

Aus der Klinik und Poliklinik
für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

**Untersuchung zur lokalen Interleukinkonzentration bei Patientinnen
mit Bakterieller Dysbiose**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stefanie Kellerer
aus Bad Kissingen

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Ernst Rainer Weissenbacher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2012

Inhalt

Inhalt	III
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung.....	1
1.1. Vaginalflora	1
1.2. Immunsystem.....	5
1.3. Problemstellung	11
2. Material und Methoden.....	12
2.1. Patientinnen	12
2.2. Vaginalabstriche und -spülung.....	13
2.3. pH-Wert.....	13
2.4. Reinheitsgrad.....	14
2.5. Zytokinbestimmung.....	15
2.6. Statistische Auswertung.....	16
3. Ergebnisse	17
3.1. Diagnostische Marker.....	17
3.1.1. Reinheitsgrade.....	17
3.1.2. pH-Werte	18
3.1.3. Interleukine	19
4. Diskussion.....	22
5. Zusammenfassung.....	32
6. Literaturverzeichnis.....	34
7. Anhang	39
7.1. Patientenrohdaten	39
8. Danksagung	43

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigkeit über Reinheitsgrade.....	17
Abbildung 2: Median Interleukin 4 der Patienten und Kontrollgruppe	19
Abbildung 3: Median Interleukin 8 der Patienten und Kontrollgruppe	20
Abbildung 4: Median Interleukin 12 der Patienten und Kontrollgruppe	21

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ursachen für die Störungen des vaginalen Regelmechanismus.....	2
Tabelle 2: Vergleich von Mittelwert, Minimal-, Maximal- und Medianwert des pH-Wertes zwischen Patienten und Kontrollgruppe.....	14
Tabelle 3: Vergleich von Mittelwert, Minimal- und Maximalwert (pg/ml) zwischen Patienten und Kontrollgruppe.....	18
Tabelle 4: Signifikanz und Medianwerte (pg/ml) der Patienten- und Kontrollgruppe	19
Tabelle 5: Vergleich von Mittelwert, Minimal- und Maximalwert (pg/ml) zwischen Patienten und Kontrollgruppe.....	19
Tabelle 6: Signifikanz und Medianwert (pg/ml) der Patienten- und Kontrollgruppe	20
Tabelle 7: Vergleich von Mittelwert, Minimal- und Maximalwert (pg/ml) zwischen Patienten und Kontrollgruppe.....	20
Tabelle 8: Signifikanz und Medianwert (pg/ml) der Patienten- und Kontrollgruppe	21

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
E.coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
HLA	humanes Leukozytenantigen
IFN- γ	Interferon gamma
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
L	Lactobacillus
kDa	Dalton
ml	Milliliter
MHC	Major Histocompatibility Complex
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS-Puffer	Phosphate-Borate-Saline-Puffer
RHG	Reinheitsgrade
TLR	Toll like receptor
TNF- α	Tumornekrosisfaktor- alpha
u.v.a.m.	und viele andere mehr

1. Einleitung

1.1. Vaginalflora

Was ist die normale Vaginalflora? Die Normalflora der Vagina wird von Milchsäure produzierenden grampositiven, geraden bis gebogenen Stäbchenbakterien verschiedener Größe gebildet. Die häufigsten Bakterien sind *Lactobacillus jensenii*, *L. acidophilus*, *L. gasseri* und *L. fermenti* (Döderlein-Bakterien nach Albert S. Döderlein, Gynäkologe, München 1860-1941), wobei unterschiedliche Laktobazillenarten gleichzeitig nebeneinander vorkommen können [1-6].

Da die Vermehrung östrogenabhängig ist, kommt es unmittelbar nach der Geburt (innerhalb der ersten Woche) und zwischen Menarche und Menopause zu einer selektiven Kolonisierung der Scheide mit Laktobazillen.

Unter ansteigendem Östrogenspiegel kommt es neben der Epithelproliferation der Vagina und der intrazellulären Glykogenbildung zur selektiven Vermehrung der Laktobazillen, welche sich dann in einer Konzentration von 10^5 - 10^8 Keimen pro ml finden [5-7].

Dass die Konzentration der Laktobazillen östrogenabhängig ist, zeigt sich auch darin, dass sich während der Menstruation und unmittelbar danach geringere Konzentrationen an Laktobazillen finden, welche dann rasch unter dem ansteigenden Östrogenspiegel in der ersten Zyklushälfte wieder ansteigen [1, 3-4, 8-12].

Durch einen fermentativen Prozess lösen Laktobazillen Glykogen aus den unter Gestagenwirkung abgeschilferten Zellen (Zytolyse) und bilden daraus Milchsäure, die für den normalen sauren pH-Wert zwischen 3,8 bis 4,7 der Vagina verantwortlich ist [4-5, 7, 13-16].

Viele Arten von Laktobazillen produzieren außerdem Wasserstoffperoxid (H₂O₂), welches gegenüber Anaerobiern, die keine Katalase besitzen, eine bakterizide Wirkung zeigt [1-5, 7, 9, 13, 15, 17-19].

Verschiedene Faktoren tragen zur Förderung bzw. Hemmung der Laktobazillenflora bei (s. Tab.) [3, 7, 20-21].

Störfaktoren	Auswirkungen
Kindheit, Senium, Schwangerschaft, iatrogen	Östrogenmangel → Glykogenmangel → Verminderung der physiologischen Flora
erhöhte Zervixsekretion, exogen (Intimsprays, zu häufiges Duschen)	pH-Erhöhung → Milieu für Laktobazillen ungeeignet
Antibiotikagabe iatrogen	Vernichtung der physiologischen Flora
schlecht eingestellter Diabetes mellitus, immunsupprimierte Zustände	Resistenzminderung gegen Infektionen

Tabelle 1: Ursachen für die Störungen des vaginalen Regelmechanismus

Häufig finden sich andere (oft fakultativ pathogene) Keime in niedriger Konzentration (bis 10⁴-10⁵/ml) im Fluor, die bei ansteigender Keimzahl (bis 10⁹/ml) pathogen wirken können und so den Übergang von der Normalflora zur Infektion signalisieren [2]. Es handelt sich dabei um Spezies, wie *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, Streptokokken der Gruppe B und D, Staphylokokken, *Proteus mirabilis*, Propionibakterien, *Bacteroides*, Corynebakterien, Eubakterien, Fusobakterien und andere, die zusammen die residente Flora der gesunden, asymptomatischen Frau bilden [1-2, 4, 7, 9, 13, 19, 22].

Das normale Scheidenmilieu zeichnet sich neben einem sauren pH-Wert <4,5 durch ein Nativpräparat aus, welches ausreichend durch Laktobazillen, reichliches Vorhandensein von Vaginalepithelzellen und dem Fehlen bzw. vereinzelter Auftreten von Leukozyten gekennzeichnet ist. Des Weiteren sollte der Fluor geruchsneutral sein, es sollten subjektiv keine Beschwerden und/oder Entzündungszeichen vorliegen [19].

Die Vaginalflora stellt ein biologisches Gleichgewicht dar, welches individuell unterschiedlich bei der einen Patientin als gesund, bei der anderen bereits als pathologisch gelten kann, wobei die Übergänge fließend sind [2].

Als Eubiose gilt demnach eine Scheidenflora, die nach objektiven Ansichten des Arztes und subjektivem Empfinden der Patientin als „physiologisch“ gelten kann [1-2].

Annähernd 100% aller Frauen leiden zumindest einmal in ihrem Leben an einer Dysbiose der Scheide [2]. Hierbei handelt es sich um ein Ungleichgewicht der vaginalen Flora, welches sich in einer Reduktion der Laktobakterienzahl und einer Zunahme an Leukozyten ausdrückt. Die *Bakterielle Dysbiose* kann weder der normalen Scheidenflora noch einer spezifischen vaginalen Infektion zugeteilt werden [2].

Donders et al. Bezeichnen dieses Ungleichgewicht als aerobe Vaginitis [20].

Dieses Ungleichgewicht übt außerdem einen Triggereffekt auf andere Infektionen wie z.B. eine manifeste bakterielle Infektion aus, indem es eine Fehlbesiedelung der Vagina unterhält und die Schutzwirkung des Säuregrades der Scheide zerstört [2].

Patientinnen, bei denen sich ein derartiges Ungleichgewicht eingestellt hat, leiden nicht selten unter Symptomen wie verstärktem Fluor, der von Brennen, Schmerzen, Pruritus, Rötung und Kohabitationsbeschwerden begleitet werden kann [1, 7, 19-20].

Auch wenn das Vollbild einer *Bakteriellen Vaginose* mit seinen vier klassischen Zeichen (pH> 4,5; Clue cells; fischartiger Geruch und Leukozytose im Fluor) nicht vorliegt [2, 19], sind die Übergänge von einer Dysbiose zur klassischen vierfaktoriellen *Bakteriellen Vaginose* oft fließend und nicht voneinander zu trennen [2]. Neben anderen Verfahren stellt die Bestimmung der Reinheitsgrade ein aussagekräftiges Mittel zur Diagnose einer *Bakteriellen Dysbiose* dar. Eine Einteilung nach Reinheitsgraden nach Weissenbacher und Richter wurde zur quantitativen und qualitativen Beurteilung der Vaginalflora anhand von Ausstrichpräparaten vorgenommen [2].

Eine antibiotische Therapie der Dysbiose ist nur bei einer manifesten Erkrankung oder bei subjektiven Beschwerden angezeigt. Bei allen Patientinnen, die weder an einer manifesten vierfaktoriellen *Bakteriellen Vaginose*, noch an eine anderen spezifischen Infektion leiden, bietet sich als Therapie der Dysbiose die Ansäuerung der Scheide mittels Milchsäurepräparaten an [1-2].

1.2. Immunsystem

Es gibt zwei unterschiedliche Reaktionsweisen des Immunsystems, den Körper vor pathogenen Erregern zu schützen.

Die angeborene unspezifische nichtadaptive Immunantwort ist die erste Schiene einer Abwehrreaktion. Sie ist phylogenetisch älter als die spezifische Abwehr und zur unmittelbaren Immunantwort befähigt. Sie wird aktiviert, indem das Antigen direkt als ganzes Protein erkannt wird, d.h. es muss vorher nicht prozessiert und präsentiert werden. Das unspezifische Abwehrsystem besteht aus Makrophagen, Granulozyten, Komplementsystem, NK-Zellen und anderen Komponenten [21, 23-24].

Die spezifische Immunantwort ist die zweite Schiene der Abwehr. Sie ist phylogenetisch jünger und zeichnet sich durch antigenspezifisch arbeitende Immunzellen (T- und B-Lymphozyten) aus. Sie entwickelt sich erst in der direkten Auseinandersetzung mit einem bestimmten pathogenen Erreger, daher wird sie auch als erworbene, adaptive Immunität bezeichnet [21, 23-24].

Spezifische und unspezifische Abwehrmechanismen sind eng miteinander vernetzt, ergänzen sich und arbeiten sowohl mit zellulären als auch mit humoralen Komponenten. Obwohl zellulärer und humoraler Zweig der spezifischen Immunität zusammenwirken, hat jeder Arm seinen Aktionsschwerpunkt [21, 25].

Die zelluläre Abwehr (T-Lymphozyten) steht bei mykobakteriellen, viralen und Pilzinfektionen sowie bei der Transplantatabweisung, der Tumorabwehr und der verzögerten allergischen Reaktion im Vordergrund; die humorale Immunantwort (B-Lymphozyten) steht dagegen bei fast allen bakteriellen Infektionen im Vordergrund [21].

Die B-Zell-vermittelte Immunantwort entfaltet ihre Wirkung hauptsächlich über humorale

Mediatoren (Immunglobuline und spezifische Zytokine), welche von aktivierten B-Lymphozyten, sogenannten Plasmazellen sezerniert werden.

Die zellvermittelte Immunabwehr wird durch T-Lymphozyten koordiniert. Diese sind im Gegensatz zu B-Lymphozyten nicht in der Lage, unlösliche Vollantigene zu erkennen, sondern erkennen diese nur, wenn sie durch sogenannte Antigenpräsentierende Zellen wie z.B. dendritische Zellen (APZ) oder andere kernhaltige Zellen präsentiert werden [21, 23-24].

Endogene Fragmente werden von den auf allen kernhaltigen Zellen exprimierten Klasse-I-HLA-Molekülen präsentiert und aktivieren zytotoxische CD8- Lymphozyten. Extrazellulär anfallende sogenannte exogene Antigene werden ausschließlich von auf APZ vorhandenen Klasse-II-HLA-Molekülen präsentiert und von CD4-Zellen erkannt [23-24].

Naive T-Zellen lassen sich funktionell in zwei grosse Gruppen einteilen, von denen eine Gruppe an ihrer Oberfläche den CD8-Corezeptor, die andere den CD4-Corezeptor trägt [24].

CD8-T-Zellen differenzieren sich zu zytotoxischen Lymphozyten, welche ihre Zielzelle, hauptsächlich intrazelluläre Erreger wie Viren, töten.

CD4-T-Zellen dagegen differenzieren sich zu verschiedenen Effektorzellen mit vielfältigen Funktionen. Die wichtigsten Subpopulationen sind die sogenannten TH1- und TH2-Zellen, die aufgrund der von ihnen jeweils sezernierten Zytokine so definiert sind [24].

Antigenpräsentierende Zellen, vor allem dendritische Zellen sezernieren abhängig vom Auftreten der zu bekämpfenden Krankheitserreger bestimmte Zytokine oder exprimieren Oberflächenproteine, die die Entwicklung von CD4-T-Zellen zu TH1- bzw. TH2-Zellen auslösen [24, 26].

TH1-Zellen aktivieren Makrophagen und stimulieren B-Zellen zur Produktion bestimmter Antikörperisotypen.

TH2-Zellen aktivieren naive B-Zellen zum Isotypenwechsel zu IgE-Antikörpern, deren primäre Funktion darin besteht, parasitäre Infektionen zu bekämpfen. IgE ist außerdem der für Allergien verantwortliche Antikörper [24, 26].

So induzieren IL-12 und Interferon- γ (INF γ) die Differenzierung zur TH1-Zelle, während IL-4 eine Differenzierung zur TH2-Zelle fördert [24, 27].

Unter den CD4- Lymphozyten gehören solche zur TH1-Gruppe, die Interferon-gamma (INF- γ), IL-2, und TNF-alpha sezernieren.

CD4+-Lymphozyten, die die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 erzeugen, werden der TH2-Gruppe zugerechnet [24, 27].

Die von einem CD4+-Zelltyp (TH1 oder TH2) sezernierten Zytokine hemmen die Aktivierung des jeweils anderen Typs [23].

Obwohl Zytokine in vielen Zellarten synthetisiert werden, stellen TH-Zellen die Hauptquelle der Zytokinproduktion dar [24, 28-29].

Zytokine modulieren als Immunmediatoren sowohl die spezifische-, als auch die unspezifische Immunität.

Unterschiedliche Zelltypen sezernieren häufig die gleichen Zytokine, sowie einzelne Zytokine oft auf verschiedene Zelltypen wirken.

Sie werden meist als Reaktion auf entzündliche oder antigene Stimulation gebildet und wirken lokal in einer autokrinen oder parakrinen Art, indem sie an hochaffine Rezeptoren auf den Zielzellen binden [24, 29].

Für viele Zelltypen dienen Zytokine als Wachstumsfaktoren. Zu den wichtigsten Wirkungsweisen gehören die Vermittlung einer natürlichen Immunität; die Regulation von Aktivierung, Wachstum und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten (IL-2, IL-4, FGF- β); Aktivierung der Leukozyten bei Entzündungsreaktionen (Interferon γ , Lymphotoxin, IL-10, IL-5, IL12) und schließlich die Stimulation von Wachstum der Vorläuferzellen von Leukozyten im Knochenmark [24, 29].

Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren und hämatopoetische Wachstumsfaktoren bilden die vier Gruppen der Zytokine [24, 29].

Im Weiteren werden diejenigen Zytokine, die in dieser Arbeit untersucht werden näher charakterisiert:

Interleukin 4:

IL-4 ist ein 20 kDa großes, 129 Aminosäuren langes Protein. Neben Eosinophilen, Basophilen und NK-T-Zellen wird IL-4 maßgeblich von TH2-Zellen synthetisiert. Indem es Makrophagen inaktiviert, sowie die Synthese von IL-1, IL-6 und IL-8 hemmt, verhindert es überschießende Entzündungsreaktionen und spielt somit eine wichtige Rolle für die Homöostase des Immunsystems.

Proinflammatorische Fähigkeiten entfaltet IL-4 indem es die vermehrte Synthese von MHC-Klasse-II-Oberflächenrezeptoren, sowie Überleben und Wachstum von T-Lymphozyten fördert.

IL-4 wirkt sowohl proliferations-, als auch differenzierungsfördernd auf Mastzellen und B-Lymphozyten.

In Letzteren induziert es einen Klassenswitch in der Antikörperproduktion von B-Lymphozyten zu Gunsten der IgG1 und IgE Antikörperproduktion und ist somit in die Mechanismen der Allergie involviert [23, 29].

Interleukin 8:

Es handelt sich um ein nicht glycosyliertes Protein mit einer Molekularmasse von 8 kDa und einer Länge von 72 Aminosäuren. Es wird von einer ganzen Reihe unterschiedlicher Zellen gebildet, wie z.B. Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, u.v.a.m., nicht jedoch von ortsständigen Makrophagen und T-Lymphozyten.

Die Synthese von IL-8 wird durch von IL-1 und dem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF α) stimuliert. IL-4, TGF- β und Glukokortikoide hemmen die IL-8-Synthese.

Dieses Interleukin wirkt proinflammatorisch und ist als starkes Chemotraktant für neutrophile-, basophile Granulozyten und T-Zellen bekannt. Neben der chemotaktischen Wirkung induziert es den vorübergehenden Anstieg und die Freisetzung von Granula, welche besonders in Kombination mit TNF- α zur Immunabwehr, Zerstörung des Gewebes und der Bildung von Eiter führen [23, 29].

Interleukin 12:

(IL-12) ist ein 70kD- Heterodimer, das aus zwei kovalent-gebundenen Polypeptidketten besteht, von denen eine 35 kD und die andere 40 kD schwer ist. Die p35-Untereinheit wird von vielen verschiedenen Zelltypen, z.B. von T- und B-Lymphozyten, von NK-Zellen und Monozyten produziert.

Die p40-Kette wird hauptsächlich durch aktivierte Monozyten und B-Zellen gebildet und ist homolog dem IL-6 Rezeptor.

Indem IL-12 die Produktion von IFN- γ in NK-Zellen stimuliert, verstärkt es die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen und stellt außerdem einen Wachstumsfaktor für diese Zellen dar.

Neben der Stimulation der Differenzierung der CD8+-Zellen in reife, funktionell aktive, zytotoxische T-Lymphozyten induziert IL-12 die Differenzierung der naiven CD4+-Zellen zu TH1-Zellen und inhibiert die IL-4-Synthese der TH2-Zellen (antiallergischer Effekt).

L-12 ist also ein wichtiger Regulator der Effektorphase der zellvermittelten Immunreaktion [23, 29].

1.3. Problemstellung

Ziel unserer Untersuchung war es, neue Erkenntnisse über das lokale Immunverhalten der Vagina im Falle einer *Bakteriellen Dysbiose* zu gewinnen.

Dazu wurden retrospektiv Patientinnen mit *Bakterieller Dysbiose* und Frauen einer definierten Kontrollgruppe hinsichtlich Beschwerdebild, mikrobiologischem Befund, Alter, Scheiden-pH, Reinheitsgrad und schließlich der vaginalen Zytokine IL-4, IL-8, IL-12 untersucht.

Hierbei soll durch den Vergleich der Scheiden-IL-Werte der gesunden Patientinnen der Kontrollgruppe mit den Scheiden-IL-Werten der Patientinnen, die an *Bakterieller Dysbiose* leiden, untersucht werden, ob sich im Falle einer *Bakteriellen Dysbiose* die Scheideninterleukine signifikant verändern.

In diesem Zusammenhang soll geklärt werden, welche Bedeutung die Bestimmung von Scheideninterleukinen vor allem IL-4, IL-8 und IL-12 durch Vaginalspülungen für Diagnostik und Therapieverlauf haben könnte.

2. Material und Methoden

2.1. Patientinnen

Es wurden die Akten von insgesamt 89 Patientinnen untersucht, bei denen die Diagnose einer *Bakteriellen Dysbiose* gestellt wurde.

Zur Diagnostik wurden die Symptome (Brennen, Juckreiz, Fluor, Kohabitationsbeschwerden), das klinische Bild mit Entzündungszeichen der Vaginalschleimhaut, die mikroskopische Beurteilung des Vaginalsekrets (Mischflora mit wenig bis keinen Laktobazillen, überwiegend Bakterien und Leukozyten) und der mikrobiologische Befund herangezogen.

Das Durchschnittsalter der Patientinnen mit *Bakterieller Dysbiose* lag bei 34,3 Jahren (Alter 19-47 Jahre).

Als Kontrollgruppe wurden 43 asymptomatische Frauen ohne klinisches Bild einer *Bakteriellen Dysbiose* ausgewählt. Diese suchten zur jährlichen gynäkologischen Vorsorgeuntersuchung die Poliklinik auf. Bei diesen Frauen war eine eubiotische Vaginalflora zu finden, da sich im mikroskopischen Präparat hauptsächlich Laktobazillen, Epithelzellen und keine Leukozyten befanden.

Sie hatten keine Beschwerden, keinen Fluor, keine entzündlichen oder andere Veränderungen der Vaginalschleimhaut und der Scheiden-pH lag bei Werten zwischen 3,8-4,2.

Das Durchschnittsalter lag bei 36,1 Jahren (Alter 22-46 Jahre).

Patientinnen, die an anderen Infektionen, wie Trichomoniasis, Chlamydien oder einer Gonorrhoe litten, eine Candidainfektion oder das Bild einer *Bakteriellen Vaginose* aufwiesen, und Schwangere wurden ausgeschlossen.

Auch wurde der jeweilige Zeitpunkt des Menstruationszyklus der Patientinnen zum Zeitpunkt der Scheiden-IL-Abnahme in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

2.2. Vaginalabstriche und -spülung

Bei jeder Patientin wurde eine Vaginalspülung und 2 Vaginalabstriche vom hinteren Scheidengewölbe mit geprüften Watteträgern entnommen.

Um Material zur Bestimmung der Zytokine zu erhalten, wurde folgendermaßen vorgegangen: es wurden 2 ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung mittels einer Zweimilliliter-Spritze in die Vagina eingebracht und mit Hilfe eines Watteträgers im hinteren Scheidengewölbe kurz vermengt. Anschließend wurde die Kochsalzlösung mit derselben Spritze wieder aufgesogen und noch am selben Tag wie folgt weiterverarbeitet: Der Inhalt der Spritze wurde auf zwei Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt, um dann mit beiden Gefäßen gleichermaßen zu verfahren. Durch kurze Gabe des Eppendorfgefäßes auf das Vortex-Gerät erreichte man eine Vermengung des Inhaltes. Im Anschluss war das Eppendorfreaktionsgefäß bei 5000 rpm für 2 Minuten zu zentrifugieren. Der Überstand beider Gefäße wurde abpipetiert, in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben und das Sediment in 0,5 ml PBS resuspendiert. Dann wurden beide Gefäße bei -20°C tief gefroren, bis sie zur weiteren Untersuchung benötigt wurden. Für die Bestimmungen von Interleukinen mittels ELISA wurde der so gewonnene Überstand verwendet.

Der erste Abstrich wurde für die mikrobiologische Untersuchung auf pathogene Keime in ein mikrobiologisches Labor versandt.

Der zweite Abstrich diente zur unmittelbaren Bestimmung des Reinheitsgrades.

2.3. pH-Wert

Um den pH-Wert zu bestimmen, verwendete man als einfache und preiswerte Methode pH-Streifen (Spezialindikationspapier 4,0-7,0 der Firma Merck). Das Sekret für die Messung stammte aus dem mittlerern Scheidendrittel.

2.4. Reinheitsgrad

Der Reinheitsgrad gibt Auskunft über den unterschiedlichen Erreger- und Zellgehalt des Scheidensekrets. Dazu erfolgt die mikroskopische Untersuchung des gramgefärbten Präparates. Für die Einteilung des Reinheitsgrades (RHG) haben wir folgendes Schema nach Richter und Weissenbacher verwendet:

RHG 0	„Leeres Bild“, ausschließlich Epithelzellen, keine oder wenig Mikroorganismen, wie z.B. nach Zytostase oder vaginaler Chemotherapie
RHG I	„Reine“ Döderleinflora: zahlreiche Döderleinstäbchen, keine Bakterien (Leukozyten nur bei Döderleinzytolyse)
RHG II	Mischflora: wenig Döderleinstäbchen, massenhaft Bakterien, Leukozyten
RHG III	„Reine Bakterienflora“: keine Döderleinstäbchen, massenhaft Bakterien und Leukozyten

Tabelle 2: Reinheitsgrade nach Weissenbacher und Richter

Da oft eine exakte Zuteilung zu einem Grad nicht möglich ist, gibt es die entsprechenden Einteilungen: RHG I bis II, II bis III, die zur Beschreibung des Reinheitsgrades verwendet wurden [2].

2.5. Zytokinbestimmung

Die Konzentration der folgenden Interleukine (IL) wurde aus dem Vaginalsekret mit den jeweiligen ELISA-Kits von Invitrogen Corporation, Camarillo, CA/USA bestimmt:

IL-4, IL-8, IL-12

Das Wirkungsprinzip eines ELISAs (Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay) soll hier kurz dargestellt werden.

Es werden zwei Antikörper verwendet, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden.

Der erste Antikörper (coating-Antikörper) wird an eine feste Phase (eine spezielle Well-Mikrotiterplatte) gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird dann in die Wells gegeben und eine Zeit lang inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen.

Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt und zurück bleibt nur das am (coating-) Antikörper gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wird ein Detektions-(detection-) Antikörper zugegeben, der ein anderes Epitop als der Capture-Antikörper erkennt und an dessen Ende ein Enzym, Meerrettichperoxidase, gebunden ist.

Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige Antikörper ausgewaschen.

Erst jetzt kann das Antigen detektiert und quantifiziert werden. Es wird ein zum Enzym passendes chromogenes Substrat zugegeben. Dieses wird vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt, dessen Nachweis durch Farbumschlag erfolgt.

Für den quantitativen Nachweis wird eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen durchgeführt, um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal (optische Extinktion) zu erhalten. [51, 52]

2.6. Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Exel erfasst, verschlüsselt und als Tabelle dargestellt.

Der Medianwert von nicht normverteilten Daten wurde mittels T-Test für unverbundene Stichproben verglichen.

Der p-Wert wurde auf 5% festgelegt und die Unterschiede mit $p < 0,05$ als signifikant bewertet.

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SAS angewandt.

3. Ergebnisse

3.1. Diagnostische Marker

3.1.1. Reinheitsgrade

Im Gegensatz zur eubiotischen Vaginalflora der Kontrollgruppe kommt es bei den Patientinnen mit *Bakterieller Dysbiose* neben einem Abfall der Laktobazillen und einem Anstieg von Leukozyten und Bakterien zu einer Verschiebung der Reinheitsgrade von Grad I-II bei Normalflora zu Grad II-III bei *Bakterieller Dysbiose*. Diese Verschiebung der Reinheitsgrade zu höheren Graden bei *Bakterieller Dysbiose* gegenüber der Kontrollgruppe ist bei einem p-Wert von <0.001 als hoch signifikant einzustufen.

Die Häufigkeitsverteilung und damit die Verschiebung der Reinheitsgrade bei der Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe wird in Abbildung 1 verdeutlicht.

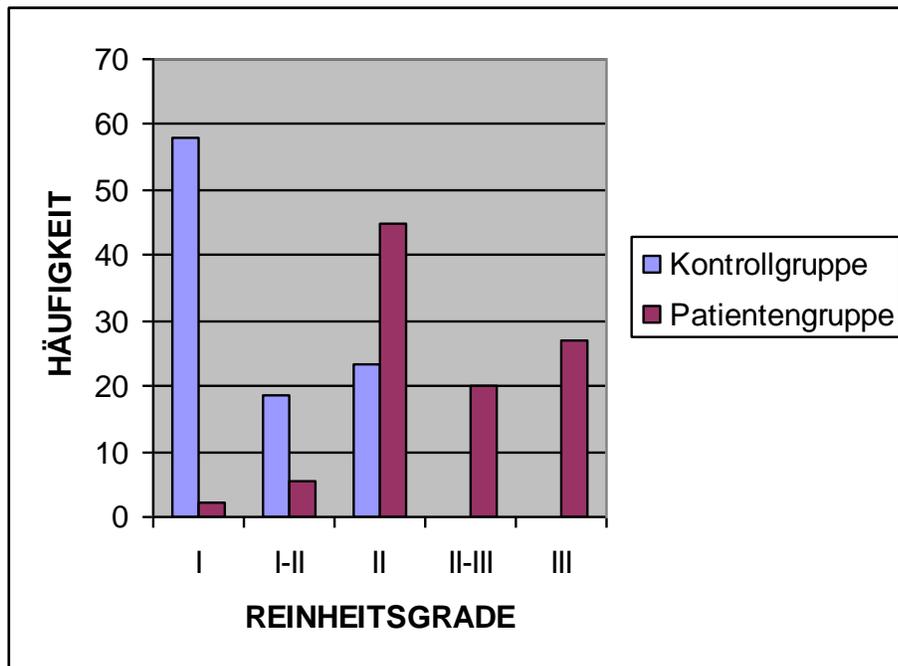


Abbildung 1: Häufigkeit über Reinheitsgrade

3.1.2. pH-Werte

Da es bei der *Bakteriellen Dysbiose* zu einer Abnahme der Laktobazillen und damit zu einer Reduktion der Milchsäureproduktion kommt, verschiebt sich der pH-Wert von Werten zwischen 3,7-4,2 bei vaginaler Eubiose zu höheren Werten.

Diese pH-Verschiebung zu höheren Werten bei Patientinnen mit *Bakterieller Dysbiose* ist bei einem p-Wert von <0.001 statistisch hoch signifikant.

	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median
Kontrollgruppe	4,2	4,0	4,7	4,2
Patientengruppe	4,5	3,8	5,7	4,3

Tabelle 3: Vergleich von Mittelwert, Minimal-, Maximal- und Medianwert des pH-Wertes zwischen Patienten und Kontrollgruppe

3.1.3. Interleukine

3.1.3.1. Interleukin 4

	Patientengruppe (n=89)	Kontrollgruppe (n=43)
IL-4 Mittelwert (pg/ml)	10,6	11,5
IL-4 Minimum (pg/ml)	0,0	0,6
IL-4 Maximum (pg/ml)	124,6	69,6

Tabelle 4: Vergleich von Mittelwert , Minimal- und Maximalwert (pg/ml) zwischen Patienten und Kontrollgruppe

	Patientengruppe (n=89)	Kontrollgruppe (n=43)	p-Wert
IL-4 Median (pg/ml)	5,6	8,4	0,7519

Tabelle 5: Signifikanz und Medianwerte (pg/ml) der Patienten- und Kontrollgruppe

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,7519$) der IL-4 Konzentration zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe.

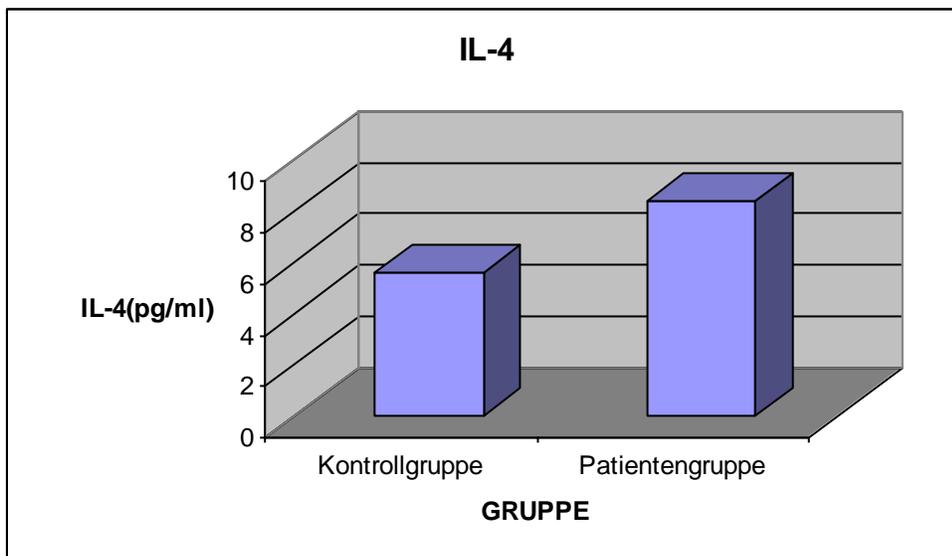


Abbildung 2: Median Interleukin 4 der Patienten und Kontrollgruppe

3.1.3.2. Interleukin 8

	Patientengruppe (n=89)	Kontrollgruppe (n=43)
IL-8 Mittelwert (pg/ml)	4936,7	995,8
IL-8 Minimum (pg/ml)	26,0	25,3
IL-8 Maximum (pg/ml)	37682,0	12239,0

Tabelle 6: Vergleich von Mittelwert, Minimal- und Maximalwert (pg/ml) zwischen Patienten und Kontrollgruppe

	Patientengruppe (n=89)	Kontrollgruppe (n=43)	p-Wert
IL-8 Median (pg/ml)	1813,0	444,0	0,0001

Tabelle 7: Signifikanz und Medianwert (pg/ml) der Patienten- und Kontrollgruppe

Es zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) der IL-8-Konzentration zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe.

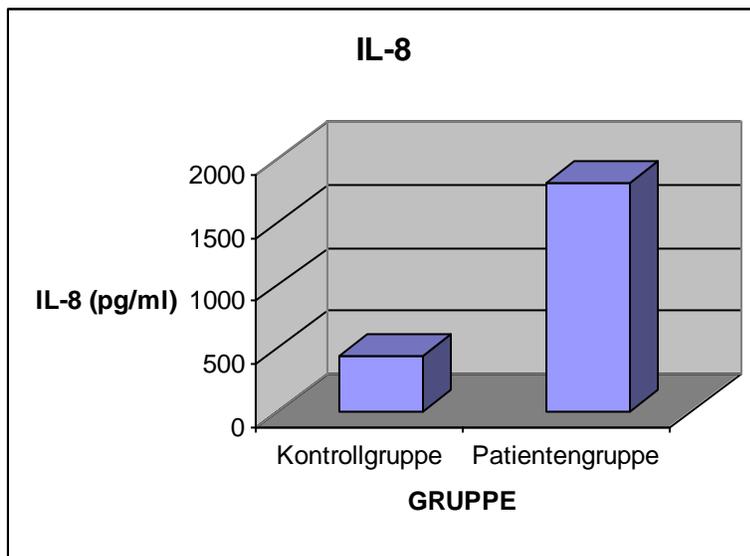


Abbildung 3: Median Interleukin 8 der Patienten und Kontrollgruppe

3.1.3.3. Interleukin 12

	Patientengruppe (n=89)	Kontrollgruppe (n=43)
IL-12 Mittelwert (pg/ml)	14,2	4,1
IL-12 Minimum (pg/ml)	0,0	0,0
IL-12 Maximum (pg/ml)	197,5	32,6

Tabelle 8: Vergleich von Mittelwert, Minimal- und Maximalwert (pg/ml) zwischen Patienten und Kontrollgruppe

	Patientengruppe (n=89)	Kontrollgruppe (n=43)	p-Wert
IL-12 Median (pg/ml)	4,1	2,3	0,0025

Tabelle 9: Signifikanz und Medianwert (pg/ml) der Patienten- und Kontrollgruppe

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,0025$) der IL-12-Konzentration zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe.

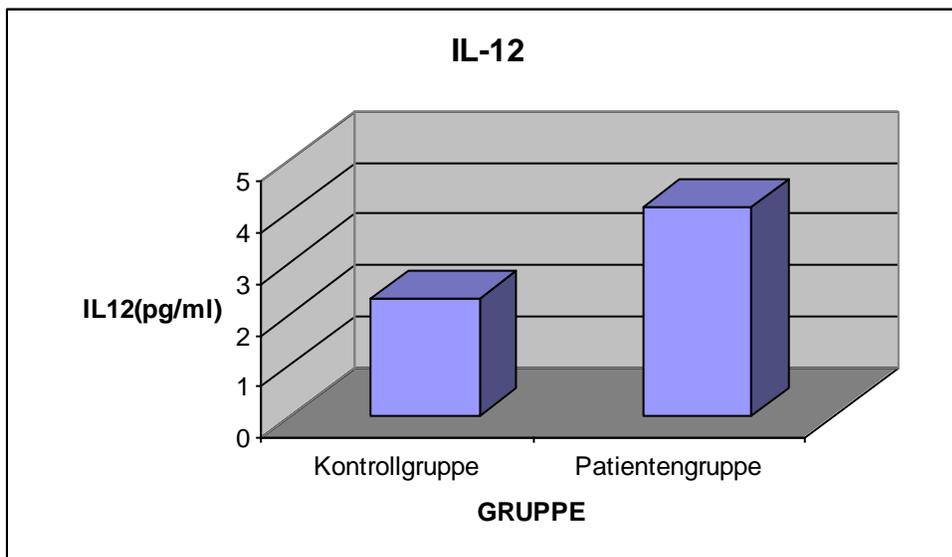


Abbildung 4: Median Interleukin 12 der Patienten und Kontrollgruppe

4. Diskussion

Es wurden in dieser Studie 89 Patientinnen mit dem klinischen Bild einer *Bakteriellen Dysbiose* untersucht.

Diese Patientinnen litten unter Symptomen wie Brennen, Pruritus, Fluor und Kohabitationsbeschwerden.

Das klinische Bild der *Bakteriellen Dysbiose* wurde diagnostisch untermauert durch die Beurteilung der Vaginalflora anhand der Reinheitsgrade im Nativpräparat, sowie durch Messung des vaginalen pH-Wertes und des mikrobiologischen Befundes.

Des Weiteren wurden bei diesen Patientinnen die Zytokine Interleukin 4, Interleukin 8 und Interleukin 12 aus dem Vaginalsekret mittels ELISA bestimmt.

Nativpräparate eignen sich laut Donders et al. besser als Gram-Präparate zur Beurteilung der Vaginalflora und damit auch zur Einstufung der Reinheitsgrade, da Gram gefärbte Präparate neben einer Überbetonung der dysbiotischen Flora zu einer Schädigung der Laktatflora neigen und so zu einer falschen Einschätzung der Vaginalflora zu Gunsten einer Dysbiose führen [30-31].

Da bestimmte Reinheitsgrade mit vielen bakteriellen Infektionen, Leukozytosen und Zytokinausschüttungen korrelieren, stellt die Einstufung der Vaginalflora zu einem Reinheitsgrad einen ersten wichtigen Meilenstein zur Diagnose einer dysbiotischen Vaginalflora dar [32].

Liegt nach Bestimmung des Reinheitsgrades eine dysbiotische Vaginalflora vor, ist zur weiteren Differenzierung beispielsweise einer *Bakteriellen Vaginose* von einer aeroben Vaginitis eine PCR oder Kultur angezeigt [33].

Da hohe Reinheitsgrade ebenfalls bei Infektionen mit den klassischen STDs, wie Chlamydien, Gonokokken, Treponemen etc. vorkommen, müssen diese vorher mikrobiologisch ausgeschlossen werden [33].

Um die Bedeutung der Reinheitsgrade in der Beurteilung der Vaginalflora zu verdeutlichen, stufen einige Studien einen hohen Reinheitsgrad als prädiktiven Indikator bezüglich der Frühgeburtlichkeit aussagekräftiger ein als die Besiedelung der Scheide mit *Gardnerella vaginalis* [34-35].

Ergänzend zum Nativpräparat kann die Messung des vaginalen pH-Wertes weitere Hinweise zur Beurteilung und Diagnostik der Vaginalflora leisten. So kann ein angestiegener pH-Wert von normal 3,8-4,4 auf Werte über 4,5 auf Infektionen der Scheide oder Störungen der Vaginalflora im Sinne einer Dysbiose hindeuten [36].

Hierbei ist zu berücksichtigen, dass einige Faktoren wie z.B. Menstruationsblut, Sperma oder topisch angewandte antifungal oder antibiotisch wirkende Medikamente neben Infektionen ebenfalls zu einem Anstieg des pH-Wertes führen können [37] und anamnestisch abgeklärt werden müssen.

Die Bestimmung von Interleukinen aus dem Vaginalsekret ist ein weiterer möglicher Meilenstein zur Diagnostik vaginaler Infektionen, da bestimmte Infektionen mit gewissen Zytokinausschüttungen einhergehen [20].

So kommt es laut Donders et al. bei der aeroben Vaginitis zu einem signifikanten Anstieg proinflammatorischer Zytokine wie IL-1- β und IL-6 im Vaginalsekret gegenüber der *Bakteriellen Vaginose*, bei der IL-1- β zwar ebenfalls erhöht, aber nicht signifikant erhöht ist [20].

Cauci et al. kommen zu dem Ergebnis, dass es beim Vorliegen einer *Bakteriellen Vaginose* zu einer Unterdrückung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1- β und IL-8 kommt [38].

Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass der Bestimmung gewisser Scheideninterleukine in der Diagnostik von Infektionen oder dybiotischem Scheidenmilieu Bedeutung zukommen könnte.

So weisen Donders et al. darauf hin, wie wichtig es ist, die aerobe Vaginitis diagnostisch von der *Bakteriellen Vaginose* zu trennen, da diese sich sowohl in der Therapie als auch im Hinblick auf Risikofaktoren, wie z.B. Frühgeburtlichkeit bei Schwangeren etc. eindeutig unterscheiden [20, 32].

Donders et al. prägten den Begriff der aeroben Vaginitis. Diese ist definiert durch folgende Kriterien und eventuell mit dem klinischen Bild der *Bakteriellen Dysbiose* gleichzusetzen:

Basis ist die Anzahl vorhandener Laktobazillen. Zusätzlich:

1. Anzahl an vorhandenen Leukozyten
2. Anzahl vorhandener toxischer Leukozyten
3. Anzahl vorhandener Basalzellen, als Zeichen der Infektion
4. Hintergrundflora

Score: 1-4 normale Vaginalflora
 5-6 mäßige aerobe Vaginitis
 7-8 aerobe Vaginitis

Neben den oben genannten Kriterien wurde die immunologische Reaktion anhand von proinflammatorischen Interleukinwerten im Vaginalsekret gemessen und in die eindeutige Diagnosestellung mit einbezogen [20].

Anaerobe Keime wie *Gardnerella vaginalis* führen zum klinischen Bild der *Bakteriellen Vaginose*, aerobe Keime wie *E.coli*, Enterokokken, B-Streptokokken, Staphylokokken, etc. zum entzündlichen Bild der aeroben Vaginitis [20].

Auch ist es möglich, dass eine Mischung aus Beidem vorliegt, sowie Koinfektionen mit *Candida albicans*, Trichomonaden, Gardnerellen etc. bestehen können, welche ähnliche Beschwerden verursachen und differentialdiagnostisch bedacht werden müssen [33].

Bei Patientinnen, die an *Bakterieller Dysbiose* leiden, sollte vordergründig die Frage nach der Ursache und der daraus resultierenden Therapie gestellt werden.

Es gibt viele verschiedene Faktoren, wie z.B. Körperhygiene, Sexualpraktiken, Diabetes mellitus, Einnahme von Medikamenten wie Antibiotika und Antimykotika und vieles andere mehr, die zu einer Verschiebung des mikrobiologischen Gleichgewichtes der Vagina führen können.

Des Weiteren könnte auch eine genetische Devianz oder ein erworbener Defekt der lokalen Immunabwehr der Scheide zugrunde liegen.

Wir bestimmten bei Patientinnen mit *Bakterieller Dysbiose* sowie bei Frauen der Kontrollgruppe die Interleukin 4, IL-8 und IL-12 mittels ELISA im Vaginalsekret.

Es zeigte sich in unseren Untersuchungen eine signifikante Erhöhung des proinflammatorischen Interleukin 12 ($p = 0,0025$) und ein hoch signifikanter Anstieg des ebenfalls proinflammatorischen IL-8 ($p < 0,0001$) bei Patientinnen mit *Bakterieller Dysbiose* gegenüber den Frauen der asymptomatischen Kontrollgruppe.

Das immunmodulatorische IL-4 zeigt dagegen keinen signifikanten Anstieg ($p = 0,7519$).

Eine mögliche Erklärung für unser Ergebnis wäre, dass Bakterien wie E.coli, Enterokokken etc., wie sie bei einer *Bakteriellen Dysbiose* vorherrschen, an TLR4-Rezeptoren der Dendritischen Zellen binden und sie dahingehend aktivieren, dass bevorzugt Interleukin 12 und IL-18 (ebenfalls ein proinflammatorisches Interleukin) gebildet werden. IL-12 lenkt die Aktivierung und Differenzierung der TH-0-Zellen in Richtung TH1-Zellen, welche zu einer Ausschüttung von IL-2, IFN- γ und TNF- α und - β führt [39].

INF- γ induziert nicht nur die Entwicklung von TH1-Zellen aus TH0-Zellen, sondern hemmt auch die IL-4-Synthese und unterdrückt so die Differenzierung zu TH2-Zellen, welche wiederum IL-4 produzieren [39].

Zu einer gesteigerten Interleukin-4-Synthese und Ausschüttung kommt es eher durch nicht-bakterielle Antigene, wie z.B. Parasiten oder Allergene, welche ebenfalls von Dendritischen Zellen prozessiert und präsentiert werden, jedoch bevorzugt an TLR2- und andere Mustererkennungsrezeptoren binden und so über die IL-4-Synthese die Differenzierung der TH-0-Zellen in Richtung TH-2-Zellantwort auslenken [39].

Das heißt, dass im Falle einer *Bakteriellen Dysbiose* der zellvermittelten Immunreaktion, bei der es zu einer Ausschüttung von Interleukinen in Richtung einer inflammatorischen Entzündungsreaktion kommt, eine wesentliche Rolle zukommt, während die humorale Immunantwort unterdrückt wird.

Des Weiteren lässt sich aufgrund der unterdrückten IL-4-Synthese im Falle einer *Bakteriellen Dysbiose* eher auf ein non-allergisches Geschehen schließen.

So konnten auch Cauci et al., Fichorova et al. und Spandorfer et al. in ihren Studien erhöhte Konzentrationen von IL-1 β und IL-8 etc. bei Patientinnen mit abnormaler vaginaler Flora finden [40-42], was sich mit unseren Untersuchungen deckt.

Agrawal et al. kommen zu dem Ergebnis, dass vaginale Infektionen mit *Chlamydia trachomatis* ebenfalls zu einer TH-1-Antwort führen, indem es zu signifikanten Anstiegen von IL-8, IL-12 und anderen proinflammatorischen Interleukinen kommt [43].

Donders et al. stellen fest, dass hohe Reinheitsgrade mit dem Vorliegen verschiedener Infektionserreger wie *Gardnerella vaginalis*, *Trichomoniasis vaginalis*, Enterokokken, B-Streptokokken und *E.coli* korrelieren.

So kommt es beim Vorliegen eines erhöhten Reinheitsgrades der Vaginalflora zu einem linearen Anstieg des pH-Wertes, der Leukozytenzahl und der IL-8 Konzentration, während es zu einem Absinken der Epithelzelllyse und damit der Laktatkonzentration kommt [32].

Diese Erkenntnisse stimmen ebenfalls mit unseren Ergebnissen überein.

Es sollte bedacht werden, dass ein Zytokinanstieg kein infektiöses Geschehen beweist. So können auch mechanische und endogene Faktoren zu einem Anstieg von Zytokinen und Leukozyten führen [41].

Forscht man nach den zu Grunde liegenden Ursachen für das Auftreten einer *Bakteriellen Dysbiose*, so könnten auch Veränderungen der Gene vorliegen, welche die lokale Immunantwort regulieren und damit eine adäquate Antwort auf das Eindringen und Vermehren von Bakterien unmöglich machen.

Genc et al. stellen fest, dass Abweichungen der Gene, die die angeborene Immunantwort auf infektiöse Mikroorganismen regulieren, die interindividuellen Unterschiede bezüglich der Empfänglichkeit für vaginale Infektionen und den Schweregrad infektiöser Beschwerden erklären.

Es zeigen sich komplexe Zusammenhänge zwischen geno- und phänotypischen Merkmalen.

Der Einfluss eines einzelnen genetischen Markers auf den Phänotyp ist in seiner Ausprägung allenfalls gemäßigt und nicht konstant in jeder ethnischen Bevölkerungsgruppe.

Derartige Unbeständigkeit wird hauptsächlich auf Interaktionen zwischen Genen und die Variabilität der Gene innerhalb der Bevölkerung zurückgeführt [44].

Sollte die Ursache einer dysbiotischen Vaginalflora auf genetische Veränderungen oder auf eine Störung der lokalen Immunabwehr zurückzuführen sein, könnten Medikamente, die die Immunabwehr stimulieren, eine möglich Therapieoption darstellen.

Große Fall-Kontroll-Studien über multiple genetische Marker genau definierter Patientengruppen könnten Patientinnen genauer charakterisieren und den Weg zu einer individualisierten Medizin bahnen [44].

Auch Störungen im Hormonhaushalt oder die Einnahme hormonhaltiger Präparate wie zum Beispiel orale Kontrazeptiva könnten als Ursache einer vaginalen Dysbiose in Betracht gezogen werden.

Wira et al. kamen zu dem Ergebnis, dass Schwankungen der Geschlechtshormone Östradiol und Progesteron während des Menstruationszyklus die angeborene Immunantwort im weiblichen Genitaltrakt dahingehend regulieren, dass zwar einerseits eine Befruchtung, Implantation und Schwangerschaft möglich ist, andererseits jedoch während dieser Zeit ein erhöhtes Infektionsrisiko besteht [45].

So konnte gezeigt werden, dass es unter Östrogeneinfluss zu einer Suppression der angeborenen humoralen und zellulären Immunantwort kommt [45].

Es kam bei Mäusen unter Östrogeneinfluss zu einer Lösung der Tight junctions zwischen Epithelzellen, was ein Eindringen potentiell pathogener Keime erleichtert.

Auch kam es zu einer Unterdrückung der Sekretion proinflammatorischer Mediatoren, wie Interleukin 8, sowie zu einer Downregulation immunologisch relevanter Gene [45].

Umgekehrt konnte der genmodulatorische Effekt von Östradiol durch die Anwendung von Östrogenantagonisten aufgehoben werden [45].

Das tiefere Verständnis über die Regulation der vaginalen Epithelzellen und der Immunzellen durch die Geschlechtshormone Östradiol und Progesteron eröffnet neue Perspektiven bezüglich des Schutzes vor vaginalen Infektionen z.B. durch Östrogenantagonisten [45].

Der Einfluß des Menstruationszyklus auf das Scheidenmilieu und damit auf die Höhe bestimmter Interleukinwerte im Vaginalsekret wurde in dieser Arbeit jedoch nicht berücksichtigt.

Keinesfalls handelt es sich im Falle einer *Bakteriellen Dysbiose* um eine harmlose Störung der vaginalen Mikroflora.

Eine gestörte Vaginalflora birgt neben unangenehmen Symptomen ein erhöhtes Risiko für eine Anzahl von weitreichenden Komplikationen.

So stellt laut Donders et al. eine abnormale Vaginalflora, insbesondere das Vorliegen aerober Mikroorganismen wie E. coli, Klebsiellen, Staphylokokken, Streptokokken etc. in der Scheide einschließlich der entzündlichen Reaktion im Zeitraum zwischen der 12.-24. Schwangerschaftswoche einen hohen Risikofaktor für Frühgeburtlichkeit, vorzeitigen Blasensprung, Chorioamnionitis, Infektion des Neugeborenen bis hin zur Sepsis und das Auftreten einer Zerebralparese beim Kind dar [46].

Auch bei nicht schwangeren Frauen kann eine dysbiotische Scheidenflora durch die Aszension der Keime zu ernsthaften Infektionen des oberen Genitaltraktes wie Endometritis oder einer Adnexitis führen, die im schlimmsten Fall eine Unfruchtbarkeit nach sich ziehen können [42].

Carey et al. fanden heraus, dass sowohl die aerobe Vaginitis als auch die sog. Intermediäre Flora, weniger jedoch die voll ausgeprägte *Bakterielle Vaginose* ein erhöhtes Frühgeburtlichkeitsrisiko bergen [46-47].

Sie fordern eine genaue, eindeutige Klassifikation der abnormalen Vaginalflora, die es ermöglicht, zwischen anaerober und aerober Flora zu unterscheiden.

Außerdem sollte das Ausmaß der entzündlichen Reaktion im Vaginalsekret berücksichtigt werden, da eine aerobe Mikroflora im Gegensatz zur anaeroben mit ansteigenden Leukozytenkonzentrationen und hohen proinflammatorischen Zytokinwerten wie z.B. IL-8 im Vaginalsekret einhergeht [20, 32, 46-48].

Interleukin 8, welches bei der *Bakteriellen Dysbiose* im Vaginalsekret signifikant erhöht ist, führt zu einem Anstieg der Prostaglandinsynthese, welche über ein Softening der Zervix und der Induktion vorzeitiger Wehentätigkeit zur Frühgeburtlichkeit führen kann [20, 49].

So könnte Interleukin 8 im klinischen Kontext potentiell sowohl als prädiktiver Infektionsparameter als auch zur Verlaufs- bzw. Erfolgskontrolle der Therapie vaginaler Infektionen verwendet werden.

Da es sich bei der Abnahme vaginaler Zytokinwerte um eine relativ einfache und vor allem non-invasive Methode handelt, könnte sie gerade in der Schwangerschaft enorme Vorteile bringen [50].

Weitere Untersuchungen und vor allem eine eindeutige Klassifikation der Vaginalflora wäre dringen nötig und sinnvoll, um ein dysbiotisches Scheidenmilieu frühzeitig diagnostizieren und therapieren zu können und damit weitreichende gesundheitliche Folgen sowohl für schwangere, als auch für nicht schwangere Frauen abwenden zu können.

5. Zusammenfassung

Es handelt sich bei der *Bakteriellen Dysbiose* um eine Störung des Gleichgewichts der Vaginalflora.

Patientinnen mit *Bakterieller Dysbiose* leiden unter Symptomen wie Brennen, Juckreiz, Ausfluss und Kohabitationsbeschwerden.

Im Gegensatz zur *Bakteriellen Vaginose*, geht die *Bakterielle Dysbiose* mit einer deutlichen Entzündungsreaktion der Vaginalschleimhaut einher.

Mit Hilfe unserer Untersuchungen versuchten wir neue Erkenntnisse über das lokale Immunverhalten der Vagina beim Vorliegen einer *Bakteriellen Dysbiose* und eventuelle Hinweise auf mögliche Ursachen, diagnostische oder therapeutische Möglichkeiten zu erhalten.

Zu diesem Zwecke wurden insgesamt 132 nicht schwangere Frauen untersucht.

89 Patientinnen mit einem Altersdurchschnitt von 34,3 Jahren litten unter dem klinischen Bild einer *Bakteriellen Dysbiose*, 43 Frauen mit einem Altersdurchschnitt von 36,1 Jahren wiesen weder Beschwerden noch einen pathologischen mikrobiologischen Befund auf.

Es wurden mittels ELISA neben dem immunmodulatorischen IL-4 die proinflammatorischen Zytokine IL-8 und IL-12 mit dem Ziel untersucht, die zellvermittelte Immunantwort bei *Bakterieller Dysbiose* zu beurteilen.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte für die proinflammatorischen Interleukine einen signifikanten Anstieg ($p < 0,0001$), während das immunmodulatorische IL-4 keinen signifikanten Anstieg ($p < 0,7519$) aufwies.

Diagnostische Marker wie Scheiden-pH ($p < 0,0001$) waren signifikant erhöht und der Reinheitsgrad zu höheren Werten verschoben.

Die Ergebnisse zeigen, dass die lokale Immunreaktion beim klinischen Bild einer *Bakteriellen Dysbiose* eine große Rolle spielen und sich eventuelle Therapieansätze einer Immun- oder Hormontherapie ableiten lassen.

So könnte man an immunsupprimierende Therapieansätze denken, um die überschießende proinflammatorische Antwort herabzusetzen.

Da es unter Östrogeneinfluss zu einer Suppression der lokalen zellulären Immunantwort kommt, wäre ein Einsatz von Östrogenantagonisten eventuell in Erwägung zu ziehen.

Auch zu diagnostischen Zwecken könnten lokal bestimmte Zytokine wie IL-8 potentiell sowohl als prädiktiver Infektionsparameter, als auch zur Verlaufs- bzw. Erfolgskontrolle der Therapie vaginaler Infektionen verwendet werden.

Dies würde, da es sich bei der Abnahme vaginaler Zytokinwerte um eine relativ einfache und vor allem non-invasive Methode handelt, enorme Vorteile bringen.

Nicht nur bei Frauen, die eine dysbiotische Vaginalflora aufweisen, sondern auch beim Kind kann es im Falle einer Schwangerschaft zu weitreichenden Komplikationen, wie Amnioninfektionssyndrom, vorzeitigem Blasensprung, Frühgeburt, Infektion des Kindes bis zur Sepsis und Zerebralparese kommen.

Auch bei nicht schwangeren Frauen kann eine *Bakterielle Dysbiose* neben einer Endometritis zu Adnexitis und diese im schlimmsten Fall zu Unfruchtbarkeit führen.

Dies zeigt, wie wichtig und sinnvoll eine definierte Klassifikation der Vaginalflora und eine Forschung in diesem Gebiet sind, um neben einer fundierten Diagnostik einen hohen therapeutischen Effekt zu erzielen und damit weitreichenden Folgeschäden zu verhindern.

6. Literaturverzeichnis

1. Petersen, E.E., *Infektionen in Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2003.
2. Weissenbacher, E.R., *Fluorpraktikum/[1]*. 2001.
3. Stauber, M., *Gynäkologie und Geburtshilfe*
213 Tabellen ; [mit Video-CD-ROM: Filme zu Spontangeburt und Sectio]. 3.,
aktualisierte Aufl. ed. 2007, Stuttgart: Thieme. XXVI, 785 S.
4. Larsen, B. and G.R. Monif, *Understanding the bacterial flora of the female genital tract*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(4): p. e69-77.
5. Boris, S. and C. Barbes, Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. Microbes Infect, 2000. **2**(5): p. 543-6.
6. Boris, S., et al., Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. Infect Immun, 1998. **66**(5): p. 1985-9.
7. Kunz, J., [Causes and consequences of an unbalanced vaginal ecosystem]. Praxis (Bern 1994), 1995. **84**(48): p. 1405-15.
8. Hill, J.E., et al., Characterization of vaginal microflora of healthy, nonpregnant women by chaperonin-60 sequence-based methods. Am J Obstet Gynecol, 2005. **193**(3 Pt 1): p. 682-92.
9. Larsen, B., *Vaginal flora in health and disease*. Clin Obstet Gynecol, 1993. **36**(1): p. 107-21.
10. Larsen, B. and R.P. Galask, *Vaginal microbial flora: composition and influences of host physiology*. Ann Intern Med, 1982. **96**(6 Pt 2): p. 926-30.
11. Nam, H., K. Whang, and Y. Lee, *Analysis of vaginal lactic acid producing bacteria in healthy women*. J Microbiol, 2007. **45**(6): p. 515-20.

12. Verhelst, R., et al., Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. *BMC Microbiol*, 2005. **5**: p. 61.
13. Faro, S., *Vaginitis: diagnosis and management*. *Int J Fertil Menopausal Stud*, 1996. **41**(2): p. 115-23.
14. Mardh, P.A., *The vaginal ecosystem*. *Am J Obstet Gynecol*, 1991. **165**(4 Pt 2): p. 1163-8.
15. Pybus, V. and A.B. Onderdonk, Microbial interactions in the vaginal ecosystem, with emphasis on the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Microbes Infect*, 1999. **1**(4): p. 285-92.
16. Redondo-Lopez, V., R.L. Cook, and J.D. Sobel, Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis*, 1990. **12**(5): p. 856-72.
17. Carson, H.J., P.G. Lapoint, and G.R. Monif, *Interrelationships within the bacterial flora of the female genital tract*. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 1997. **5**(4): p. 303-9.
18. Martin, H.L., et al., Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis*, 1999. **180**(6): p. 1863-8.
19. Mylonas, I. and K. Friese, *Infektionen in Gynäkologie und Geburtshilfe*. 1. Aufl. ed. 2010, München: Elsevier, Urban & Fischer. XII, 418 S.
20. Donders, G.G., et al., Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG*, 2002. **109**(1): p. 34-43.
21. Krautzig, H.R.-P.S., *Basislehrbuch Innere Medizin*. 2008.
22. Zhou, X., et al., Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology*, 2004. **150**(Pt 8): p. 2565-73.

23. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and J.S. Pober, *Immunologie Cellular and molecular immunology <dt.>*. 1996, Bern [u.a.]: Huber. 536 S. : Ill., graph. Darst.
24. Murphy, K.P., Janeway Immunologie *Janeway's Immunobiology <dt.>*. 7. Aufl., [1. dt. Aufl.] ed. 2009, Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl. XXVI, 1093 S.
25. Borghans, J.A., A.J. Noest, and R.J. De Boer, *How specific should immunological memory be?* J Immunol, 1999. **163**(2): p. 569-75.
26. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
27. Mosmann, T.R., et al., Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 5-14.
28. Raghupathy, R., et al., Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. Hum Reprod, 2000. **15**(3): p. 713-8.
29. Ibelgaufts, H., *Lexikon Zytokine*. 1992, München: Medikon-Verl. 259 S. : Ill.
30. Donders, G.G., et al., Assessment of Vaginal Lactobacillary Flora in Wet Mount and Fresh or Delayed Gram's Stain. Infect Dis Obstet Gynecol, 1996. **4**(1): p. 2-6.
31. Donders, G.G., et al., Wet mount microscopy reflects functional vaginal lactobacillary flora better than Gram stain. J Clin Pathol, 2000. **53**(4): p. 308-13.
32. Donders, G.G., et al., *Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora*. Am J Obstet Gynecol, 2000. **182**(4): p. 872-8.
33. Donders, G., et al., Lactobacilli in Papanicolaou smears, genital infections, and pregnancy. Am J Perinatol, 1993. **10**(5): p. 358-61.

34. Hay, P.E., et al., Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *BMJ*, 1994. **308**(6924): p. 295-8.
35. Donders, G.G.G., et al., *Vaginitis*. *N Engl J Med*, 1998. **338**(21): p. 1548-1549.
36. Pavletic, A.J., et al., *Experience with routine vaginal pH testing in a family practice setting*. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2004. **12**(2): p. 63-8.
37. Donders, G.G., *Definition and classification of abnormal vaginal flora*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2007. **21**(3): p. 355-73.
38. Cauci, S., *Vaginal Immunity in Bacterial Vaginosis*. *Curr Infect Dis Rep*, 2004. **6**(6): p. 450-456.
39. Martin, M. and K. Resch, *Immunologie*. 2009, N.N.: UTB. 319 S.
40. Fichorova, R.N., et al., Distinct proinflammatory host responses to *Neisseria gonorrhoeae* infection in immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Infect Immun*, 2001. **69**(9): p. 5840-8.
41. Cauci, S., et al., Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1beta and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women. *Mol Hum Reprod*, 2003. **9**(1): p. 53-8.
42. Spandorfer, S.D., et al., Relationship of abnormal vaginal flora, proinflammatory cytokines and idiopathic infertility in women undergoing IVF. *J Reprod Med*, 2001. **46**(9): p. 806-10.
43. Agrawal, T., et al., The mucosal immune response to *Chlamydia trachomatis* infection of the reproductive tract in women. *J Reprod Immunol*, 2009. **83**(1-2): p. 173-8.
44. Genc, M.R., A. Onderdonk, and S.S. Witkin, *Innate Immune System Gene Polymorphisms in Women with Vulvovaginal Infections*. *Curr Infect Dis Rep*, 2004. **6**(6): p. 462-468.

45. Wira, C.R., et al., Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens. *Am J Reprod Immunol*, 2010. **63**(6): p. 544-65.
46. Donders, G.G., et al., Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG*, 2009. **116**(10): p. 1315-24.
47. Carey, J.C. and M.A. Klebanoff, *Is a change in the vaginal flora associated with an increased risk of preterm birth?* *Am J Obstet Gynecol*, 2005. **192**(4): p. 1341-6; discussion 1346-7.
48. Donders, G.G., *Bacterial vaginosis during pregnancy: screen and treat?* *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1999. **83**(1): p. 1-4.
49. Discacciati, M.G., et al., Microbiological characteristics and inflammatory cytokines associated with preterm labor. *Arch Gynecol Obstet*, 2010.
50. Basso, B., F. Gimenez, and C. Lopez, *IL-1beta, IL-6 and IL-8 levels in gynecobstetric infections.* *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2005. **13**(4): p. 207-11.
51. Engvall, E. & Perlman, P. (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. In: *Immunochemistry*. Bd. 8, S. 871-874. PMID 5135623
52. Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A. & Kuby, J. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: *Immunology*, 5th ed., pp. 148-150. W. H. Freeman, New York, 2003, ISBN 0-7167-4947-5

7. Anhang

7.1. Patientenrohdaten

Patient	Gruppe	ALTER	IL4	IL8	IL12	ph	Reinheitsgrad
1	1	29	7,2	345	0	4,2	I
2	1	24	23,2	444	8,2	4,3	I
3	1	42	8,4	123	5,8	4,3	I-II
4	1	38	1,1	255	0	4,2	I-II
5	1	46	8,4	2610	4,3	4,4	!
6	1	38	8,6	81	1,5	4,6	!
7	1	28	10,5	1404	4,4	4,3	II
8	1	38	4,2	25,29	32,6	4,1	I
9	1	33	1,8	3075	0	4,1	I
10	1	37	22,8	1147	0	4,2	I-II
11	1	39	0,7	303	0	4,3	I
12	1	22	0,6	300	0,7	4,1	I-II
13	1	41	23,4	89	4,9	4,2	I
14	1	45	11,5	281	0	4,2	II
15	1	45	7	326	2,3	4,1	II
16	1	42	11,8	704	1,6	4,3	I
17	1	42	15,9	609	0	4,1	I
18	1	42	10,3	2337	9,3	4,1	I-II
19	1	39	11,9	214	8,7	4,2	I
20	1	38	11,1	574	1,5	4,3	I
21	1	24	4,7	1769	0,6	4,1	I
22	1	42	69,6	445	2,2	4,3	I
23	1	32	19,7	300	9,3	4,2	II
24	1	38	54,3	288	0,8	4,1	I-II
25	1	30	22,8	246	4,9	4,3	II
26	1	33	14,1	370	5,6	4,3	I
27	1	42	10	509	10,5	4,1	II
28	1	31	7,2	260	0	4,2	II
29	1	36	7,2	62	2,3	4,4	I
30	1	30	3,6	12239	0	4,2	I
31	1	36	0,6	566	6,4	4,1	I-II
32	1	24	12	3527	1	4,3	I
33	1	32	2	1703	2,1	4,3	I
34	1	38	1,5	412	10,9	4,3	II
35	1	46	8,7	587	8,1	4,2	I
36	1	37	6,1	879	1,2	4,3	II
37	1	46	6,1	887	2,3	4,3	I
38	1	46	5,2	27	1,8	4,1	I
39	1	28	5,9	129	1,8	4,1	I
40	1	22	3	1007	3,9	4,4	I
41	1	44	13,8	1717	11,9	4	II
42	1	30	4	1099	3,5	4,7	I
43	1	39	11,6	676	2,8	4,3	I-II

44	2	27	15,9	1484	17	4	II-III
45	2	33	21,1	509	8,8	4,4	II
46	2	21	11,8	5436	4,6	5,5	II-III
47	2	40	30,1	21603	4,2	3,8	II
48	2	33	23,1	15880	16	4,5	III
49	2	26	24,9	1193	6,5	4,3	II
50	2	45	5,3	14013	74,4	4	II
51	2	36	25,6	3101	0,7	4,3	II
52	2	35	8	25343	13,9	4,4	II-III
53	2	29	4,3	2495	3,2	4,6	II-III
54	2	35	1,7	2896	10,2	4,8	II
55	2	35	5,8	1090	3,9	4,7	III
56	2	29	45,5	481	140,3	4,8	II-III
57	2	40	8,7	3313	4	4	II
58	2	28	17,1	713	0,3	5	II
59	2	41	7,8	17361	27	4,4	II
60	2	32	9,6	2264	4	4,2	II
61	2	36	24,1	813	14,1	4,7	III
62	2	24	2	2467	43	4,1	II
63	2	47	2,6	2146	16,8	4,4	III
64	2	39	7,1	11966	2,8	4,4	II
65	2	40	11,3	1105	0,6	4,1	I
66	2	34	7,5	28904	6,4	4,3	II
67	2	34	0,2	3345	197,5	4,2	II
68	2	35	5,4	3449	9,3	4,4	II
69	2	32	7,1	1618	1,7	4,1	II
70	2	45	4,2	3504	0	4,1	II
71	2	37	5,9	1069	0,5	4,3	II
72	2	38	5,6	14440	3,8	4,2	I
73	2	45	10,9	1175	2,3	4,2	II
74	2	44	8,1	15062	1,5	4,2	II
75	2	40	7,8	1633	1,3	4,3	II
76	2	46	1,9	12013	36,6	4,3	III
77	2	32	4,8	18542	19,9	4,1	II
78	2	33	0	1803	0	4,1	I-II
79	2	22	4,5	1361	1,4	4,2	II
80	2	37	4,8	1013	0	4,3	II
81	2	19	1,9	4372	0,6	4,2	II-III
82	2	44	6,7	26	0	4,3	II
83	2	28	0	607	0	4,2	III
84	2	32	4,3	75	0	4,1	I-II
85	2	42	7,3	2635	0	4,3	III
86	2	41	7,2	456	2,5	4,2	I-II
87	2	23	4,1	2015	9,5	4,1	II
88	2	19	101,2	15910	89,1	4,3	III
89	2	46	1,8	11117	52,3	4,4	II-III
90	2	41	6,9	1015	4,7	4,4	II-III
91	2	42	4,9	475	3,3	4,2	II

92	2	30	1,4	14611	19,4	4,3	II-III
93	2	25	16,8	1502	5,2	4,1	II
94	2	43	4,6	1543	0	4,1	I-II
95	2	44	4,1	654	0,8	4,2	II
96	2	24	1,2	2892	0	4,3	II
97	2	35	12,4	2148	9	4,1	II-III
98	2	23	6,9	2156	1,5	4,2	II-III
99	2	42	4,7	4667	4,1	4,1	II
100	2	33	6,3	3790	2,7	5,3	III
101	2	36	4,1	1302	0	4,7	III
102	2	42	10	1702	4,7	5	III
103	2	26	0,2	37682	25,8	4,1	I-II
104	2	36	0	564	0	4,2	II-III
105	2	43	0,8	5148	20,2	5,5	II
106	2	22	3,7	1416	0	4,7	III
107	2	41	1,1	2533	0	5	II-III
108	2	44	4,8	15157	34,8	4,8	III
109	2	39	6,8	126	5,6	4,5	II
110	2	41	4,6	719	7,4	4,9	II-III
111	2	32	11,9	2120	10,4	4,9	III
112	2	45	4	329	3,7	4,6	II
113	2	31	4,8	2481	0	5	II-III
114	2	21	2,9	2411	2,5	5,5	II
115	2	34	0	2689	72,6	4,7	III
116	2	40	73,1	1480	45,9	4,1	II
117	2	42	0	81	5,9	4,2	II-III
118	2	41	124,6	1199	65,2	5,1	III
119	2	19	15,2	2102	0	4,8	II-III
120	2	32	12,1	368	3,8	4,9	III
121	2	32	6,8	1460	2,7	4,9	II
122	2	22	3,1	23829	0	4,3	III
123	2	29	10,5	1404	4,4	4,3	II
124	2	37	5,8	1800	6,3	5	III
125	2	43	19,9	1123	12,5	5,7	III
126	2	22	2,2	387	5,5	4,3	II-III
127	2	40	1,9	1813	3,4	4,1	II
128	2	25	2,2	1858	0	4,9	III
129	2	32	5,9	1574	0,5	4,4	III
130	2	30	3,6	1119	8,2	4,4	III
131	2	25	0	1060	4,9	5,2	III
132	2	25	0	1060	4,9	4,1	II
133	3	25	0	1060	4,9	4,2	II
134	3	34	0,2	3345	197,5	4,4	III
135	3	32	5,9	1574	0,5	4,3	II
136	3	43	19,9	1123	12,5	4,8	III
137	3	22	3,1	23829	0	4,1	II
138	3	32	6,8	1460	2,7	5,6	III
139	3	32	12,1	368	3,8	4,4	III

140	3	34	0	2689	72,6	4	II-III
141	3	36	0	564	0	4,3	II
142	3	26	0,2	37682	25,8	4,1	II
143	3	42	10	1702	4,7	4,3	III
144	3	23	6,9	2156	1,5	4,2	II
145	3	44	4,1	654	0,8	4,7	II-III
146	3	40	7,8	1633	1,3	4,4	II
147	3	44	8,1	15062	1,5	4,1	II
148	3	32	7,1	1618	1,7	4,9	III

8. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Ernst Rainer Weissenbacher für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Frau Dr. Susanne Hoffmann danke ich herzlich für die überaus freundliche und hilfsbereite Unterstützung während des gesamten Entstehungsprozesses.