present in randomly selected cryopreserved donor semen. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 59(3):399–404, Aug 2010, pmid: 20497224.
 - [2] Alexander Swidsinski, Yvonne Doerffel, Vera Loening-Baucke, Sonja Swidsinski, Hans Verstraelen, Mario Vaneechoutte, Vesna Lemm, **Johannes Schilling**, and Werner Mendling. Gardnerella biofilm involves females and males and is transmitted sexually. *Gynecol Obstet Invest*, 70(4):256–263, Nov 2010, pmid: 21051845.
 - [3] Alexander Swidsinski, Yvonne Doerffel, Vera Loening-Baucke, Werner Mendling, **Johannes Schilling**, Jennifer L Patterson, and Hans Verstraelen. Dissimilarity in the occurrence of Bifidobacteriaceae in vaginal and perianal microbiota in women with bacterial vaginosis. *Anaerobe*, 16(5):478–482, Oct 2010, pmid: 20620215.
 - [4] Alexander Swidsinski, Yvonne Dörffel, Vera Loening-Baucke, Franz Theissig, Jens C Rückert, Mahmoud Ismail, Walter A Rau, Dagmar Gaschler, Michael Weizenegger, Sigmar Kühn, **Johannes Schilling**, and Wolf V Dörffel. Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut*, 60(1):34–40, Jan 2011, pmid: 19926616.
 - [5] Alexander Swidsinski, Yvonne Dörffel, Vera Loening-Baucke, **Johannes Schilling**, and Werner Mendling. Response of Gardnerella vaginalis biofilm to 5 days of moxifloxacin treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 61(1):41–46, Feb 2011, pmid: 20955467.
 - [6] **Johannes Schilling**, Vera Loening-Baucke, and Yvonne Dörffel. Increased Gardnerella vaginalis urogenital biofilm in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*, ahead of print, Dec 2013, pmid: 24315776.
 - [7] Alexander Swidsinski, Vera Loening-Baucke, Werner Mendling, Yvonne Dörffel, **Johannes Schilling**, Zaher Halwani, Xue-Feng Jiang, Hans Verstraelen, and Sonja Swidsinski. Infection through Structured Polymicrobial Gardnerella biofilms (StPM-GB). *Histol Histopathol*, ahead of print, Dec 2013, pmid: 24327088.
-

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Johannes Schilling, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Veränderungen der urogenitalen Mikroflora bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen“ 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 der Betreuerin, 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 erfolgten Publikationen

Johannes Schilling hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Johannes Schilling, Vera Loening-Baucke and Yvonne Dörffel, Increased Gardnerella vaginalis urogenital biofilm in inflammatory bowel disease, J Crohns Colitis, 2013.

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen): Planung der Studie, Auswertung der Proben, statistische Auswertung der Daten, maßgebliche Erstellung des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin:

Berlin, den

Prof. Dr. Yvonne Dörffel
