

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. H. Hepp)

Nachweis von Candida und Bestimmung der Zytokine Interleukin-4, Interleukin-5 und Interleukin-13 sowie von Prostaglandin E₂, Candida-spezifischem IgE und Gesamt-IgE im Vaginalsekret bei Frauen mit Verdacht auf chronisch rezidivierende Vulvovaginalcandidose

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

vorgelegt von
Tobias Marcus Weissenbacher
aus
München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. habil. E.R. Weissenbacher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. K. Friese

Priv.Doiz. Dr. med. U. Wintergerst

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Prof. Steven S. Witkin, PhD

Prof. Dr. med habil. H. Spitzbart

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2004

meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Abkürzungen.....	8
1. Einleitung und Fragestellung.....	9
1.1. Einleitung.....	9
1.2. Fragestellung.....	16
2. Material und Methode.....	17
2.1. Material.....	17
2.1.1. Geräte.....	17
2.1.2. Material.....	18
2.2. Patientinnen.....	19
2.2.1. Studiengruppe.....	19
2.2.2. Vaginalabstriche.....	20
2.3. Kulturen.....	21
2.3.1. Material.....	21
2.3.2. Anlegen von Pilzkulturen.....	21
2.4. DNA-Freisetzung.....	23
2.4.1. Material.....	23
2.4.2. DNA-Extraktion.....	24
2.5. Candida PCR.....	25
2.5.1. Material.....	25
2.5.2. Candida-Primer.....	26
2.5.3. Durchführung der PCR.....	26
2.5.4. Enzymatisches Schneiden der DNA.....	27

	Seite
2.5.4.1.	Material..... 27
2.5.4.2.	Durchführung..... 28
2.6.	Gelelektrophorese..... 28
2.6.1.	Material..... 28
2.6.2.	Durchführung..... 29
3.	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)..... 30
3.1.	Material..... 30
3.2.	IL-4, IL-5 und IL-13 ELISA..... 30
3.2.1.	Reagenzien zur Bestimmung der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13..... 30
3.2.2.	Herstellung der Standardverdünnungsreihe..... 31
3.2.2.1.	Humanes IL-4-Standard..... 31
3.2.2.2.	Humanes IL-5-Standard..... 31
3.2.2.3.	Humanes IL-13-Standard..... 32
3.2.3.	Streptavidin-Peroxidase (IL-4, IL-5 und IL-13)..... 32
3.2.4.	Gepufferte Waschlösung (IL-4, IL-5 und IL-13)..... 32
3.2.5.	Durchführung..... 32
3.2.6.	Auswertung der Messergebnisse..... 34
3.3.	Prostaglandin E ₂ – ELISA..... 36
3.3.1.	Reagenzien zur Bestimmung von Prostaglandin E ₂ 36
3.3.2.	Herstellung der Prostaglandin E ₂ – Standardverdünnungsreihe..... 36
3.3.3.	Gepufferte Waschlösung..... 37
3.3.4.	Durchführung..... 37
3.3.5.	Auswertung der Messergebnisse..... 38

3.4.	Bestimmung der Gesamt IgE – Konzentration.....	40
3.4.1.	Reagenzien zur Bestimmung der Gesamt-IgE-Konzentration.....	40
3.4.2.	Kalibrationsseren.....	40
3.4.3.	Gepufferte Waschlösung.....	41
3.4.4.	Durchführung.....	41
3.4.5.	Auswertung der Messergebnisse.....	42
3.5.	Bestimmung des candidaspezifischen IgE.....	43
3.5.1.	Reagenzien zur Bestimmung der Konzentration von candidaspezifischem IgE im Vaginalabstrich.....	43
3.5.2.	Gepufferte Waschlösung.....	43
3.5.3.	Durchführung.....	43
3.5.4.	Auswertung.....	44
4.	Ergebnisse.....	45
4.1.	Candidanachweis.....	45
4.1.1.	Kultur.....	45
4.1.2.	PCR.....	46
4.2.	Auswertung des ELISA.....	50
4.2.1.	Ergebnisse der Bestimmung von IL-4, IL-5 und IL-13.....	50
4.2.2.	Ergebnisse der Bestimmung von Prostaglandin E ₂ , Gesamt – IgE und candidaspezifischem IgE.....	51
4.2.3.	Immunmodulatoren im Überblick	53
4.2.4.	PCR und ELISA – Ergebnisse im Vergleich.....	61
4.2.5.	Immunmodulatoren und Candidaspezies im Vergleich.....	68

	Seite
5. Diskussion.....	69
6. Zusammenfassung.....	80
7. Literaturverzeichnis.....	82
Danksagung.....	92
Lebenslauf.....	93

Abkürzungen

Aqua a.i.	Aqua ad injectabilia
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CRVVC	Chronisch Rezidivierende Vulvo- Vaginalcandidose
CMI	Zellvermittelte Immunität
dB-cAMP	Dibutyryl cAMP
Elisa	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
h-IL	humanes Interleukin
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
kDa	kilo Dalton
mM	milli Mol
NID-Puffer	Nonionic Detergent Puffer
NTP (ATP, GTP, TTP, CTP)	Nukleotidtriphosphate (Adenosintri- phosphat, Guanosintriphosphat, Thymidintriphosphat, Cytidintri- phosphat)
PBS-Puffer	Phosphate-Borate-Saline-Puffer
PCR	Polymerase chain reaction
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
IFN	Interferon
rpm	rounds per minute
S. D.	Standard Deviation
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrose Faktor
VVC	Vulvovaginale Candidose

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Einleitung

Die chronisch rezidivierende Vulvovaginalcandidose (CRVVC) stellt für den Arzt nach wie vor eine Herausforderung dar, vor allem in Hinblick auf den hohen Leidensdruck, den die Patientinnen aufgrund rezidivierender Beschwerden, oft über viele Jahre hinweg, haben.

Etwa drei Viertel aller Frauen haben mindestens einmal in ihrem Leben eine Episode einer Candidainfektion [41,44,61] wobei die Hälfte aller Frauen bereits bis zur Mitte des zwanzigsten Lebensjahres einmal an einer vulvovaginalen Candidose erkrankt waren [45]. Bei insgesamt 5-10% kommt es zu mehr als einer Episode [2,44,46,61]. Bei Patientinnen, die an vier oder mehr Candidainfektionen pro Jahr leiden, wird dann die Diagnose einer chronisch rezidivierenden Vulvovaginal-Candidose gestellt [44,46]. Kommt es durch die Sprosspilzbesiedlung zu Symptomen wie Juckreiz, Brennen, Ausfluss und Kohabitationsschmerzen spricht man von dem Krankheitsbild der Candidose.

Speziell bei der akuten Form der vulvovaginalen Candidose, die eine Vielzahl von Frauen betrifft, lassen sich oft prädisponierende Faktoren als Ursache des Pilzwachstums feststellen. Hinzu kommen hormonelle Schwankungen, insbesondere hohe Östrogen-Spiegel, die sowohl den Krankheitsverlauf als auch die Symptomatik im negativen Sinne triggern [2,13]].

Als wichtigste exogene Faktoren, welche die Entstehung einer Candidose und auch deren Persistenz fördern können, sind die Einnahme von Antibiotika und immunsuppressiven Substanzen zu nennen, wobei die Einnahme von Antibiotika sogar als Risikofaktor bezeichnet werden kann. Endokrinopathien, Diabetes mellitus und Schwangerschaft können ebenfalls für das Auftreten einer Candidose ursächlich sein. [2,11,40,41,61,72,].

Es gibt aber auch Untersuchungen, dass bei Patientinnen mit CRVVC diese prädisponierenden Faktoren nur in seltenen Fällen eine Rolle spielen [2].

Hier scheint eine Anzahl ätiologischer Faktoren, immunologischer Störungen und Zusammenhänge, die es noch zu erforschen gilt, für eine Chronifizierung verantwortlich zu sein.

In mehr als 85% der Fälle wird eine Vulvovaginal-Candidose durch eine Infektion mit *Candida albicans*, gefolgt von *Candida glabrata* mit etwa 4-5% verursacht. Weniger häufig sind dagegen *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* und *Candida tropicalis* [40,41,61,65].

Der Abwehrmechanismus gegen eine vaginale Candidainfektion ist bis heute nur mangelhaft aufgeklärt.

Bei der Bekämpfung der CRVVC spielt die zelluläre Immunität eine entscheidende Rolle [1,12,21,26,54,67,]. Aber auch die humorale Immunantwort kommt über eine Antikörper-Produktion zum tragen. Hier ist das *Candida* spezifische Immunglobulin A (IgA) zu erwähnen, dem ein protektiver Wert zugesprochen wird. Trotz allem kommt der humoralen Antwort nur eine untergeordnete Rolle zu, da die Sekretion der Antikörper Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin M (IgM) und auch IgA im vaginalen Sekret nicht ausreicht, um einen natürlichen Schutz gegen eine Candidainfektion zu gewährleisten [4] und sie nur während einer kurze Phase der Kolonisation wirksam ist [46].

Verantwortlich für die zelluläre Immunabwehr sind CD4+ T-Helfer-Zellen [20], die in die Subtypen Th1 und Th2 unterteilt werden. Diese Subtypen produzieren verschiedene Zytokine, die in der Vagina lokal eine wichtige Rolle als Immunmodulatoren spielen.

Zu den Th1-Typ Zytokinen gehören Interleukin-2 (IL-2), Interferon (IFN)-gamma und IL-12, während die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 und Transforming Growth Factor (TGF-beta1) den Th2-Typ Zytokinen zugerechnet werden [1,46,34,67].

Die immunologische Antwort vom Th1-Typ hat über die Freisetzung von IFN eine protektive Wirkung, fördert die Phagozytose durch Makrophagen und führt zu einer Freisetzung von IL-1; dieses stimuliert wiederum die Produktion von IL-2. Durch die Immunantwort vom Th1-Typ kommt es zu einer Hemmung der Aktivierung von Th2-Zellen. Die Antwort vom Th2-Typ hingegen führt über eine Freisetzung von Th2-spezifischen Zytokinen und über deren Wirkung zu einer Downregulierung der zellvermittelten Immunität [1,34,46,77] und damit unter Umständen zu einer Verschlechterung der Krankheitssymptome. Des weiteren bewirkt die Th2-Immunantwort eine Aktivierung von eosinophilen Zellen, ist für den Klassenwechsel von Antikörpern zuständig, führt zu einer Antikörperproduktion durch B-Zellen sowie zu einer Reduktion der Funktion von Th1-Zellen [34,77].

Trotz der protektiven Rolle der Th1-Typ zellvermittelten Immunität [54,67] kann es zu einer Infektion kommen, da Studien ergaben, dass eine mangelhafte Th-1 Typ CMI gegen *Candida albicans* und auch eine mangelhafte Umwandlung in lokale T-Zellen während einer *Candida* Infektion [67] vorkommen können oder diese begünstigen [23,24].

Immunologisch verantwortlich für die Entstehung einer rezidivierenden Vaginose ist eine vorübergehende und lokale Hemmung der zellvermittelten Immunität.

Eine Infektion mit *Candida* führt zu einem Anstieg vaginaler Lymphozyten [12,73], Patienten mit CRVVC dagegen zeigen eine verminderte proliferative Antwort von Lymphozyten auf diese Infektion [73]. Dieser proliferativen Hemmung liegt eine gesteigerte Produktion von PGE_2 durch die Makrophagen der Patientinnen zugrunde, wodurch wiederum die IL-2 Produktion gehemmt und dadurch die Lymphozytenproliferation blockiert wird [60,73,74,]. Durch diese Schwächung der Lymphozytenantwort kommt es zu einer Proliferation von *Candida* und im weiteren zu einer klinischen Infektion [73].

Die Immunabwehr einer Candidainfektion ist eher ein lokales, als ein systemisches Geschehen, zumal die vaginalen Epithelzellen eine Anti-*Candida*-Aktivität zeigen, welche aber bei Patientinnen mit CRVVC reduziert ist [2]. Eine Störung dieses komplexen Immungeschehens kann dann zu den oben beschriebenen vaginalen Symptomen führen. Auch Monozyten spielen eine Rolle, indem sie über eine autokrine feedback-regulation mit Hilfe einer PGE_2 -abhängigen Hemmung der Apoptose zu einer Stärkung der Abwehr gegen *Candida albicans* führen [28].

Ein weiteres Problem stellen Diagnose und Therapie dar, da viele Frauen, die an einer chronisch-rezidivierenden Pilzinfektion leiden, zunehmend eine Selbstdiagnose stellen und ohne Erregernachweis aufgrund der ihnen bekannten Symptome in den Apotheken rezeptfreie Antimykotika erwerben.

Dadurch wird eine Zunahme der Imidazol-resistenten Stämme, hier ist vornehmlich *Candida glabrata* zu nennen, befürchtet [55,65].

Deshalb untersuchten wir, ob bei Patientinnen, die an jahrelang rezidivierenden Beschwerden ohne wesentlichem therapeutischem Erfolg leiden, ein allergisches Geschehen Ursache für die Beschwerden sein könnte. Bereits in früheren Studien konnte das Vorkommen allergischer Reaktionen auf *Candida* im Sinne einer lokalen vaginalen hypersensitiven Immunantwort gezeigt werden [57,59,68].

Diese vaginale allergische Antwort kann über eine Induktion der PGE_2 -Produktion zu einer Unterdrückung der CMI führen und so eine rezidivierende Candidainfektion prädisponieren oder zumindest zu einer Verlängerung der Beschwerden führen [31,41,47,48,75]. Außerdem wurden bereits Epitope der Candida-albicans-Enolase, einem wichtigen Antigen der Candida-Allergie, als Bindungsort für IgE-Antikörper entdeckt [31,32]. In diesem Zusammenhang untersuchten wir das Vorhandensein von candidaspezifischem IgE im Vergleich zu der Gesamtmenge an IgE im Vaginalsekret mittels Elisa. Ein weiteres Ziel unserer Studie waren die Bestimmungen der durch Th2-Zellen freigesetzten Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und auch von PGE_2 , ebenfalls im Vaginalsekret mittels Elisa.

Zytokine sind intrazelluläre Signalproteine, die auf parakrine oder autokrine Art wirken. Zytokine überschneiden sich häufig in Ihrer Wirkung, so dass ein einzelner Effekt durch verschiedene Zytokine ausgelöst werden kann, aber auch ein einzelnes Zytokin verschiedene Wirkungen haben kann und somit Teil dieses komplexen Immungeschehens ist [34,77], welches in Abbildung 1 verdeutlicht werden soll.

Übersicht über die humorale und zellvermittelte Immunität

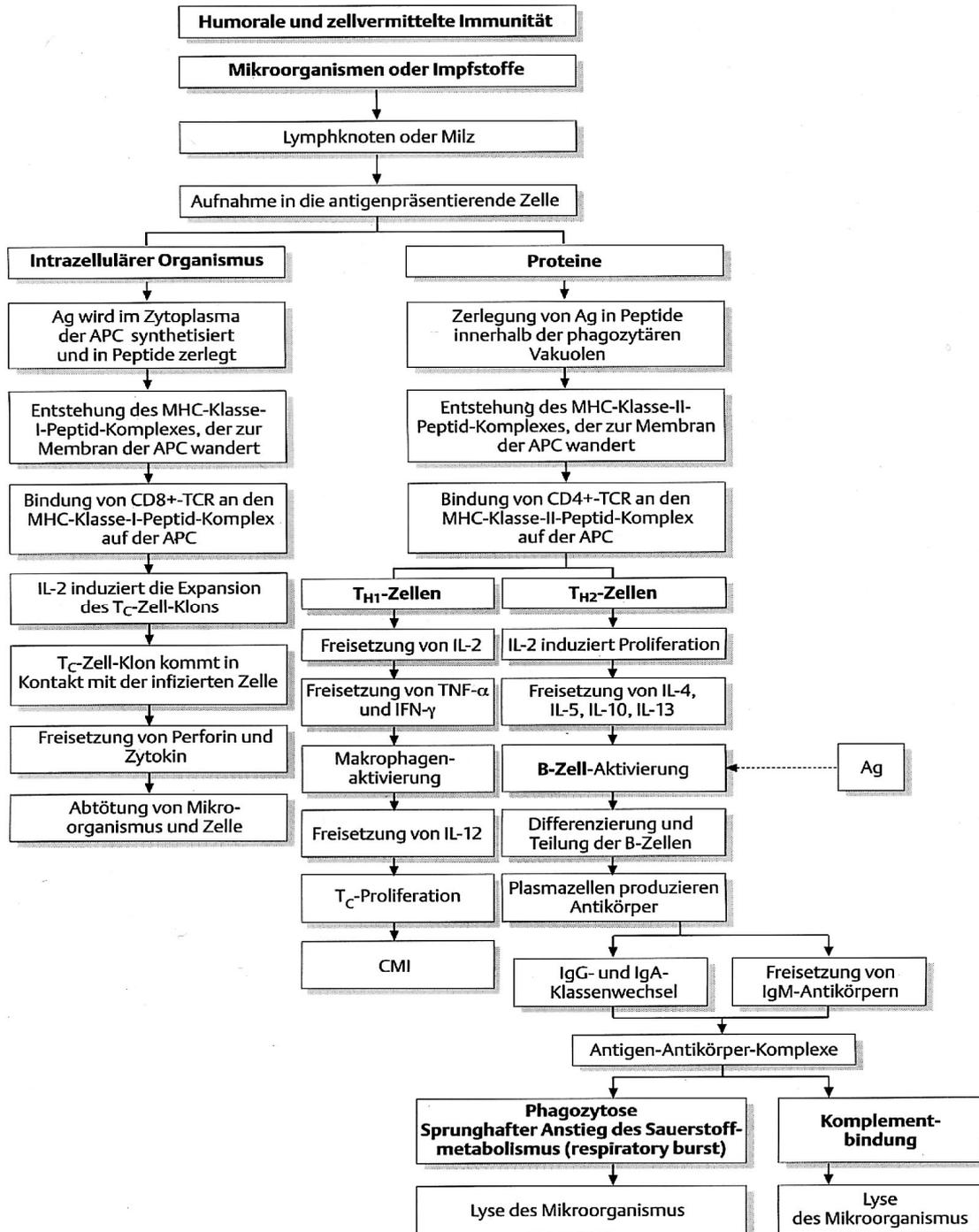


Abb.1

Übersicht über die humorale und zellvermittelte Immunität.

Arthur G. Johnson, Immunologie auf 70 Seiten, Thieme Verlag, Seite 31

Im Folgenden werden die oben genannten untersuchten Zytokine wie auch Prostaglandin E₂ und IgE charakterisiert, um deren Zusammenhang mit einem möglichen allergischen Geschehen sowie deren Bedeutung und Einfluß auf die CMI zu verdeutlichen.

IL-4 und IL-13 spielen bei allergischen Erkrankungen und deren Pathogenese eine wichtige Rolle [33,53], da die IgE-Produktion durch die Zytokine IL-4 und IL-13 stimuliert wird [7].

IL-4 ist ein 20 kDa großes Protein, das die Differenzierung und Proliferation von aktivierten B-Zellen fördert, damit die Synthese von Antikörpern begünstigt und für den Klassenwechsel auf eine Erzeugung von IgE notwendig ist [34,37]. Durch eine Downregulation von IFN-gamma durch Th1-Zellen führt IL-4 zu einer Hemmung der CMI.

Im Weiteren wurden durch IL-4 die durch IL-2 induzierte Aktivierung von NK-Zellen gehemmt und die von IL-2 ausgelösten Effekte in B-Zellen antagonisiert. Ebenso kommt es zu einer Hemmung der in Makrophagen beobachteten Produktion von IL-1, TNF-alpha und von IL-8 [30,34].

Die Wirkung von IL-4 auf B-Zellen wird wiederum von IFN-gamma inhibiert, was die gegenseitige Beeinflussung und komplexen Wirkungen der Zytokine unterstreicht.

IL-13 ist ein Zytokin mit einer Wirkung, die der des IL-4 sehr ähnelt und viele biologische Funktionen mit IL-4 teilt [7,34,78]. Es hat verschiedene Auswirkungen auf die Aktivität menschlicher Monozyten.

IL-13 hemmt die Freisetzung von Th1-Zytokinen und spielt, ebenso wie IL-4, bei einer Infektion mit *Candida albicans* eine wichtige immunmodulatorische Rolle, indem es die candidastatische Funktion von Makrophagen erhöht [9,38]; dies kommt dadurch zustande, dass IL-13 ein wichtiger Regulator der Expression des Makrophagen-Mannose-Rezeptors (MMR) ist, welcher eine wichtige Komponente des Immunsystems im Verteidigungsmechanismus gegen eine Candidainfektion darstellt [10]. So konnte in Versuchen gezeigt werden, dass Makrophagen, die mit IL-13 oder IL-4 in vitro behandelt wurden, eine höhere fungistatische Aktivität aufwiesen als Makrophagen, die über IFN-gamma aktiviert wurden [9].

Das von T-Zellen produzierte IL-5 ist ein spezifischer hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der für das Wachstum und die Differenzierung von Eosinophilen verantwortlich ist und die Proliferation, Aktivierung und Differenzierung eosinophiler Granulozyten stark stimuliert. Somit spielt es eine dominante Rolle bei chronisch

entzündlichen Erkrankungen und kann als Schlüsselzytokin allergischer Prozesse bezeichnet werden [69,80]. IL-5 wirkt synergistisch mit IL-4 und IL-2 bei der Steigerung der B-Zelldifferenzierung und fördert neben der IgA-Synthese auch die Umwandlung von Thymozyten in zytotoxische T-Zellen. Aufgrund dieses Wirkspektrums ergibt sich eine klinische Relevanz dahingehend, dass im Tierexperiment durch die Gabe von Anti-IL-5 Antikörpern eine Infiltration mit Eosinophilen bei bestimmten Infektionen verhindert werden konnte [30,34,69,80].

Neben den bereits erwähnten immunologischen Veränderungen durch die Freisetzung von Th2-Zytokinen sind sicherlich noch einige andere Faktoren für die Entstehung von Rezidiven verantwortlich. Zum einen ist eine veränderte Zusammensetzung der normalen Scheidenflora und damit ein verändertes Scheidenmilieu von Bedeutung. Zum anderen ist aber auch eine Beeinträchtigung der candidaspezifischen CMI durch Prostaglandin oder IgE als Ursache rezidivierender Infektionen wahrscheinlich [41].

Prostaglandin E₂ ist ein durch Makrophagen und Fibroblasten produziertes immunsuppressives Monokin [60], das den Spiegel von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) erhöht und die Auskeimung von *Candida albicans* stimuliert. Auch andere Komponenten, wie Isoproterenol und Dibutyryl cAMP (dB-cAMP), führen zu einer Erhöhung von cAMP und fördern ebenfalls eine Auskeimung von *Candida albicans*[35]. IFN-gamma inhibiert die Auskeimung des Pilzes, interessanterweise auch in Anwesenheit von PgE₂, so dass IFN-gamma eine entgegengesetzte Rolle spielt und die Aktivität der CMI fördert. Durch eine steigende Produktion von Prostaglandin E₂ durch Makrophagen kommt es bei Patientinnen mit rezidivierender Vulvovaginal-Candidose zu einer Hemmung der CMI, was aber auch infolge einer vaginalen allergischen Reaktion auftreten kann. [73,76].

Bei Patientinnen mit CRVVC wurden auch IgE Antikörper gegen *Candida albicans* im Vaginalsekret nachgewiesen, was für eine lokalisierte vaginale Hypersensitivität spricht [73,75]. IgE - dessen Produktion von den Zytokinen IL-4 und IL-13 induziert wird [7,37] - ist ein Mukoprotein mit einem Molekulargewicht von 188 kDa, das an gewebeständige Mastzellen und zirkulierende Basophile über Fcε-Rezeptoren bindet. Die Bindung von Antigenen an IgE-sensibilisierte Zellen triggert die Freisetzung vasoaktiver Amine, vorwiegend Histamine, wodurch es zu Ausbildung einer allergischen Symptomatik kommt [34].

1.2. Fragestellung

Mit dem Ziel einer effektiven und gezielten Behandlung wurden Frauen einer Kontrollgruppe, sowie solche mit Verdacht auf eine CRVVC auf die bereits beschriebenen Immunparameter, sowie auf Candida im Vaginalsekret untersucht. Dies geschah mittels lichtmikroskopischer Untersuchung, kultureller Anzucht und Polymerasekettenreaktion (PCR), wobei die Candidaspezifizierung mittels Chromagar und PCR vorgenommen wurde.

Im Folgenden werden die Zytokine IL-4, IL-5, IL-13, als auch PgE_2 , Gesamt-IgE und das candidaspezifische IgE untersucht, um deren Zusammenhang mit einem möglichen allergischen Geschehen sowie deren Bedeutung und Einfluß auf die CMI zu verdeutlichen. Mögliche neue therapeutische Ansätze und Behandlungsmöglichkeiten sowie die Modifizierungen bereits bestehender Behandlungskonzepte werden ausführlich in Kapitel 5 (Diskussion) behandelt.

2. Material und Methode

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Gelelektrophoreseapparatur, Typ HE 33	Hoefer, San Francisco, CA /USA
Spannungsquelle, Typ EPS 500/400	Pharmacia LKB, San Francisco, CA / USA
Pipetten, Filter-Tips PE/PP	Nerbe plus GmbH, Winsen / Luhe, Deutschland
Thermocycler, Typ 9600	Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut / USA
Tischzentrifuge, Typ Z 230 MR	Hermle, Deutschland
Spektralphotometer, Typ Anthos	Anthos Labtec Instruments Österreich
Polaroidkamera, Typ GelCam	UniEquip, München-Martinsried, Deutschland
UV-Leuchtkasten, Typ N 90	UniEquip, München-Martinsried, Deutschland
Vortexgerät, Typ VF 2	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Deutschland

Wasserbad, Typ B3	Haake
Brutschrank, Typ 2770	Köttermann
Mikrowellengerät, Typ MC 653	Udo Classen G.m.b.H, Kempen, Deutschland
Plattenvortexgerät, Typ 301 EVT	A-B Laborsystem, Greiling Deutschland

2.1.2. Material

Die für die PCR verwendeten Chemikalien wie Enzyme und Puffer wurden vorwiegend von den Firmen Sigma, St. Louis, Missouri / USA, Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey / USA und Biolabs, Beverly, MA / USA bezogen. Die Lösungen, Enzyme und Puffer werden dann üblicherweise mit Aqua ad injectabilia (Aqua a.i.), geliefert von Boehringer, Mannheim / Deutschland, angesetzt.

Die Primer für die PCR stammten von GibcoBRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD / USA.

Die für die IL-4, IL-5 und IL-13-Elisa benötigten Materialien wurden von Biosource International, Camarillo, CA / USA, die für die Prostaglandin-E2-Elisa verwendeten Materialien wurden von Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI / USA geliefert.

Den ELISA-Testansatz zur Bestimmung der Gesamt-IgE-Konzentration bezogen wir von der Firma Euroimmun – Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck / Deutschland, den Testansatz zur Bestimmung des candidaspezifischen-IgE von der Firma Alerchek, inc., Portland, Maine / USA.

Die Materialien einschließlich Chemikalien, Enzyme, Lösungen und Puffer werden im Rahmen der methodischen Kapitel besprochen und deren Zusammensetzung dort erläutert.

2.2 Patientinnen

2.2.1 Studiengruppe

In der mikrobiologischen Sprechstunde des Klinikums Großhadern wurden 104 Patientinnen mit mindestens vier pro Jahr auftretenden Episoden einer Candidasymptomatik und somit chronisch rezidivierender Candidosen untersucht. Charakteristisch waren Angaben wie Brennen, Jucken, Ausfluss und Erytheme. Sowohl klinisch als auch anamnestisch wurden andere Erkrankungen infektiologischer Genese wie z.B. Herpesvirus- und humane Papillomavirus-Infektionen oder bakterielle Vaginose, aber auch Schwangerschaft, Menopause und Postmenopause ausgeschlossen.

Als Kontrollgruppe dienten 41 asymptomatische Patientinnen ohne Vulvovaginitis ,oder anderen gynäkologischen Infektionen, die meist zur jährlichen Routineuntersuchung in die Sprechstunde kamen. Der Großteil an Untersuchungsproben der Kontrollpatientinnen wurde in der Praxis von Dr. Karin Schulze gewonnen, da in der Sprechstunde des Klinikums Großhadern vorwiegend nur „Problemfälle“, also Patientinnen mit chronischen Pilzbeschwerden oder anderen Erkrankungen infektiologischer Genese, vorstellig wurden. Das Durchschnittsalter der Candidosepatientinnen lag bei 33,6 (Alter 19 bis 56), das der Patientinnen der Kontrollgruppe bei 32,8 (Alter 19 bis 53).

Anamnestisch wurden neben der Symptomatik auch prädisponierende Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, und prädisponierende Faktoren, wie die Einnahme von Immunsuppressiva oder Antibiotika erhoben. Auch Allergien, Nikotinabusus, Kontrazeption, bisher verwendete Antimykotika und deren therapeutischer Erfolg sowie gynäkologische Operationen wurden erfasst. Ein wichtiges Kriterium in Bezug auf eine antimykotische Therapie war die Feststellung der letzten Antimykotikaeinnahme, die wenigsten vier Wochen zurückliegen sollte. Dadurch wurde gewährleistet, dass bei keiner der Patientinnen ein noch wirksamer Antimykotikumspiegel im Blut vorhanden war, der den Pilznachweis sowohl kulturell als auch mittels PCR in den meisten Fällen erschwert oder verhindert hätte.

2.2.2. Vaginalabstriche

Bei jeder Patientin wurden insgesamt drei Vaginalabstriche vom hinteren Scheidengewölbe mit geprüften Watteträgern abgenommen. Der erste wurde vor der Inokulation auf Sabouraud-agar in ein Röhrchen mit Sabouraud-Flüssigmedium (bioMerieux, Marcy l`Etoile / Frankreich) gegeben. Einen weiteren, in ein Spezialtransportmedium (Medical Wire & Equipment co.Ltd., Corsham, Wilts. / England) getauchten Abstrich schickten wir zur Bestimmung der vaginalen Begleitflora in das Mikrobiologische Labor der Klinik.

Den dritten Watteträger strichen wir auf einem Objektträger aus und fixierten mit Alkohol (Merckofix Fixationsspray für die Diagnostik, Merck, Darmstadt) damit das zytologische Zellbild im entsprechenden Routinelabor der Klinik bestimmt werden konnte.

Im weiteren wurden 2ml 0,9 prozentige physiologische Kochsalzlösung (NaCl) mittels einer 3ml Spritze in die Vagina eingebracht. Mit einem vierten Watteträger wurde die eingebrachte Kochsalzlösung mit dem Vaginalsekret im hinteren Scheidengewölbe kurz durchmengt, mit derselben Spritze wieder aufgenommen und noch am gleichen Tag wie folgt verarbeitet: Die Spritzen wurden kurz gevortext und das Material anschließend zu je 1ml auf zwei Eppendorfreaktionsgefäße verteilt, im folgenden nochmals kurz gevortext, anschließend bei 5000 rounds per minute (rpm) zwei Minuten lang zentrifugiert und schließlich der Überstand abpipettiert und in sterilen Eppendorfgefäßen aliquotiert. Der so gewonnene Überstand wurde zum Nachweis von Zytokinen, Prostaglandin E₂, candidaspezifischem IgE und der Bestimmung des Gesamt-IgE`s verwendet.

Das Sediment, welches dem Nachweis von *Candida albicans* und *Candida glabrata* mittels PCR diente, wurden mit 0,5ml PBS resuspendiert und im Falle einer Verzögerung bei -75°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.3. Kulturen

2.3.1. Material

a) Sabouraud-Agarplatten

Firma bioMerieux, Marcy l'Etoile / Frankreich, versetzt mit Gentamycin (0,1 g/l) und Chloramphenicol (0,05 g/l).

b) Chromagarplatten

Becton Dickinson, Sparks / USA
BBL Chromagar™ Candida.

2.3.2. Anlegen von Pilzkulturen

Der erste, in den Sabouraud-Flüssig-Agar getauchte Watteträger wurde 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, am folgenden Tag die Zellen auf Sabouraud-Agarplatten überimpft, um diese für weitere 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C zu inkubieren. Um eine mögliche Verunreinigung oder Austrocknung zu vermeiden, verschlossen wir die Platten mit Klebestreifen luftdicht. Im Falle eines positiven Kulturergebnisses erfolgte anschließend zur weiteren Candidaspezifizierung eine Überimpfung der Pilzkolonien mit einer sterilen Öse von der Sabouraud-Agarplatte auf eine Chromagarplatte, die immer im Dunklen aufbewahrt werden musste. Nach einer Inkubationszeit des Chromagars von wenigstens 24 Stunden konnte durch unterschiedliche und für die jeweilige Candida-Spezies typische Farbreaktion eine Identifizierung der verschiedenen Candida-Stämme erfolgen.

Die jeweiligen Farbreaktionen kommen durch Hydrolyse von chromogenen Substraten des CHROMagars zustande. Die Candidaspezies wurde durch folgendes Farbschema identifiziert:

Spezies	Farbe
Candida albicans	grün
Candida glabrata	rosa
Candida tropicalis	blau
Candida krusei	hellrosa

2.4. DNA-Freisetzung

2.4.1. Material

Aqua ad injectabilia

Zusammensetzung der Lytikaselösung

0,5 M EDTA		Sigma, St.Louis, Missouri / USA
PBS	1,6ml	Life Technologies, Paisley / Scotland
2 %-iges 2-Mercaptoethanol		Sigma, St.Louis, Missouri / USA
Lytikase	1mg	Sigma, St.Louis, Missouri / USA

Zusammensetzung des Nonionic Detergent Puffer (NID Puffer):

KCL	50 mM	Sigma, St. Louis, Missouri / USA
Tris-HCL pH 8,3	10 mM	Sigma, St. Louis, Missouri / USA
MgCL ₂	2,5 mM	Sigma, St. Louis, Missouri / USA
Polyoxyethyl- enlaurylether	0,4g	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland

Lysis Puffer Roche Dioagnostics, Branchburg,
New Jersey / USA

Mineralöl Applied Biosystems

PBS Life Technologies, Paisley / Scotland

Proteinase K 5,0 mg/ml Sigma, St. Louis, Missouri / USA
Aqua a.i.

2.4.2. DNA-Extraktion

Die Spritzen mit dem Probenmaterial (siehe Kapitel 2.2.2.) wurden gevortext, anschließend wurden jeweils 1 ml auf zwei Eppendorfgefäße verteilt, abzentrifugiert (2 Minuten bei 5000 rpm) und der Überstand zur Interleukinbestimmung abpipettiert. Zu dem Sediment des ersten Eppendorfgefäßes wurde PBS hinzugegeben, damit es zu einem späteren Zeitpunkt bearbeitet werden konnte, dem zweiten Gefäß steriles Wasser hinzugefügt und die Probe einmal gewaschen, indem sie gevortext, anschließend zentrifugiert und der Überstand abpipettiert wurde. Um die Zellwände der Pilzzellen aufzubrechen, erfolgte nach dem letzten Dekantieren eine Resuspension mit 100 µl Lytikase und eine Inkubation für 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad.

Analog zu dem bereits im obigen Absatz beschriebenen Waschvorgang, folgten zwei weitere Waschvorgänge mit PBS. Zu dem Sediment wurden 200 µl CT/NG Lysis in die Eppendorfgefäße hinzugegeben und für zehn Minuten stengelassen, um die in der Probe vorhandenen Zellen und deren Zellwände zu spalten. Im Gegensatz zur Lytikase, die spezifisch Candidazellwände spaltet, verursacht Lysis-Puffer eine unspezifische Spaltung von anderen, sich in der Probe befindlichen Zellen. Nach der Zentrifugation der Proben für 10 Minuten bei 11000 rpm und abpipettieren des Überstandes wurde nochmals PBS hinzugegeben und für 5 Minuten bei 11000 rpm abermals zentrifugiert und anschließend abpipettiert. Der Abbau der zellulären Proteine und die Inaktivierung dadurch freigesetzter zellulärer Nukleasen erfolgte durch Behandlung mit 10 µl Proteinase K in 240 µl Nonionic Detergent (NID) Puffer. Dies ist notwendig um im Vaginalsekret vorkommende Proteine zu zerstören, durch welche die PCR erheblich gestört werden kann. Die Proben wurden im Anschluß 10 Sekunden bei 8000 rpm zentrifugiert und nach Zugabe von 1 Tropfen Mineralöl im Thermocycler 1 Stunde bei 56°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K durch Erhitzung der Proben im Thermocycler bei 95°C für 10 Minuten.

Die Herstellung einer positiven Kontrolle erfolgte wie oben beschrieben, wobei jeweils von einer *Candida albicans*- und einer *Candida glabrata* Kultur-Pilzmaterial in ein jeweils mit 0,5ml PBS gefülltes Eppendorfgefäß gegeben wurde.

2.5. Candida PCR

Die Methode der PCR ermöglicht durch die Amplifikation von nur geringen Mengen an pilzspezifischer DNA einen raschen und sensitiven Nachweis von Candida und, im Vergleich zu einem kulturellen Nachweis, einen schnelleren und sensitiveren Weg zur Diagnose.

2.5.1. Material

DNA-Polymerisationsmix:

Perkin Elmer, Branchburg,
New Jersey / USA

MgCl₂ 25mM

Desoxynukleosid-
triphosphate (dNTP),
(dATP, aTTP, dGTP und dCTP) 10mM

PCR-Primer:

Life Technologies,
Paisley, Scotland

10X PCR-Puffer (pH 8,3):

Perkin Elmer, Branchburg,
New Jersey/USA

KCl 500mM

Tris-HCl 100mM

MgCl 15mM

Gelatine 0,01% (w/v)

Taq-Polymerase:

5 U/μl

Perkin Elmer, Branchburg,
New Jersey/USA

Zusammensetzung des dNTP-Mixes:

dATP, dCTP, dGTP und dTTP

Perkin Elmer, Branchburg,
New Jersey/USA

2.5.2. Candida-Primer

Die für die PCR verwendeten synthetischen Oligonukleotide waren die Primer P450₁ und P450₂ und wiesen folgende Sequenzen auf:

P450₁ : Basenpaare 1021 – 1043: 5`-ATGACTGATCAAGAAATYGCTA-3`

P450₂ : Basenpaare 1370 – 1351: 5`-TAACCTGGAGAAACYAAAAC-3`

Beide, in Pulverform gelieferte Primer, wurden vor Durchführung der PCR in sterilem Wasser aufgelöst und anschließend mit ebenfalls sterilem Wasser in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt.

2.5.3. Durchführung der PCR

Jede PCR wurde mit zwei positiven und einer negativen Kontrolle durchgeführt. Die beiden positiven Kontrollen wurden wie bereits beschrieben hergestellt. Diese bestanden aus Pilzkulturen von *Candida albicans* und *Candida glabrata*. Als negative Kontrolle benutzten wir steriles Wasser. Der bei der Durchführung der PCR verwendete DNA-Polymerisationsmix diente zur Sicherstellung, dass die Mischung von Wasser, Primern, Puffer, NTP-Mix, Polymerase und MgCl₂ bei allen Reaktionspartnern konstant war, besonders in Hinblick auf die sehr kleinen zu pipettierenden Volumina von weniger als 10 µl.

Der bei der PCR verwendete Polymerisationsmix wurde nach folgendem Protokoll erstellt:

Reagenzien:	Volumina in µl
H ₂ O	6,75
NTP	8,0
10X-Puffer	5,0
MgCl ₂	3,0
Primer 1 1:10 Verdünnung	1,0
Primer 2 1:10 Verdünnung	1,0
Taq-Polymerase	0,25

Die Summe der Volumina ergab damit 25 µl; diese wurde mit der Zahl der zu bearbeitenden Proben multipliziert, wobei die zwei Positiv-Kontrollen und eine Negativ-Kontrolle mit einberechnet werden mussten, so dass – als Fallbeispiel – bei sieben zu bearbeitenden Proben inklusive der Kontrollen die jeweiligen zu pipettierenden Volumina mit dem Faktor zehn multipliziert werden konnten.

Zur Durchführung der PCR wurden nun jeweils 5µl der zuvor extrahierten Patienten-DNA mit 20 µl Wasser in ein Eppendorfgefäß gegeben; die negative Kontrolle bestand aus 25 µl sterilem Wasser. Somit befand sich in jedem Eppendorfgefäß ein Volumen von insgesamt 25µl, das nun mit 25µl des Polymerisationsmixes vermischt wurde, wodurch sich ein Reaktionsansatz von 50µl ergab. Dieser durchlief insgesamt 40 ablaufende Zyklen:

Zeit	Temperatur	PCR-Schritt
10 min.	94°C	Denaturierung
1 min.	49°C	Anlagerung der Primer
1,5 min.	72°C	Verlängerung der Primer

Am Ende des letzten Zyklus wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt.

2.5.4. Enzymatisches Schneiden der DNA

2.5.4.1 Material

Nsi I-Restriktionsendonuklease	New England Biolabs Schwalbach/Taunus, Deutschland
--------------------------------	---

2.5.4.2. Durchführung

Um durch enzymatisches Schneiden der Candida DNA candidaspezifische Banden zu verifizieren, wurden die Proben mit dem Enzym Nsi I-Restriktionsendonuklease für 12 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die verschiedenen Spezies konnten so aufgrund der Länge der Basenpaare bestimmt werden.

2.6. Gelelektrophorese

2.6.1. Material

Agarose
Carl Roth GmbH,
Karlsruhe, Deutschland

10XTBE (Tris Boric EDTA) 25ml
Carl Roth GmbH,
Karlsruhe, Deutschland

Tris-Borat (pH 8,3) 1 M
EDTA 20mM
Deionisiertes Wasser

1XTE
Carl Roth GmbH,
Karlsruhe, Deutschland

Tris-HCl 5ml
EDTA 1ml
Aqua a.i. 494 ml

DNA-Auftragspuffer
Carl Roth GmbH,
Karlsruhe, Deutschland

Färbelösung
Ethidiumbromid
(1%)
Carl Roth GmbH,
Karlsruhe, Deutschland

DNA-Längenstandard
Hae III Digest
New England Biolabs,
Schwalbach/Taunus,
Deutschland

2.6.2. Durchführung

Der Beurteilung des PCR-Produkts diene die Agarose-Gelelektrophorese. Zur Herstellung eines 1,5%-igen Agarosegels wurden 25ml 1XTBE mit 37,5g Agarose in einem Erlenmeyerkolben vermischt und anschließend in einer Mikrowelle für ca. 1 Minute erhitzt, so dass sich das Agarosepulver vollständig auflösen konnte und die Lösung klar wurde. Nach kurzer Abkühlphase erfolgte zur Färbung der Probenbanden die Zugabe von 3µl Ethidiumbromid (1%) zum Gel, um es anschließend in flüssigem Zustand in die Gelkammer zur Aushärtung zu gießen. Als nächster Schritt folgte das Einbringen des Gelkamms, um die Vertiefungen für Standard und Proben zu erzeugen. Nach 10 Minuten war das Gel soweit erhärtet, dass die Schablone wieder vorsichtig entfernt und das fertige Gel aus der Gelkammer in das Elektrophoresegerät eingelegt werden konnte und anschließend gerade soviel 1XTE-Puffer hinzugegeben wurde bis das Gel bedeckt war.

Zur Herstellung der Standardlösung wurden 9µl 1XTE-Puffer, 2µl DNA-Auftragspuffer und 0,2µl DNA-Längenstandard vermischt, wovon 9µl in die Vertiefungen des Gels pipettiert wurden. 2µl Bromphenolblaulösung wurden mit jeweils 9µl der Proben versehen und hiervon ebenfalls 9µl in die dafür vorgesehenen Vertiefungen gegeben. Bei einer Stromstärke von 120 mA und einer Spannung von 300V liefen die Banden zwischen 15-20 Minuten, bis die Hälfte der Laufstrecke zurückgelegt war.

Der entstandene Ethidiumbromid-DNA-Komplex wurde unter UV-Licht bei 302nm visualisiert und mittels Polaroidkamera dokumentiert (siehe Abbildung 8, Kapitel 4.1.4 PCR).

3. Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)

Da sich die Testansätze zur Bestimmung der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 in ihrer Durchführung nur wenig unterschieden, werden Sie im Folgenden gemeinsam abgehandelt. Die Elisa-Ansätze für Prostaglandin E₂, candidaspezifisches IgE und Gesamt-IgE müssen hingegen getrennt voneinander besprochen werden.

3.1. Material

Den zur IL-4, IL-5 und IL-13-Bestimmung verwendeten Elisa-Kit bezogen wir von Biosource International, Camarillo, CA / USA (Cytoscreen™ Immunoassay Kit # KHC 0042, KHC 0082), die für die Prostaglandin E₂ Bestimmung verwendeten Materialien von Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI / USA.

Der Elisa Testsatz zur Bestimmung der Gesamt-IgE-Konzentration im Vaginalsekret wurde von Euroimmun – Medizinische Labordiagnostika-AG, Lübeck / Deutschland geliefert, der Testsatz zur Bestimmung des candidaspezifischen IgEs kam von der Firma ALerCHEK, inc., Portland, Maine / USA.

3.2. IL-4, IL-5 und IL-13 ELISA

3.2.1. Reagenzien zur Bestimmung der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13

- Humanes Interleukin (h-IL)-4, h-IL-5 und h-IL-13 Standard
- Puffer zu Verdünnung des Standards
- h-IL-4, h-IL-5 und h-IL-13 Biotin Konjugat
- Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- Stabilisiertes Chromogen
- Lösung zur Verdünnung der Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- Gepufferte Waschlösung (25 x Konzentrat)
- Stopplösung
- Mikrotiterplatte, Ligand-beschichtet, 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 Reagenzgefäßen
- Klebestreifen

3.2.2. Herstellung der Standardverdünnungsreihe

Da der Standard zur Bestimmung der Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13 von der Firma Biosource in Form von Pulver geliefert wurde, musste zur Herstellung der Standardlösung das Pulver mit der jeweils vorgeschriebenen Menge an Standardpuffer aufgelöst werden, was für jedes Interleukin unterschiedlich war und im folgenden beschrieben wird.

3.2.2.1 Humanes IL – 4-Standard

Zunächst musste der Standard mit 1,140ml Standardpufferlösung aufgelöst werden, wodurch sich eine Konzentration von 10.000 pg/ml ergab. Anschließend wurde in insgesamt acht Eppendorfgefäßen eine Standardverdünnungsreihe hergestellt. Hierzu erfolgte eine Mischung von 0,050 ml des aufgelösten Standards mit 0,950 ml Puffer, so dass eine Standardlösung mit einer Konzentration von 500 pg/ml entstand. Daraufhin erfolgte eine weitere Mischung von je 0,300 ml der vorangehenden Standardkonzentration mit je 0,300 ml Verdünnungspuffer, wobei das letzte Eppendorfgefäß ausschließlich Standardpuffer enthielt. Somit wurden folgende Standardkonzentrationen (pg/ml) hergestellt: 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 0

3.2.2.2. Humanes IL-5-Standard

Im Falle des IL-5 wurde das Standardpulver mit 1.500ml Standardpuffer aufgelöst und eine Standardlösung mit einer Konzentration von 7500 pg/ml hergestellt, wovon 0,100 ml in 0,900 ml Standardverdünnungspuffer gegeben wurde. Somit erhielten wir eine Verdünnung in einem Verhältnis von 1:10. Die Herstellung der Verdünnungsreihe erfolgte wie oben bei IL-4 beschrieben, wodurch sich folgende Konzentrationen (in pg/ml) ergaben: 750, 375, 187.5, 93.7, 46.8, 23.4, 11.7, 0.0

3.2.2.3. Humanes IL – 13-Standard

Das Standardpulver von IL-13 musste mit 1,550 ml Standardpuffer verdünnt werden, um dadurch eine Standardlösung mit einer Konzentration von 10,000 pg/ml zu bekommen. In diesem Falle mussten 0,150 ml des aufgelösten Standards mit 0,450ml Standardpuffer verdünnt werden (Verhältnis von 1:4). So ergab sich eine Konzentration von 2500 pg/ml. Die Herstellung der Verdünnungsreihe erfolgte ebenfalls, wie bereits beschrieben mit dem Ergebnis folgender Konzentrationen (in pg/ml) der Standardreihe: 2500, 1250, 625, 312, 156, 78.1, 39.1, 0.0

3.2.3. Streptavidin – Peroxidase (IL – 4, IL-5 und IL – 13)

Für jede Reihe Mikrotiterstreifen wurden 10 µl des 100x Streptavidin-HRP-Konzentrats mit 1 ml des entsprechenden Puffers verdünnt; so benötigte man z.B. für drei Reihen 30 µl des 100x Streptavidin-HRP-Konzentrats, das mit 3 ml des Streptavidin-Puffers gemischt wurde.

3.2.4. Gepufferte Waschlösung (IL – 4, IL-5 und IL – 13)

Die gepufferte Waschlösung wurde 25-fach konzentriert geliefert und musste dementsprechend vor Gebrauch mit 24 Einheiten destillierten Wassers gemischt werden.

3.2.5. Durchführung

Die Durchführung des Elisa für die Interleukine 4, 5 und 13 erfolgte analog nach dem gleichen Prinzip; auf Abweichungen wie z.B. Inkubationszeiten oder auch Volumina wird im Folgenden hingewiesen. Je nach Zahl der zu bearbeitenden Proben wurde die entsprechende Anzahl von Mikrotiterstreifen zu je acht Mikroküvetten vorbereitet, um dann jeweils 100 µl an Proben und Standard in die jeweils dafür vorgesehenen Küvetten zu pipettieren. Im Falle des IL-5-Elisa unterschied sich die Durchführung

dahingehend, dass nun direkt im Anschluss die Elisa-Platte mit einem Klebestreifen bedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurde. IL-4 und IL-13 hingegen mussten vorher noch mit je 50 µl Biotin-markiertem Anti-IL-4 bzw. Anti-IL-13 Antikörper versetzt, dann ebenfalls mit einem Klebestreifen bedeckt und bei Raumtemperatur inkubiert werden. IL-4 wurde für zwei Stunden inkubiert, IL-13 für eine Stunde und dreißig Minuten. Der Testansatz für IL-5 wurde nach Zugabe von Proben und Standard und der angegebenen Inkubationszeit von zwei Stunden gewaschen. Hierzu gaben wir viermal in Folge 0,4 ml verdünnte Waschlösung in die jeweiligen Reagenzgefäße von Proben und Standard. Anschließend klopfen wir die Mikrotiterplatte umgedreht auf einem saugfähigen Fließpapier vorsichtig aus, um die Reste der Waschlösung vollständig zu entfernen. Im nächsten Schritt mussten die Mikroküvetten mit 100 µl Biotin-markierten Anti-IL-5 Antikörpern versetzt und für weitere dreißig Minuten inkubiert werden. Die folgenden Schritte des Testansatzes waren ab diesem Zeitpunkt für alle drei Interleukine wieder analog durchzuführen. Zunächst wurden die Mikrotiterplatten – wie bereits oben für IL-5 beschrieben - viermal gewaschen, um nicht gebundene Antikörper aus den Vertiefungen zu entfernen. Im Anschluss pipettierten wir 100 µl des Enzyms Streptavidin-Peroxidase, das für die Farbreaktion verantwortlich ist, hinzu, deckten wieder mit Klebestreifen ab und inkubierten für 30 Minuten (IL-4, IL-5) bzw. für eine Stunde (IL-13). Nach vier weiteren Waschvorgängen mussten schließlich jeweils 100 µl TMB- (Tetramethylbenzidine)-Substratlösung hinzupipettiert werden um die gewünschte blaue Farbreaktion hervorzurufen. Im Anschluss wurden die Platten für etwa 25 Minuten im Dunklen inkubiert, wobei angemerkt werden muss, dass die Inkubationszeit nicht fest vorgeschrieben war, sondern von dem, in dem Labor jeweils verwendeten Photometer und dessen oberer Messgrenze bezüglich der optischen Dichte abhängig zu machen war. Um die Farbreaktion zu beenden, wurden pro Mikroküvette 100 µl Stopplösung hinzugefügt, so dass ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgte und schließlich die optische Dichte mittels Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 492 nm ermittelt werden konnte.

3.2.6. Auswertung der Messergebnisse

Die zur Berechnung der Konzentration von IL-4, IL-5 und IL-13 nötige Standardkurve wurde mittels der Computerprogramme SPSS und Excel von Microsoft erstellt.

Hierzu wurden die Standardkonzentrationen, die jeweils einer über photometrische Bestimmung ermittelten optischen Dichte zugeordnet werden konnten in SPSS eingegeben, wodurch ein Mittelwert der optischen Dichte (OD) im Vergleich zur gemessenen OD errechnet wurde (Abb3).

1	2	3	4	5	6
konz	dichte	fit_1	err_1	lcl_1	ucl_1
0,00	0,121	0,1077	0,01335	0,0613	0,15400
11,70	0,124	0,1397	0,01566	0,09541	0,18391
23,40	0,171	0,1720	0,00095	0,12891	0,21499
46,80	0,231	0,2373	0,00632	0,19467	0,27997
93,70	0,387	0,3708	0,01615	0,32533	0,41636
187,50	0,635	0,6429	-0,00790	0,59419	0,69162
375,00	1,168	1,167	0,00142	1,1119	1,22131
750,00	1,812	1,812	-0,00008	1,7569	1,86725

Abbildung 3: Beispiel für das Fenster zur Dateneingabe in SPSS

(Standardkonzentrationen und Dichte einer IL-5-Messung mit den von SPSS errechneten Werten)

- Spalte 1: Konzentrationen der Standardkurve
- Spalte 2: Photometrisch gemessene optische Dichte
- Spalte 3: Mittels SPSS errechneter Wert
- Spalte 4: Abweichung vom tatsächlich gemessenen Wert
- Spalte 5: Untergrenze des Konfidenzintervalls
- Spalte 6: Obergrenze des Konfidenzintervalls

Des Weiteren mussten die gemessene optische Dichte als abhängige Variable und die Konzentration als unabhängige Variable eingegeben werden. Somit konnte mittels einer kubischen Gleichung $[f(x)=a_0 + a_1x + a_2x^2 + a_3x^3]$ über eine Kurvenanpassung die Standardkurve ermittelt werden. Die sich hieraus ergebende Konstante und die Variablen wurden daraufhin in Excel eingegeben, wodurch aufgrund der gemessenen optischen Dichte die jeweiligen Konzentrationen in pg/ml abgelesen werden konnten. Da sich die Standardkurven von IL-4, IL-5 und IL-13 ähnlich sind, wird zur Veranschaulichung eine Standardkurve von IL-5 als Beispiel herausgenommen (Abb. 4).

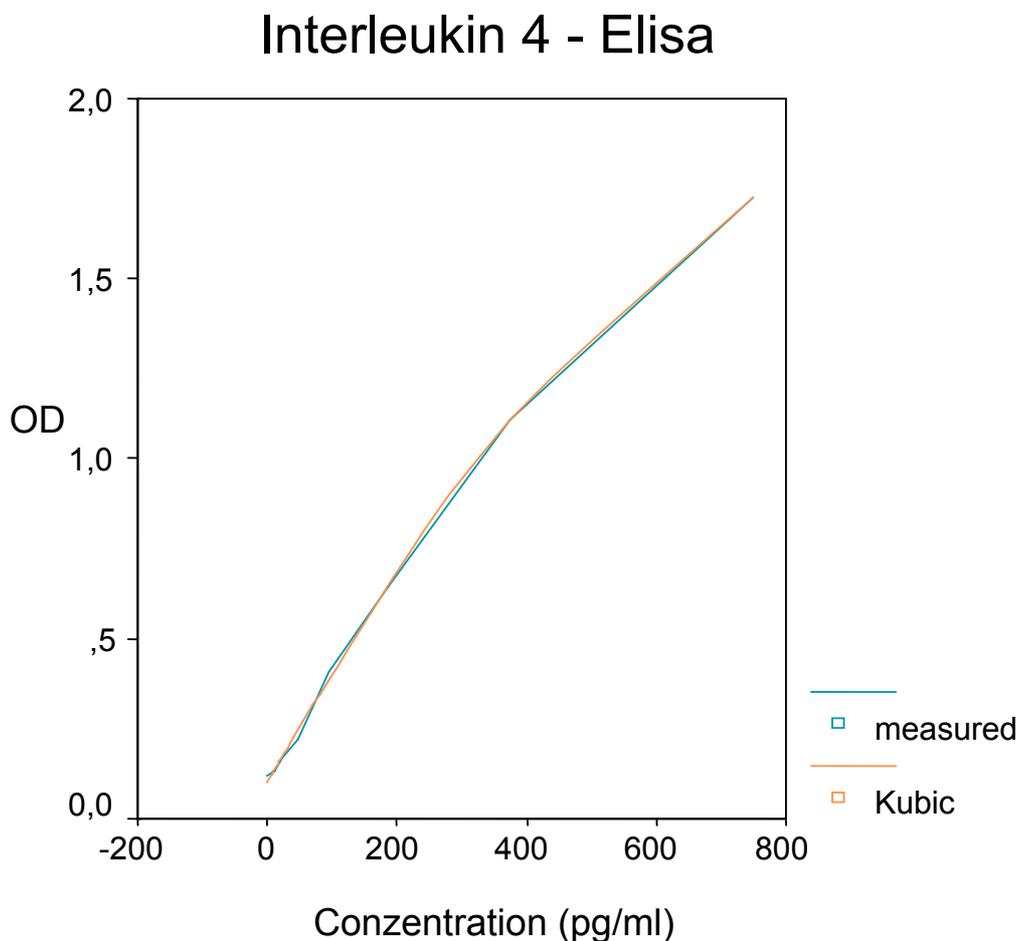


Abbildung 4: Beispiel einer Standardkurve (für IL-5)

(Y-Achse: optische Dichte, X-Achse: Konzentration)

3.3. Prostaglandin E₂-ELISA

3.3.1. Reagenzien zur Bestimmung von Prostaglandin E₂

- Humanes Prostaglandin E₂ Standard
- Puffer zur Verdünnung des Standards
- Prostaglandin E₂ Antikörper
- Prostaglandin E₂ Konjugat
- Stopplösung
- Mikrotiterplatten, Ligand-beschichtet, bestehend aus je 12 Streifen zu 8 Bestimmungen
- Gepufferte Waschlösung (10 x Konzentrat)
- P-Npp Substrat
- Klebestreifen

3.3.2. Herstellung der Prostaglandin E₂-Standardverdünnungsreihe

Im Gegensatz zu den Testansätzen der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 wurde von der Firma Assay Designs ein bereits gebrauchsfertiger Standard mit einer Konzentration von 50.000 pg/ml geliefert, der bei -25°C aufbewahrt werden, jedoch vor der Durchführung des Elisa Zimmertemperatur erlangen musste.

Es wurden acht Eppendorfgefäße vorbereitet. Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurden 100 µl des 50.000 pg/ml Prostaglandin E₂ – Standards mit 900 µl des Standardpuffers gemischt, woraus sich eine Standardkonzentration von 5000 pg/ml ergab. Im Folgenden wurden je 500 µl Verdünnungspuffer mit 500 µl der jeweils vorherigen Standardkonzentration gemischt, wodurch sich folgende Standardkonzentrationen (pg/ml) ergaben: 5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1.

3.3.3. Gepufferte Waschlösung

Die gepufferte Waschlösung wurde 10-fach konzentriert geliefert und musste somit, je nach benötigter Menge, in einem Verhältnis von 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt werden.

3.3.4. Durchführung

Auch hier mussten je nach Anzahl der zu bearbeitenden Proben Mikrotiterstreifen zu je acht Mikroküvetten vorbereitet werden.

Anfangs wurden je 100 µl Proben und Standard in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert und anschließend zuerst blaues PgE₂-Konjugat in jedes Reagenzgefäß hinzugegeben und schließlich noch jede Mikroküvette mit 50 µl PgE₂-Antikörpern versetzt, bevor die Elisa-Platte mit einem Klebestreifen abgedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Im Falle des PgE₂-Testansatzes geschah dies auf einem Plattenvortexgerät bei 500 rpm.

Nach zwei Stunden und erfolgter Dekantierung wurde die Platte insgesamt dreimal mit je 400 µl Waschlösung gewaschen, um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen, die Mikrotiterplatte im Folgenden zur Entfernung von Resten der Waschlösung mit den Öffnungen nach unten auf einem saugfähigem Papier (z.B. Küchenpapier oder Fließpapier) vorsichtig ausgeklopft.

Um die erwünschte Farbreaktion zu starten, wurden nach dem Waschvorgang 200 µl p-Npp-Substratlösung in jede Vertiefung pipettiert und bei Raumtemperatur 45 Minuten lang ohne Plattenvortexgerät inkubiert. Im Gegensatz zur IL-4, IL-5 und IL-13-Elisa musste dieser Schritt nicht im Dunklen erfolgen. Die Farbreaktion unterschied sich dahingehend, dass die Farbintensität sowohl in den Proben als auch im Standard indirekt proportional zur PgE₂ – Konzentration war. Nachdem 50 µl Stop-Lösung in jedes Reagenzgefäß hinzupipettiert wurden, konnte die optische Dichte bei 405 nm mit einer Korrektur von 492 nm im Spektralphotometer abgelesen werden.

3.3.5. Auswertung der Messergebnisse

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte analog zu der Auswertung der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 mittels SPSS von Microsoft.

Wie oben bereits erwähnt, war die Farbintensität jedoch indirekt proportional zur PgE_2 -Konzentration, so dass die OD bei niedriger Konzentration hoch war (Abb. 5).

1	2	3	4	5	6
konz	dichte	fit_1	err_1	lcl_1	ucl_1
39,10	0,565	0,59060	-0,02560	0,51100	0,67021
78,10	0,527	0,52446	0,00254	0,44896	0,59995
156,00	0,510	0,45831	0,05169	0,38569	0,53093
313,00	0,390	0,39174	-0,00174	0,32061	0,46287
625,00	0,317	0,32562	-0,00862	0,25449	0,39676
1250,00	0,233	0,25936	-0,02636	0,18674	0,33197
2500,00	0,184	0,19309	-0,00909	0,11760	0,26858
5000,00	0,144	0,12682	0,01718	0,04721	0,20643

Abbildung 5: Beispiel für das Fenster zur Dateneingabe in SPSS

(Standardkonzentrationen und Dichte einer PgE_2 -Messung mit den von SPSS errechneten Werten)

- Spalte 1: Konzentrationen der Standardkurve
- Spalte 2: Photometrisch gemessene optische Dichte
- Spalte 3: Mittels SPSS errechneter Wert.
- Spalte 4: Abweichung vom tatsächlich gemessenen Wert
- Spalte 5: Untergrenze des Konfidenzintervalls
- Spalte 6: Obergrenze des Konfidenzintervalls

Die weitere Auswertung mittels SPSS und Excel erfolgte wie bereits unter 3.2.6. beschrieben.

Die im Falle der PgE₂-Standardkurve auftretende indirekte Proportionalität stellte einen wesentlichen Unterschied zu den Standardkurven von IL-4, IL-5 und IL-13 dar und soll daher in Abbildung 6 nochmals graphisch veranschaulicht werden.

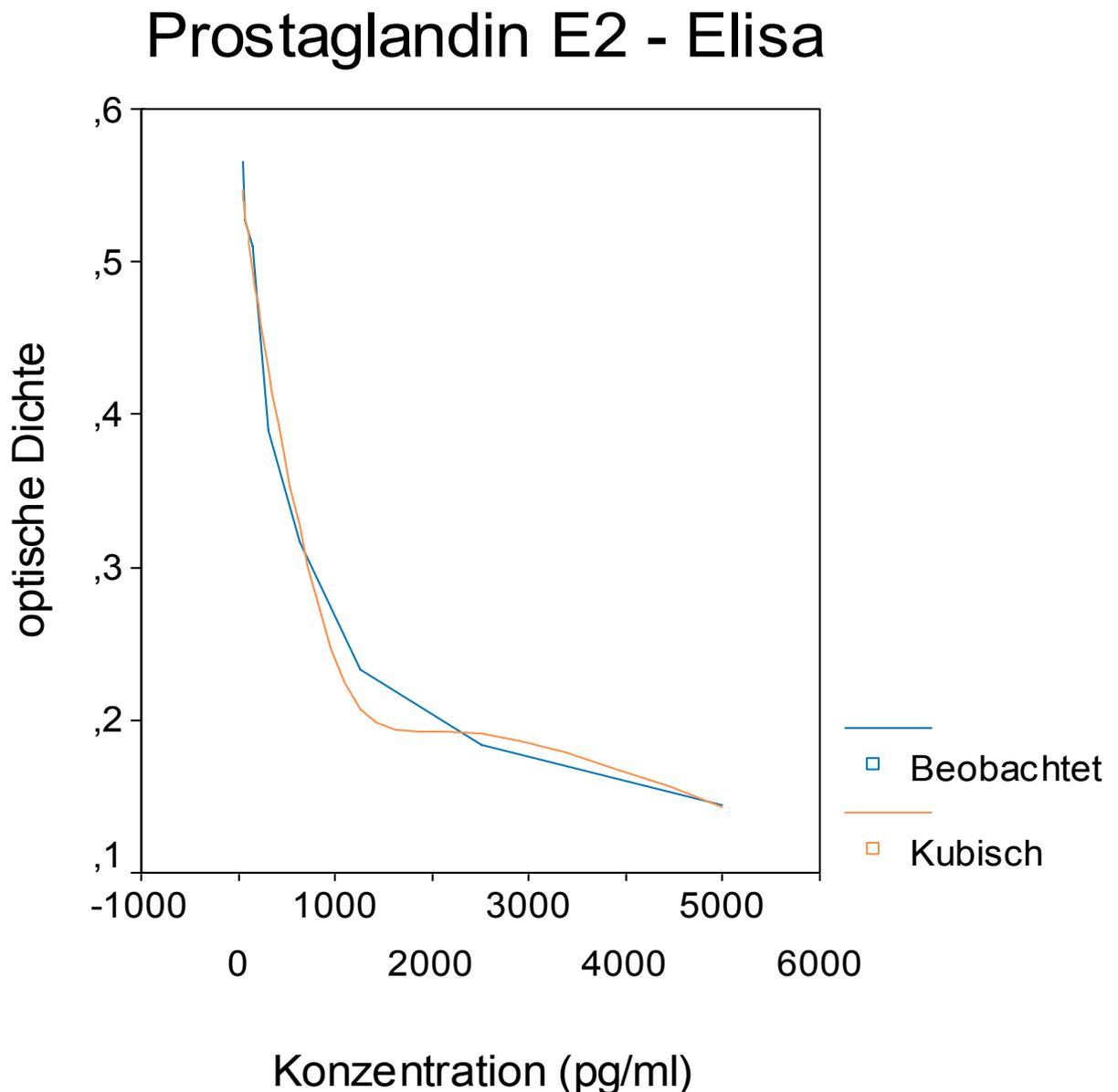


Abbildung 6: *Beispiel einer PgE₂ - Standardkurve*
(Y-Achse: optische Dichte, X-Achse: Konzentration)

3.4. Bestimmung der Gesamt - IgE - Konzentration

3.4.1 Reagenzien zur Bestimmung der Gesamt - IgE - Konzentration

- Mikrotiterplatten, Ligand-beschichtet, 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 Reagenzgefäßen
- Kalibrationsserum 1
- Kalibrationsserum 2
- Kalibrationsserum 3
- Kalibrationsserum 4
- Positives Kontrollserum 1 (hohe IgE-Konzentration)
- Positives Kontrollserum 2 (niedrige IgE-Konzentration)
- Enzymkonjugat, Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgE
- Probenpuffer
- Waschpuffer
- Chromogen/Substrat-Lösung
- Stopplösung

3.4.2. Kalibrationsseren

Eine Standardreihe war bei diesem Elisa-Testansatz nicht nötig, da die IgE-Konzentration im Vaginalabstrich mit Hilfe einer durch Inkubation der Kalibrationsseren 1 bis 4 erstellten Kalibrationskurve ermittelt wurde. Die Kalibrationsseren wurden gebrauchsfertig geliefert und wiesen folgende Konzentrationen auf: Kalibrationsserum 1: 500 IE/ml (IgE, human), Kalibrationsserum 2: 100 IE/ml (IgE, human), Kalibrationsserum 3: 10 IE/ml (IgE, human) und Kalibrationsserum 4: 0 IE/ml (IgE, human). Das ebenfalls gebrauchsfertige positive Kontrollserum 1 hatte eine hohe IgE-Konzentration, das positive Kontrollserum 2 eine niedrige IgE-Konzentration.

3.4.3. Gepufferte Waschlösung

Die gepufferte Waschlösung wurde 10fach konzentriert geliefert und mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 (1 Teil Waschpufferkonzentrat plus 9 Teile destilliertes Wasser) verdünnt. Es bestand die Möglichkeit, einer Salzkristallbildung; in diesem Fall konnten die Kristalle durch Erwärmen des Puffers auf 37°C aufgelöst werden.

3.4.4. Durchführung

Je 100 µl der vier Kalibrationsseren, der 2 positiven Kontrollseren und der Patientenproben wurden in die einzelnen Reagenzgefäße pipettiert und anschließend bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Mikroküvetten wurden nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten entleert und im Folgenden dreimal mit jeweils 300 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen, wobei der Puffer jeweils mindestens 30 Sekunden einwirken musste. Um mögliche Waschpufferreste vollständig zu entfernen, erfolgte nach dem Waschvorgang das Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf Fließpapier mit den Öffnungen nach unten.

Im nächsten Schritt wurden 100 µl Enzymkonjugat-Lösung in die Reagenzgefäße pipettiert und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nach Ablauf der Inkubationszeit nochmals, wie schon beschrieben, dreimal gewaschen.

Die erwünschte Farbreaktion ergab sich durch Zugabe von 100 µl Chromogen/Substrat-Lösung und 15-minütiger Inkubation im Dunklen. Im letzten Arbeitsschritt wurden 100 µl Stopplösung in die Mikroküvetten pipettiert und photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 602 nm ausgewertet.

3.4.5. Auswertung der Messergebnisse

Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit den Computerprogrammen SPSS und Excel. Im Gegensatz zu den insgesamt 16 Werten (jeweils acht Konzentrationen und acht gemessene Werte für die OD) der Standardreihe in den vorherigen Testansätzen wurden in diesem Fall insgesamt nur acht Werte (die jeweils gemessenen optischen Dichten und die dazugehörigen Konzentrationen) eingegeben und somit die Kalibrationskurve (Abb.7) erstellt.

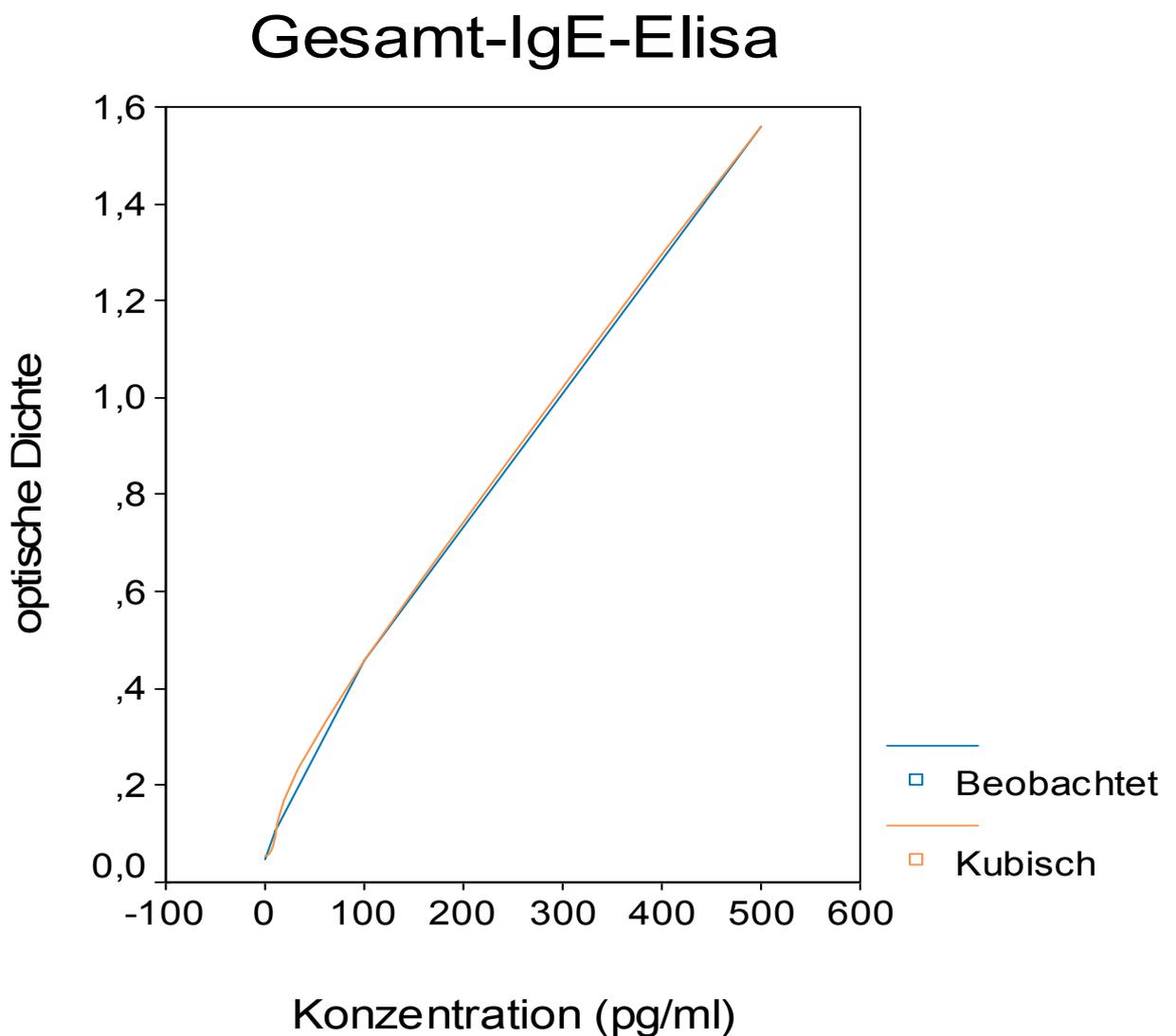


Abbildung 7: *Beispiel einer Kalibrationskurve von Gesamt-IgE*
(Y-Achse: optische Dichte, X-Achse: Konzentration)

3.5. Bestimmung des candidaspezifischen IgE

3.5.1. Reagenzien zur Bestimmung der Konzentration von candidaspezifischem IgE im Vaginalabstrich

- Mikrotiterplatten, Ligand-beschichtet, bestehend aus je 8 Streifen zu 12 Bestimmungen
- HRP-Konjugat, Anti-human-IgE
- TMB/Peroxidase Substrat
- IgE-specimaen diluent
- Sulfuric acid termination reagent
- Waschpuffer

3.5.2. Gepufferte Waschlösung

Der Waschpuffer war bei Lieferung 15fach konzentriert und musste daher vor Gebrauch mit destilliertem Wasser verdünnt werden (1 Teil Pufferkonzentrat plus 14 Teile destilliertes Wasser).

3.5.3. Durchführung

Vor Durchführung des Elisa mussten die Mikroküvetten viermal mit destilliertem Wasser gewaschen und nach dem Waschvorgang mit der Öffnung nach unten auf Fließpapier ausgeklopft werden, um mögliche Wasserreste vollständig zu entfernen. Da bei diesem Testansatz zur Bestimmung von candidaspezifischem IgE ohne Standardreihe gearbeitet wurde, konnten im Anschluss ohne vorherige Erstellung einer Standardreihe 100 µl Patientenproben in die Mikroküvetten pipettiert und im weiteren für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach fünfmaligem, wie bereits beschriebenem Waschvorgang, wurden 100 µl von HRP-Konjugat hinzugegeben und für weitere zwei Stunden, ebenfalls bei Raumtemperatur, inkubiert. Nach einem weiteren fünfmaligen Waschgang konnten zum Erzielen einer

Farbreaktion 100 µl von TMB/Peroxid-Substrat (Colorburst™ Blue II) hinzugegeben werden;

nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten (nicht im Dunklen!) wurden 100 µl einer Stopplösung (0.5N schweflige Säure) hinzupipettiert und schließlich die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450nm photometrisch gemessen.

3.5.4. Auswertung

Wie bereits oben erwähnt wurde bei diesem Elisa keine Standardreihe verwendet und damit entfiel auch eine Auswertung zur Errechnung der vorhandenen Konzentrationen. Daher konnten hier keine Aussagen in Bezug auf genaue Konzentrationsangaben im Vaginalsekret gemacht werden.

Als Ergebnis dienten direkt die photometrisch gemessenen optischen Dichten und wurden auf ein von der Firma ALerCHEK vorgegebenes Schema bezogen, nachdem je nach Höhe der OD wie folgt eingeteilt wurde:

OD	Gruppe
0.0 – 0.250	= Negativ
0.251 – 0.350	= Klasse I
0.451 – 0.550	= Klasse III
>0.550	= Klasse IV

Diesem Schema entsprechend konnten die Proben anhand ihrer OD einer Gruppe zugeordnet werden.

4. Ergebnisse

4.1. Candidanachweis

4.1.1. Kultur

Um eine vaginale Infektion mit *Candida* nachzuweisen, wurde aus dem Vaginalabstrich sowohl von den symptomatischen Patientinnen mit CRVVC als auch von der Kontrollgruppe eine Pilzkultur auf Sabouraud-Agar angelegt (Absatz 2.3.2). Im Falle einer positiven Kultur wurde zur weiteren Spezifizierung der Candidagattung Pilzmaterial von der Sabouraud-Agarplatte auf eine Chromagarplatte überimpft.

Durch die entsprechende Farbreaktion (siehe 2.3.2.) konnte zwischen einer Infektion mit *Candida albicans*, der am häufigsten nachgewiesenen Candidaspezies bei Patientinnen mit CRVVC, und *Candida glabrata*, *Candida krusei* und *Candida tropicalis* unterschieden werden.

In Tabelle 1 wird gezeigt, dass nur bei 31 (29,8%) der insgesamt 104 Patientinnen mit Symptomen eine CRVVC *Candida* letztendlich kulturell nachzuweisen war, wobei *Candida albicans* bei 25 und *Candida glabrata* bei 6 Patientinnen gefunden wurde. Dies zeigt, dass die klinische Diagnose einer CRVVC bei der Mehrheit der Patientinnen retrospektiv als unzutreffend zu bezeichnen ist. Zumindest war eine Infektion mit *Candida* zum Beschwerde- und Untersuchungszeitpunkt nicht alleinige Ursache für die Symptomatik der Patientinnen. Eine alleinige Behandlung dieser Patientinnen mit einer antimykotischen Medikation würde daher nicht den gewünschten Erfolg erzielen.

In der asymptomatischen Kontrollgruppe waren 4,9% der Patientinnen kultur-positiv.

Candida-Kultur und Spezifizierung

	Candida positiv No. (%)	Candida negativ No. (%)
CRVVC-Patientinnen	31 (29,8)	73 (70,2)
N = 104		
C.albicans	25 (24,0)	
C.glabrata	6 (5,8)	
Kontrollgruppe	2 (4,9%)	39 (95,1)
N = 41		
C.albicans	2 (4,9%)	

Tabelle 1. *Kultureller Nachweis von Candida und Candidaspezifizierung mittels Chromagar bei Patientinnen mit CRVVC und Kontrollgruppe*

Tabelle 1 zeigt ebenfalls, dass auch in der Kontrollgruppe bei zwei Patientinnen eine Pilzbesiedelung nachzuweisen war, diese jedoch keine Beschwerden verursachte. Es liegt in diesem Fall eine asymptomatische vaginale Candida-Kolonisation vor. Eine vaginale Pilzbesiedelung ohne Auftreten eines Beschwerdebildes wurde bereits in früheren Studien beobachtet und ist von daher als nicht ungewöhnlich zu betrachten.

4.1.2. PCR

Bei allen Patientinnen, sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der symptomatischen Patientengruppe, wurde neben dem Anlegen einer Kultur zusätzlich eine PCR (siehe Abschnitt 2.5.) durchgeführt. Hierbei war es wichtig, eine PCR-Methode auszuwählen, mit Hilfe derer eine gezielte Candidaspezifizierung durch Verwendung der Restriktionsendonuklease vorgenommen werden konnte. Dies ist dahingehend von Bedeutung, dass sich sowohl Krankheitsbild als auch Therapiemöglichkeiten je nach Candida Spezies unterscheiden. So zeigt sich z.B. Candida glabrata im Vergleich zu Candida albicans imidazolresistenter [65].

Bei jeder PCR waren in einer Spur der DNA-Längenstandard, in zwei Spuren zwei positive Kontrollen und in einer weiteren Spur schließlich noch eine negative Kontrolle zu sehen.

Die negative Kontrolle diente vorwiegend zum Nachweis einer möglichen Kontamination der Patientenproben durch eine der positiven Kontrollen.

Abbildung 8 zeigt ein Beispiel für ein PCR-Ergebnis.

Spuren: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

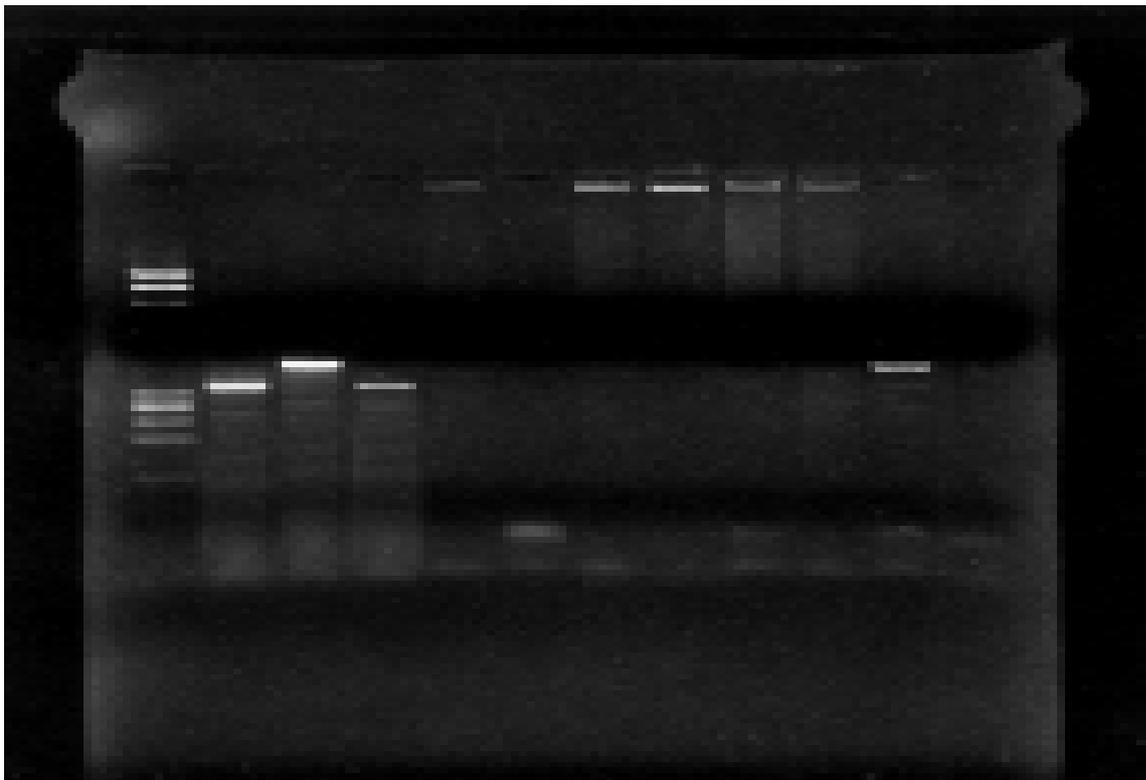


Abb.8: *Beispiel für ein PCR-Ergebnis mit einer Candida albicans- und einer Candida glabrata-positiven Patientenprobe*

- Spur 1: DNA-Längenstandard
- Spur 2: Positive Kontrolle für *Candida albicans*
- Spur 3: Positive Kontrolle für *Candida glabrata*
- Spur 4: *Candida albicans*-positive Patientenprobe
- Spuren 5-10: Negative Patientenproben
- Spur 11: Für *Candida glabrata* positive Patientenprobe
- Spur 12: Negative Kontrollprobe

Im PCR-Test waren 42.3% der CRVVC-Patientinnen Candida positiv. Bei 57.7% der Patientinnen verlief die PCR negativ. In der Kontrollgruppe wiesen allerdings auch 7.3% einen PCR - positiven Befund auf (Tabelle 2).

Candida-PCR

	PCR - positiv No. (%)	PCR - negativ No. (%)
CRVVC-Patientinnen	44 (42,3)	60 (57,7)
N = 104		
C.albicans	38 (36,5)	
C.glabrata	6 (5,8)	
Kontrollgruppe	3 (7,3)	38 (92,7)
N = 41		
C. albicans	2 (4,9)	
C. krusei	1 (2,4)	

Tabelle 2: *Candidanachweis mittels PCR bei Patientinnen mit CRVVC und Kontrollgruppe*

Der Vergleich der PCR mit der kulturellen Anzuchtung zeigt, dass mit Hilfe der PCR bei 13 symptomatischen Patientinnen Candida nachgewiesen werden konnte, wobei die entsprechenden Vaginalabstriche in der zuvor vorgenommenen kulturellen Anzuchtung kein Pilzwachstum zeigten. Es war also bei 29,5% der PCR-positiven Patientinnen kein Pilznachweis mittels kultureller Anzuchtung zu erbringen. Somit lässt sich sagen, dass das Anlegen von Kulturen bei ca. 1/3 der Patientinnen diagnostisch keine Klärung bringt. Dies kann durch eine zu geringe Keimzahl erklärt werden, so dass es in der Kultur zu keinem Wachstum kommt. Für die PCR hingegen sind weitaus geringere Mengen ausreichend, um eine positives Candidaergebnis zu erhalten, da es sich bei dieser Methode um einen DNA-Nachweis handelt. Somit ist die Sensitivität der PCR weitaus höher als die der Kultur (Tabelle 3).

Candidanachweis: PCR im Vergleich zur kulturellen Anzuchtung

CRVVC-Patientinnen	Candida-positiv No. (%)
N = 104	
Kultur	31 (29,8)
PCR	44 (42,3)

Tabelle 3. *Vergleich der beiden diagnostischen Methoden PCR und Kultur*

4.2. Auswertung des ELISA

4.2.1. Ergebnisse der Bestimmung von IL-4, IL-5 und IL-13

Die Scheide ist ein immunkompetentes Organ, welches durch Produktion von Zytokinen mit Hilfe von T-Helferzellen lokal auf Infektionen reagiert.

In dieser Arbeit war der Zusammenhang zwischen einer klinisch erscheinenden chronisch rezidivierenden Vulvovaginalcandidose und der Expression von Zytokinen, die von Th2-Zellen produziert werden, zu klären. Wir untersuchten, ob bei Patientinnen mit rezidivierenden Beschwerden die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 vermehrt produziert werden und damit die Beschwerden unter anderem mit einer verminderten CMI in Zusammenhang stehen könnten. Im Vordergrund steht hier das Zytokin IL – 4, da es durch eine Downregulation von IFN-gamma durch Th1-Zellen zu einer direkten Hemmung der CMI führt. Es wird daher auch als anti-inflammatorisches Zytokin bezeichnet. IL-5 und IL-13 spielen zusammen mit einer Vielzahl von Immunmodulatoren bei allergischen und entzündlichen Prozessen eine Rolle.

Bei der statistische Auswertung der Messergebnisse der Zytokinbestimmungen wurde als verteilungsunabhängiger Test der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Im Falle von Interleukin-4 ergab sich eine signifikante Erhöhung bei Patientinnen mit dem klinischen Bild einer CRVVC im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Gruppe der symptomatischen Patientinnen wies für Interleukin-4 einen Medianwert von 54.5 pg/ml auf, während der Medianwert der Kontrollgruppe nur bei 24.0 pg/ml lag. Bei den Werten von Interleukin-5 und Interleukin-13 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden (Tabelle 4).

Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13

	CRVVC-Patientinnen N = 104 Median pg/ml (Spanne)	Kontrollgruppe N = 41 Median pg/ml (Spanne)	p-Wert
Interleukin-4	54,5 pg/ml (4,0-448,0)	24,0 pg/ml (2,0-66,0)	<0.0001
Interleukin-5	13,0 pg/ml (0,0-398,0)	16,0 pg/ml (0,0-76,0)	0.48
Interleukin-13	0,0 pg/ml (0,0-129,0)	10,0 pg/ml (0,0-125,0)	0.34

Tabelle 4. *Vergleich der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 im Vaginalsekret zwischen CRVVC-Patientinnen und Kontrollgruppe mittels Elisa. Berechnung der statistischen Signifikanz mittels Mann-Whitney-U-Test*

4.2.2. Ergebnisse der Bestimmung von Prostaglandin E₂, Gesamt-IgE und candidaspezifischem IgE

Bei der Auswertung der Elisa-Messergebnisse von PgE₂, Gesamt-IgE und Anti-Candida-IgE im Vaginalsekret, zeigten die jeweils für die Gruppe der symptomatischen Patientinnen als auch die für die Kontrollgruppe errechneten Mediane eine signifikante Erhöhung für PgE₂ und Candida-IgE. Die Werte des Gesamt-IgE hingegen wiesen im Vergleich zu diesen beiden Gruppen keine statistische Signifikanz auf (Tabelle 5).

Prostaglandin E₂, Gesamt-IgE und candidaspezifisches-IgE

	CRVVC-Patientinnen N = 104 Median (Spanne)	Kontrollgruppe N = 41 Median (Spanne)	p-Wert
PgE ₂	897,0 pg/ml (0.0-52.000)	336.0 pg/ml (28,0-51,000)	<0.0001
Gesamt-IgE	0.0 pg/ml (0,0-57,0)	1.0 pg/ml (0.0-17.0)	0.95
Candida-IgE	0.042 OD (0,006-1,119)	0.034 OD (0,009-0,104)	0.02

Tabelle 5. *Vergleich von PgE₂, Gesamt-IgE und Anti-Candida-IgE im Vaginalsekret von CRVVC-Patientinnen und Kontrollgruppe mittels Elisa. Berechnung der statistischen Signifikanz mittels Mann-Whitney-U-Test*

Frauen, die zum Zeitpunkt der gynäkologischen Untersuchung symptomatisch waren und die klinische Diagnose einer CRVVC aufwiesen, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Konzentrationen an Interleukin-4, Prostaglandin E₂ und candidaspezifischem-IgE im Vaginalsekret (Tabelle 6). Diese Ergebnisse bei den symptomatischen Patientinnen sprechen sowohl für eine Verminderung der lokalen zellvermittelten Immunität, als auch - in Hinblick auf die erhöhten Werte von PgE₂ und candidaspezifischem IgE - auf ein lokales allergisches Geschehen .

Die Suppression der zellvermittelten Immunität kann einerseits durch eine Pilzinfektion ausgelöst worden sein, andererseits wiederum eine erneute Infektion mit Candida oder das Bestehen einer bereits vorhandenen Infektion fördern.

4.2.3. Immunmodulatoren im Überblick

	CRVVC-Patientinnen N = 104 Median	Kontrollgruppe N = 41 Median	p-Wert
Interleukin-4	54,5 pg/ml	24,0 pg/ml	<0.0001
Interleukin-5	13,0 pg/ml	16,0 pg/ml	0.48
Interleukin-13	0,0 pg/ml	10,0 pg/ml	0.34
PgE₂	897,0 pg/ml	336.0 pg/ml	<0.0001
Gesamt-IgE	0.0 pg/ml	1.0 pg/ml	0.95
Candida-IgE	0.042 OD	0.034 OD	0.02

Tabelle 6. Vergleich der, mittels Elisa bestimmten Immunmodulatoren von CRVVC-Patientinnen und Kontrollgruppe. Berechnung der statistischen Signifikanz mittels Mann-Whitney-U-Test.

Interleukin-4, PgE₂ und Candida-IgE sind aufgrund ihrer signifikant erhöhten Werte zur Veranschaulichung hervorgehoben.

Damit die Streuung der Messergebnisse besser verifiziert und eingeschätzt werden kann, werden in Tabelle 7 nochmals Median, Mittelwert, Standardabweichung sowie der p-Wert (Signifikanz) tabellarisch in der Gruppe der symptomatischen Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt. Die bildliche Darstellung der jeweiligen Häufigkeitsverteilungen wird in den Grafiken 1-12 verdeutlicht.

Die Gruppe der symptomatischen CRVVC-Patientinnen wird mit $N=104$ angegeben, die asymptomatische Kontrollgruppe mit $N=41$.

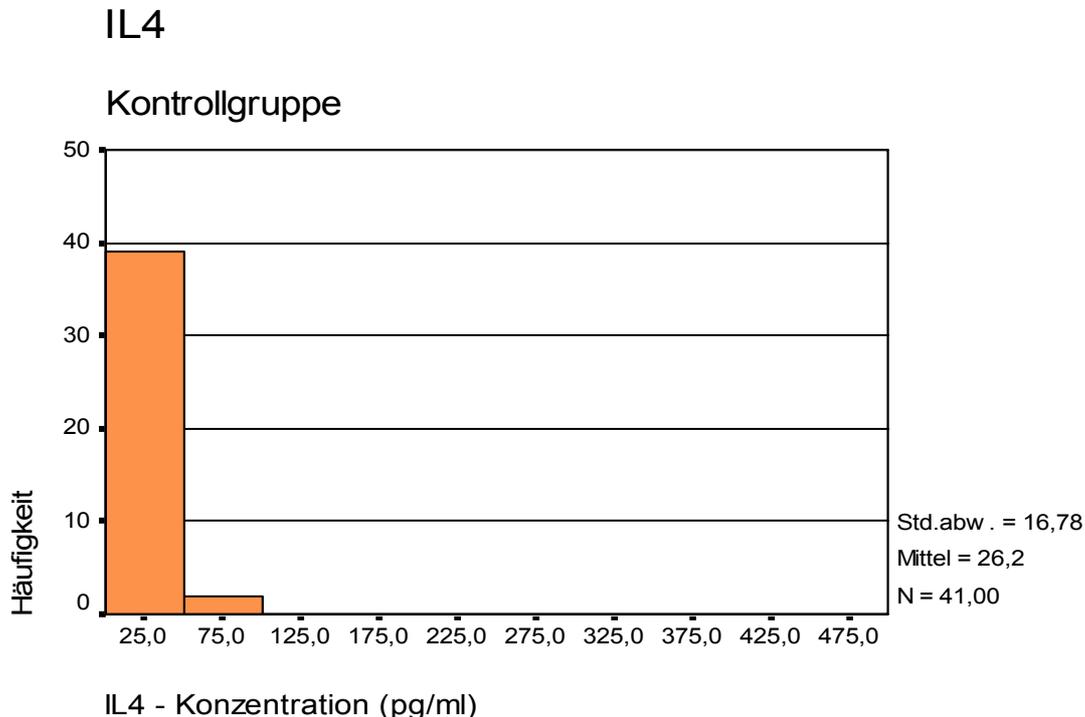
Immunmodulatoren im Überblick

	Median	Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert
Interleukin-4				
$N=104$	54,5	71,2	65,00	
$N= 41$	24,0	26,2	16,78	<0.0001
Interleukin-5				
$N=104$	13,0	32,3	62,04	
$N= 41$	16,0	17,8	12,91	0.48
Interleukin-13				
$N=104$	0,0	68,1	203,46	
$N= 41$	10,0	27,7	35,26	0.34
PgE₂				
$N=104$	897	3397	8376	
$N= 41$	336,0	1735,4	7913	<0.0001
Gesamt-IgE				
$N=104$	0,0	4,3	9,44	
$N= 41$	1,0	2,0	3,16	0.95
Candida-IgE				
$N=104$	0,042	0,071	0,13	
$N= 41$	0,034	0,038	0,02	0.02

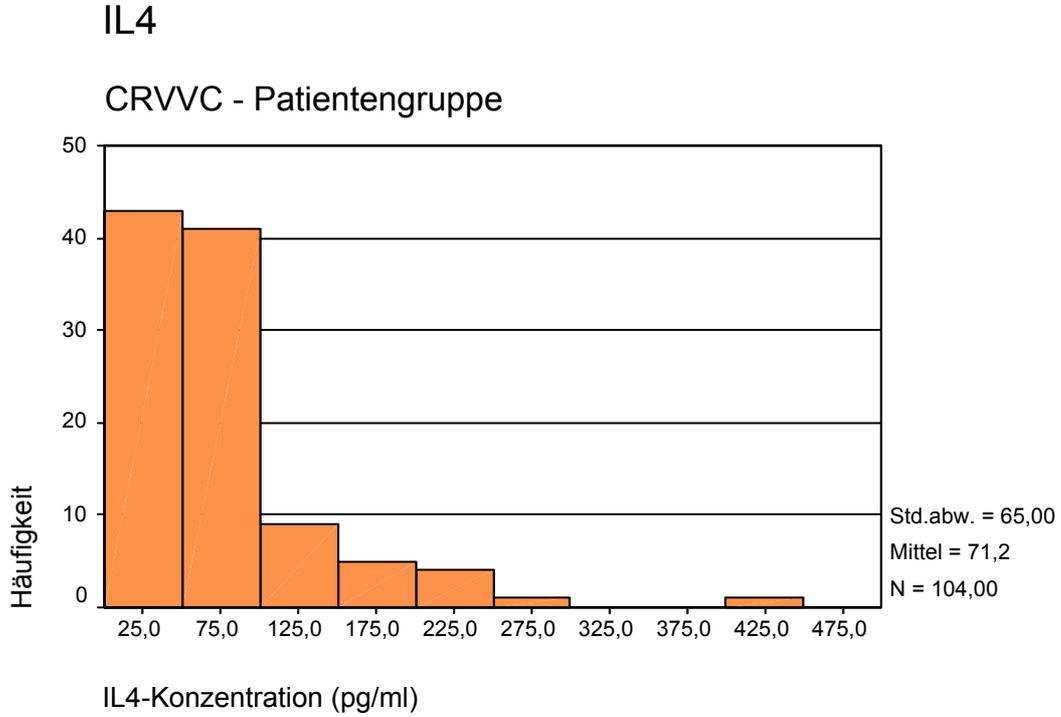
Tabelle 7. Median, Mittelwert und Standardabweichung sowie p-Wert (Signifikanz) in der Gruppe der symptomatischen Patientinnen, im Vergleich zur Gruppe der asymptomatischen Kontrollgruppe. Berechnung der statistischen Signifikanz mittels Mann-Whitney-U-Test

Die Median- und Mittelwerte wurden für IL-4, IL-5, IL-13, PgE₂, Gesamt-IgE als Konzentration in pg/ml gemessen, im Falle des candidaspezifischen IgE wurde die optische Dichte (OD) gemessen.

Häufigkeitsverteilung von IL-4 im Vergleich: Kontrollgruppe zur CRVVC-Patientengruppe.

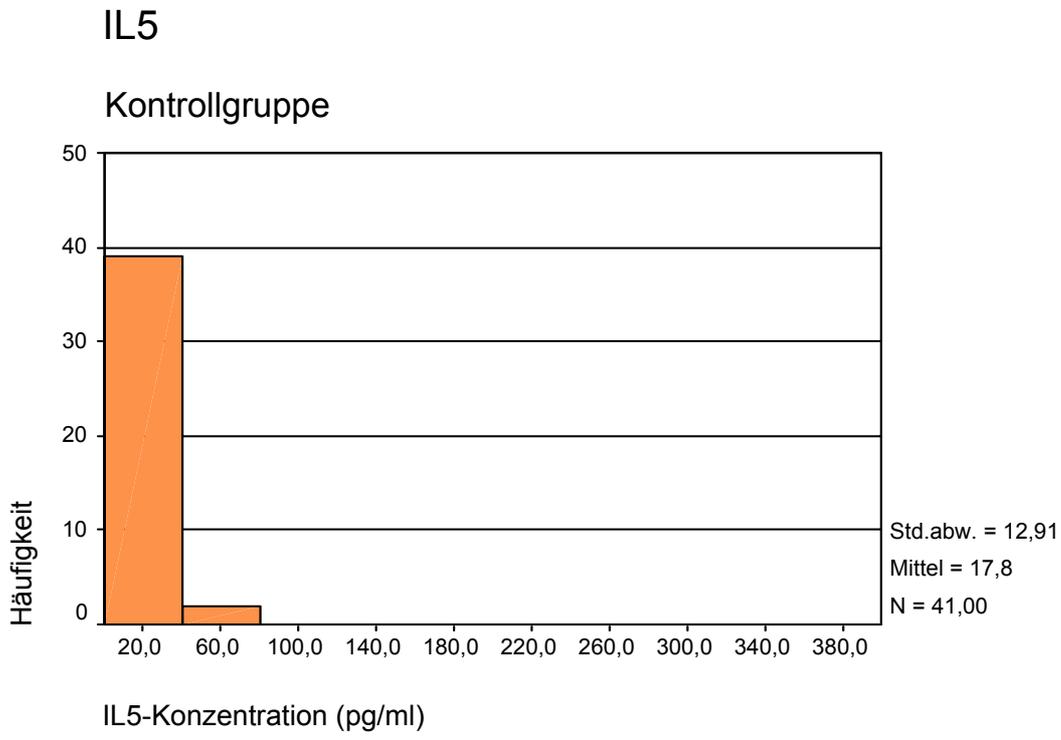


Grafik 1: *Histogramm: Interleukin 4 – Kontrollgruppe*

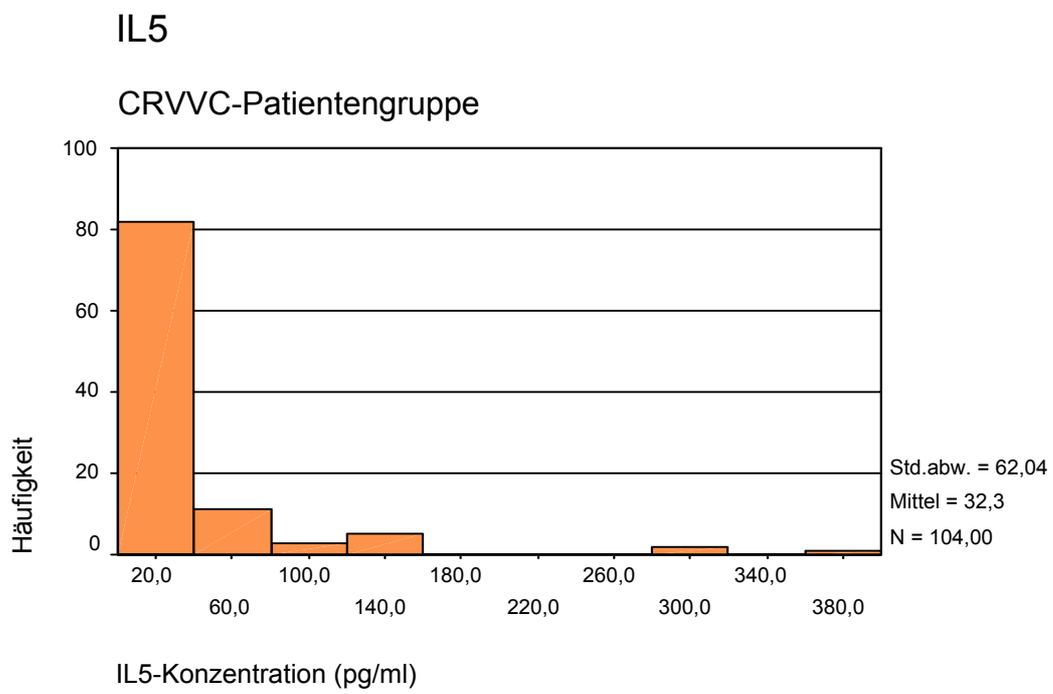


Grafik 2: *Histogramm: Interleukin 4 – CRVVC-Patientengruppe*

Häufigkeitsverteilung von IL-5 im Vergleich: Kontrollgruppe zur CRVVC-Patientengruppe.

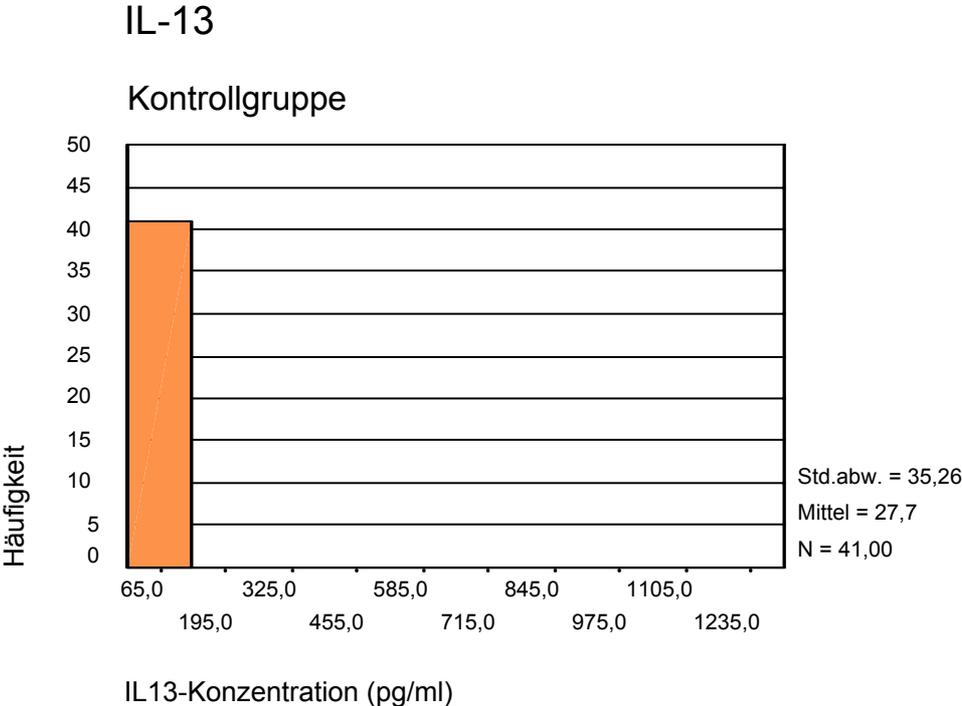


Grafik 3: *Histogramm: Interleukin 5 – Kontrollgruppe*

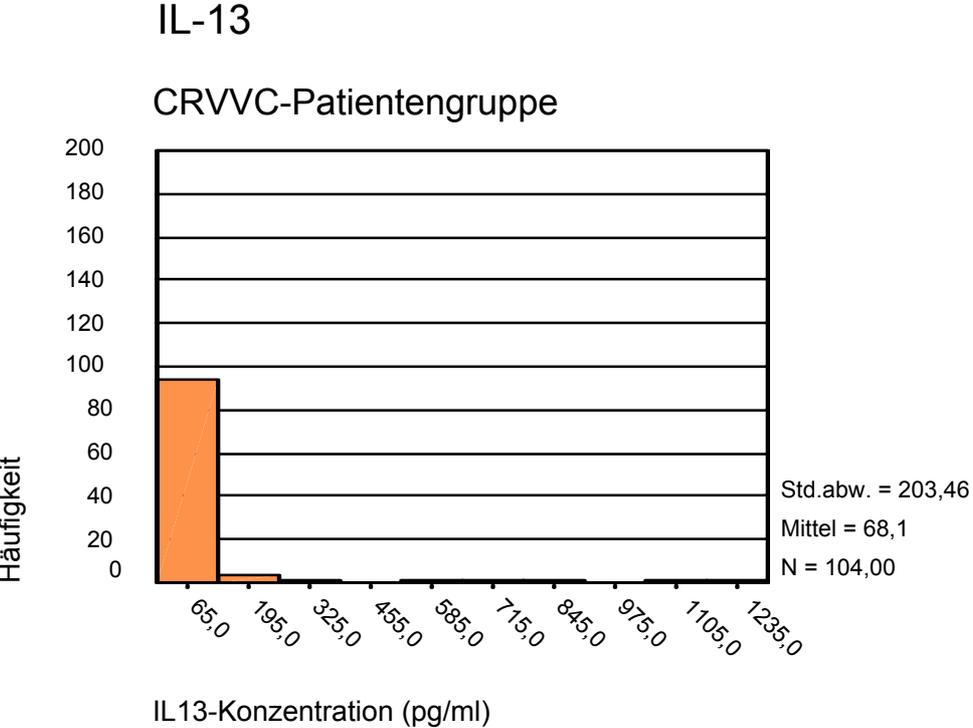


Grafik 4: *Histogramm: Interleukin 5 – CRVVC-Patientengruppe*

Häufigkeitsverteilung von IL-13 im Vergleich: Kontrollgruppe zur CRVVC-Patientengruppe.

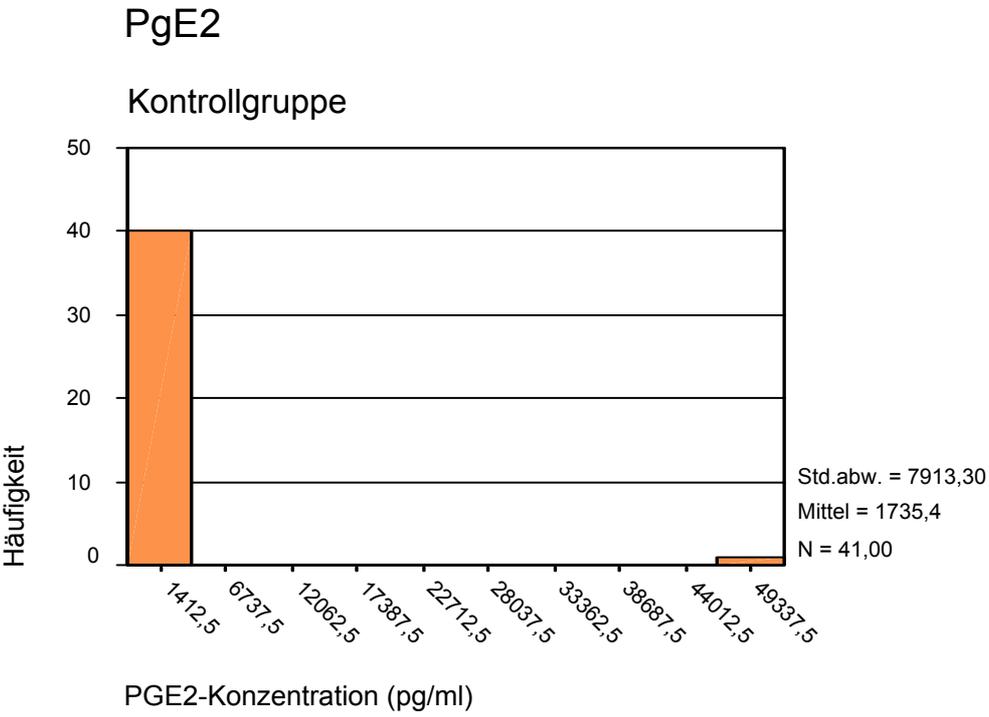


Grafik 5: *Histogramm: Interleukin 13 – Kontrollgruppe*

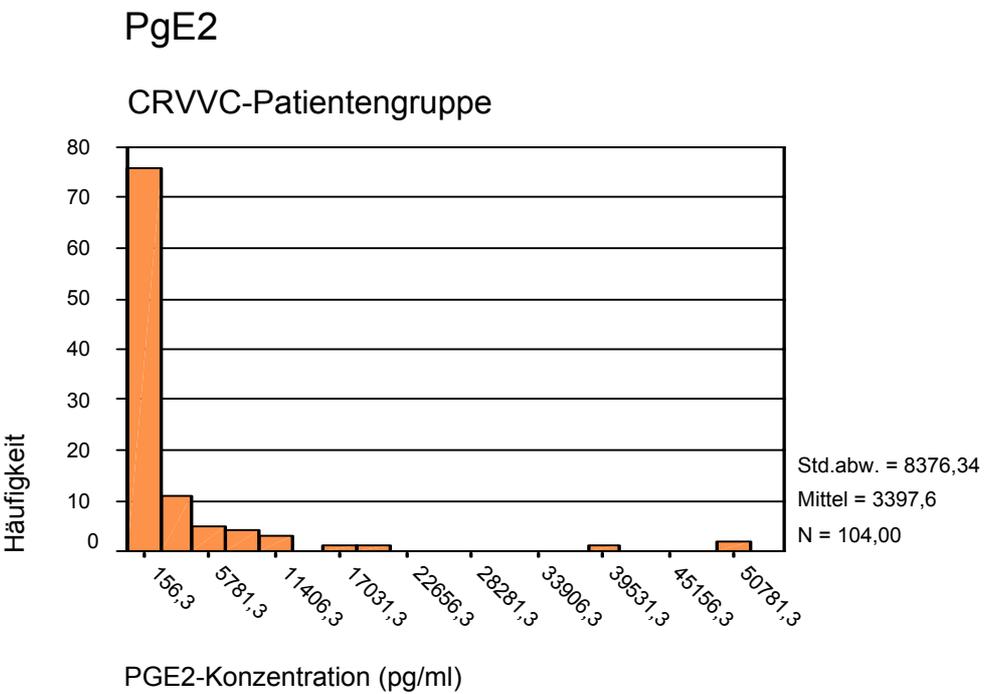


Grafik 6: *Histogramm: Interleukin 13 – CRVVC-Patientengruppe*

Häufigkeitsverteilung von PgE₂ im Vergleich: Kontrollgruppe zur CRVVC-Patientengruppe.

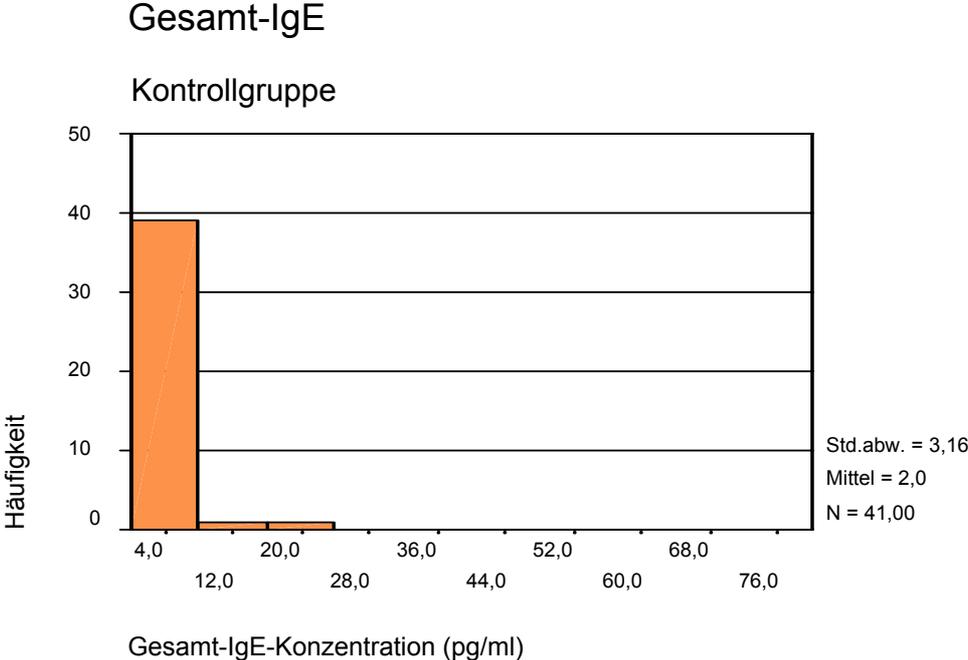


Grafik 7: Histogramm: Prostaglandin E₂ – Kontrollgruppe

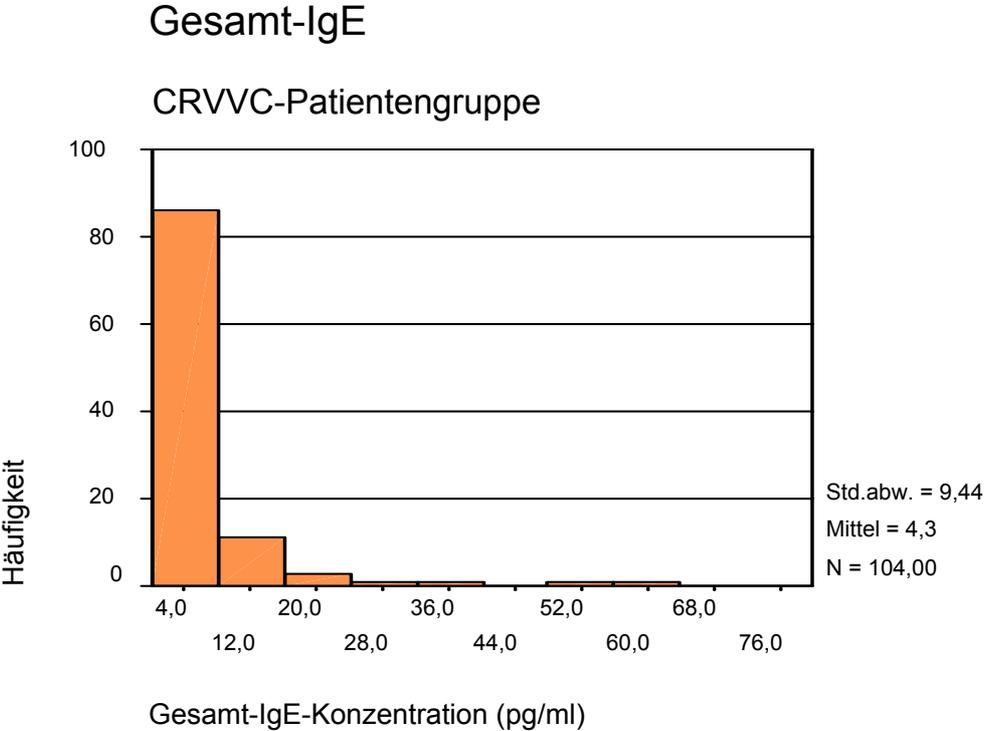


Grafik 8: Histogramm: Prostaglandin E₂ – CRVVC-Patientengruppe

Häufigkeitsverteilung von Gesamt-IgE im Vergleich: Kontrollgruppe zur CRVVC-Patientengruppe.

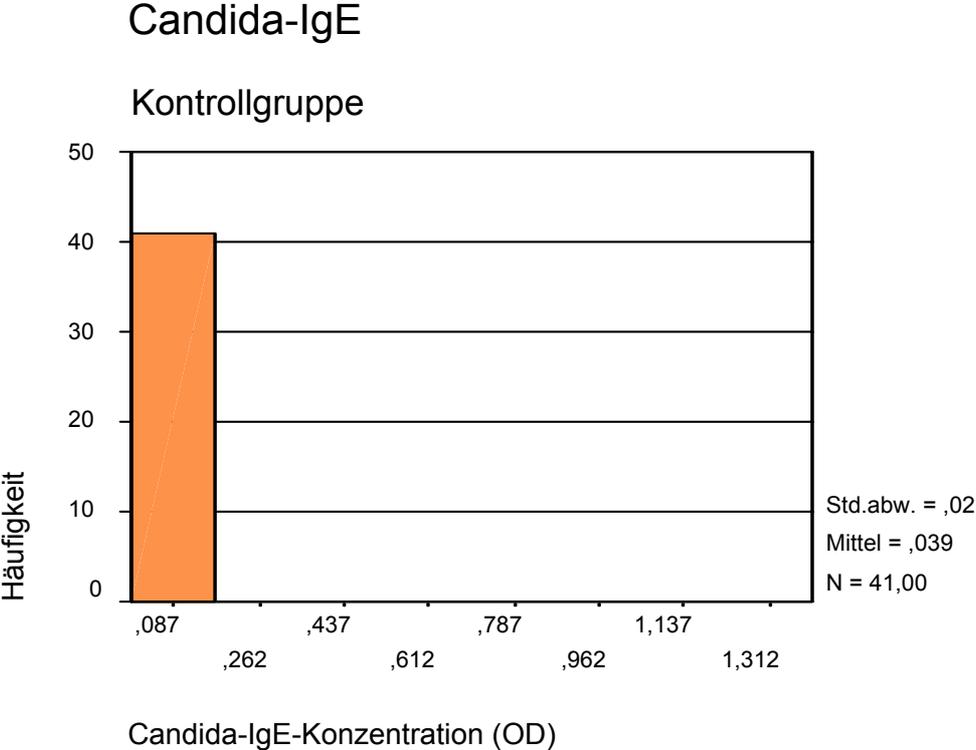


Grafik 9: Histogramm: Gesamt-IgE – Kontrollgruppe

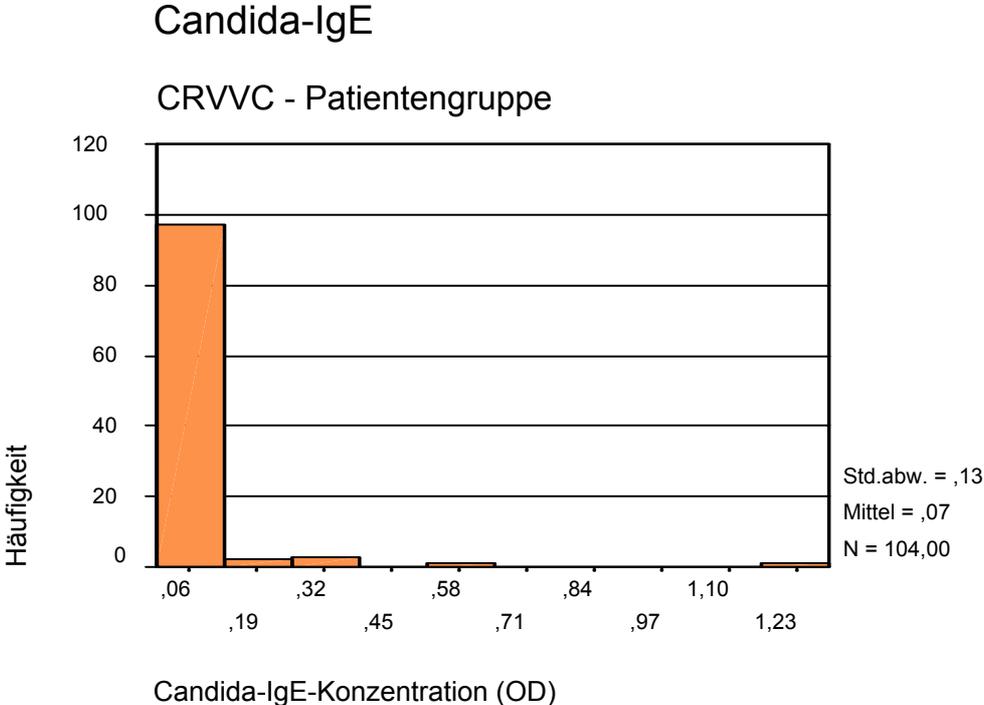


Grafik 10: Histogramm: Gesamt-IgE – CRVVC-Patientengruppe

Häufigkeitsverteilung von candidaspezifischem IgE im Vergleich: Kontrollgruppe zur CRVVC-Patientengruppe.



Grafik 11: *Histogramm: Candida-IgE – Kontrollgruppe*



Grafik 12: *Histogramm: Candida-IgE – CRVVC-Patientengruppe*

4.2.4. PCR und ELISA – Ergebnisse im Vergleich

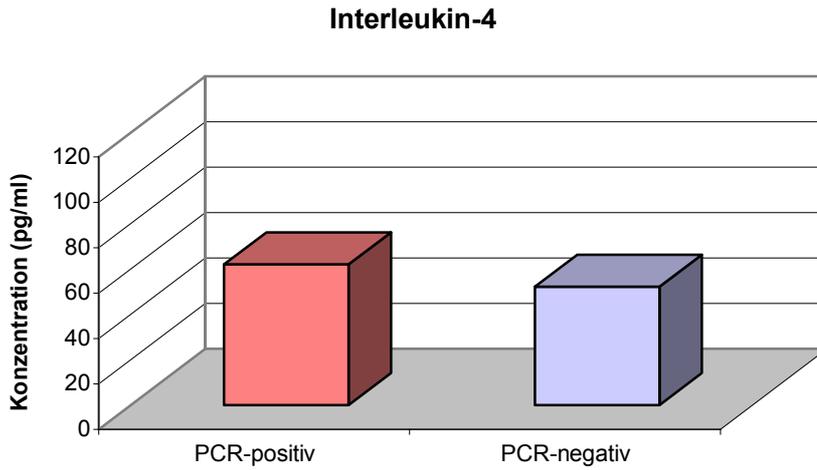
Wir untersuchten innerhalb der Gruppe der Frauen, bei denen klinisch eine CRVVC diagnostiziert wurde, ob in Hinblick auf die Konzentration der Immunmodulatoren (IL-4, IL-5, IL-13, PgE₂, Gesamt-IgE und candidaspezifisches IgE) im Vaginalsekret Unterschiede zwischen PCR-positiven und PCR-negativen Patientinnen festzustellen waren.

Hierbei zeigte sich, dass die Konzentrationen der von uns untersuchten Immunmodulatoren in der Gruppe der auf Candida getesteten PCR-positiven Patientinnen im Vergleich zu den Patientinnen, die Candida-PCR-negativ waren geringgradig erhöht waren. Diese Erhöhung der jeweils errechneten Mediane war statistisch jedoch nicht signifikant (Tabelle 8).

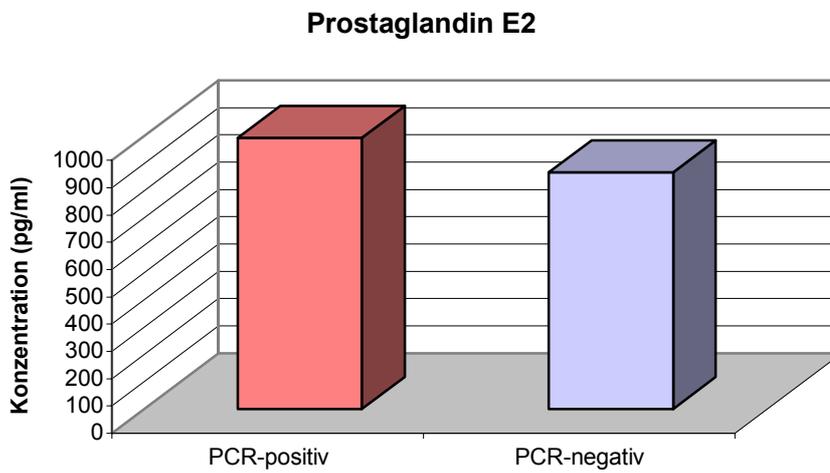
Dies soll durch Grafik 13-15 zusätzlich veranschaulicht werden.

	PCR	
	PCR-Positive Patientinnen N = 44 Median (Spanne in pg/ml)	PCR-negative Patientinnen N = 60 Median (Spanne in pg/ml)
Interleukin-4	62,0 pg/ml (4,0-448,0)	52,0 pg/ml (4,0-265,0)
Interleukin-5	15,5 pg/ml (0,0-398,0)	8,5 pg/ml (0,0-152,0)
Interleukin-13	0,0 pg/ml (0,0-1056,0)	0,0 pg/ml (0,0-1292,0)
Prostaglandin E ₂	994,0 pg/ml (0,0-40.000)	868,0 pg/ml (0,0-52.000)
Gesamt-IgE	1,5 pg/ml (0,0-53,0)	0,0 pg/ml (0,0-57,0)
Candida-IgE	0,047 OD (0,019-1,199 OD)	0,041 OD (0,006-0,526)

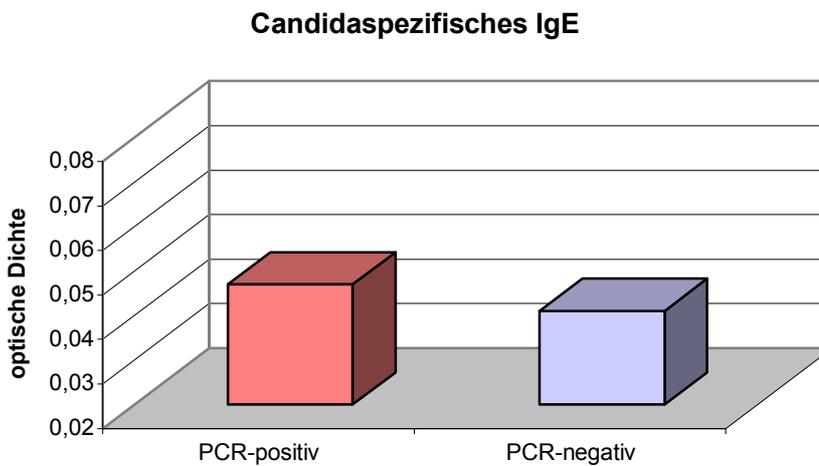
Tabelle 8. *Vergleich der Immunmediatoren bei Candida-PCR-positiven und Candida-PCR-negativen symptomatischen Patientinnen*



Grafik 13: Vergleich von IL-4 bei PCR-positiven und PCR-negativen symptomatischen Patientinnen



Grafik 14: Vergleich von PgE₂ bei PCR-positiven und PCR-negativen symptomatischen Patientinnen



Grafik 15: Vergleich von Candida-IgE bei PCR-positiven und PCR-negativen symptomatischen Patientinnen

Des Weiteren verglichen wir das Verhalten der Immunmodulatoren sowohl aus der Gruppe der PCR-positiven, als auch PCR-negativen symptomatischen Patientinnen mit der Kontrollgruppe (Tabelle 9 und Tabelle 10).

PCR-positive symptomatische Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe

	Positive Patientinnen n = 44 Median	Kontrollgruppe n = 41 Median	p-Wert
Interleukin-4	62,0 pg/ml	24,0 pg/ml	<0.0001
Interleukin-5	15,5 pg/ml	16,0 pg/ml	0.95
Interleukin-13	0,0 pg/ml	10,0 pg/ml	0.083
PgE₂	994,0 pg/ml	336,0 pg/ml	<0.0001
Gesamt-IgE	1,5 pg/ml	1,0 pg/ml	0.56
Candida-IgE	0,047 OD	0,034 OD	0.01

Tabelle 9. *Vergleich der PCR-positiven symptomatischen Patientinnen mit der Kontrollgruppe (Die signifikanten Ergebnisse sind hervorgehoben).
Berechnung der statistischen Signifikanz mittels Mann-Whitney-U-Test*

Das candidaspezifische-IgE ist in der Gruppe der PCR-positiven symptomatischen Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (p=0.01), jedoch nicht so deutlich wie Interleukin-4 und Prostaglandin E₂, die einen p-Wert von <0.0001 aufweisen.

PCR-negative symptomatische Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe

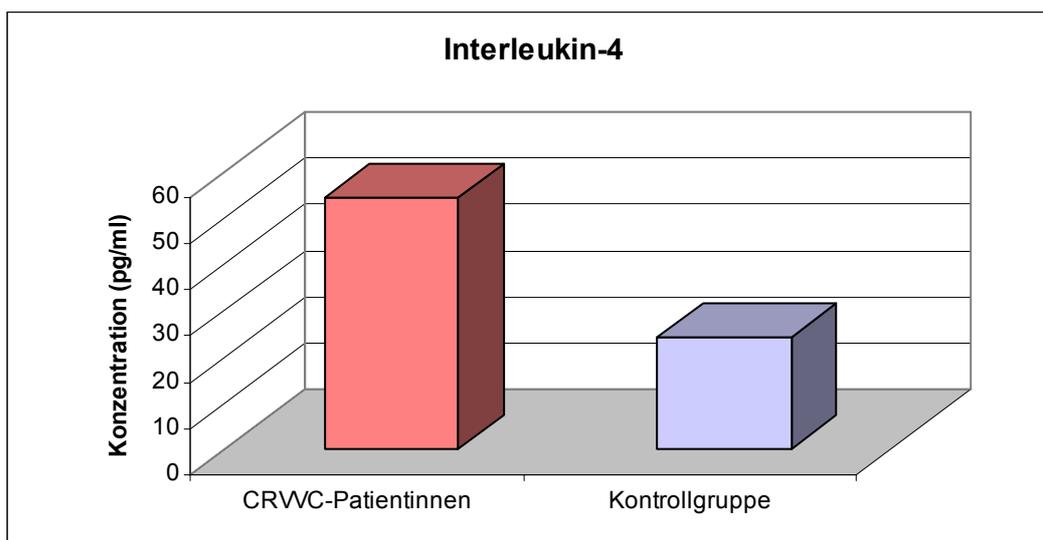
	Negative Patientinnen n = 60 Median	Kontrollgruppe n = 41 Median	p-Wert
Interleukin-4	52,0 pg/ml	24,0 pg/ml	<.0001
Interleukin-5	8,5 pg/ml	16,0 pg/ml	0.28
Interleukin-13	0,0 pg/ml	10,0 pg/ml	0.83
PgE₂	868,0 pg/ml	336,0 pg/ml	<.0001
Gesamt-IgE	0,0 pg/ml	1,0 pg/ml	0.56
Candida-IgE	0,041 OD	0,034 OD	0.09

Tabelle 10. *Vergleich der Immunmodulatoren bei Candida-PCR-negativen symptomatischen Patientinnen mit der Kontrollgruppe (Die signifikanten Ergebnisse sind hervorgehoben). Berechnung der statistischen Signifikanz mittels Mann-Whitney-U-Test*

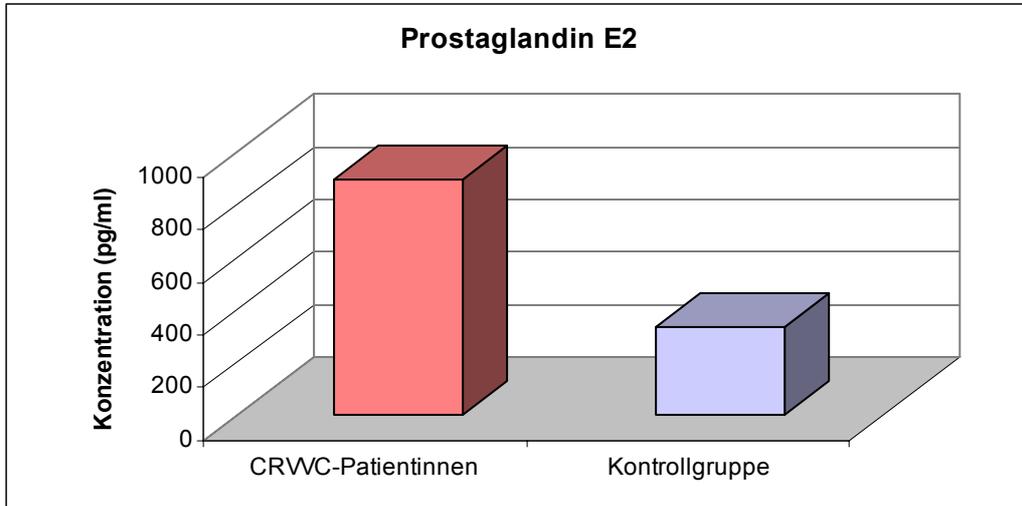
Diejenigen Patientinnen, die symptomatisch waren, bei denen jedoch keine Candidainfektion nachgewiesen werden konnte, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Werte für Interleukin-4 und Prostaglandin E₂.

Das candidaspezifische IgE zeigte ebenfalls erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Mit einem p-Wert von 0.09523 kann diese Erhöhung jedoch nicht mehr als signifikant bezeichnet werden.

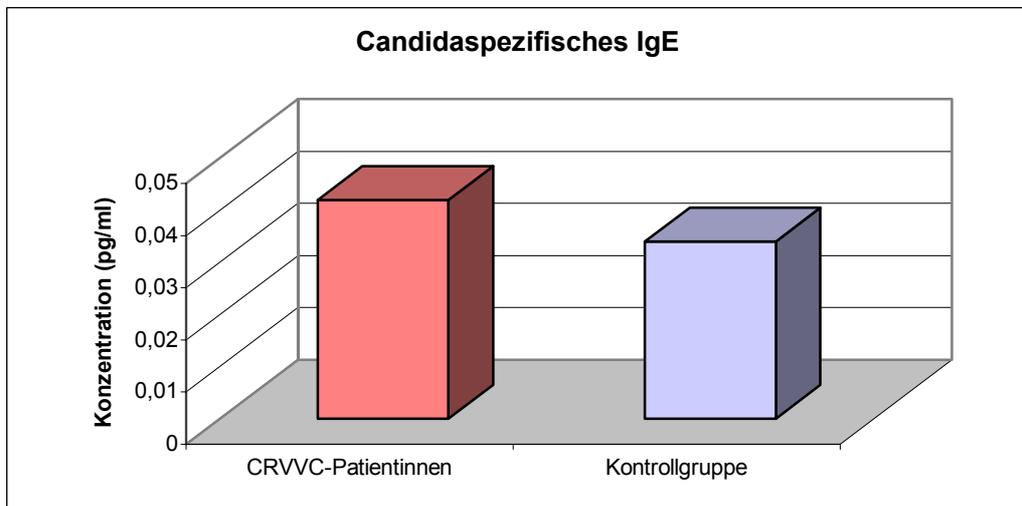
Im jeweiligen Vergleich mit der Kontrollgruppe verdeutlichen Tabelle 9 und Tabelle 10 somit, dass innerhalb der Gruppe der symptomatischen Patientinnen das candidaspezifische IgE bei Candida-Besiedelung signifikant erhöht war, bei Patientinnen ohne Candidainfektion keine Signifikanz mehr vorlag. Der Vergleich der symptomatischen Patientinnen mit der asymptomatischen Kontrollgruppe wird in Grafik 16-18 nochmals verdeutlicht.



Grafik 16: Vergleich von IL-4 bei symptomatischen Patientinnen und Kontrollgruppe



Grafik 17: Vergleich von PgE_2 bei symptomatischen Patientinnen und Kontrollgruppe



Grafik 18: Vergleich von *Candida*-IgE bei symptomatischen Patientinnen und Kontrollgruppe

Aufgrund dieser Ergebnisse entstehen nicht nur neue therapeutische, sondern auch diagnostische Ansätze, indem bei Patientinnen mit bisher klinisch nicht verifizierbaren Beschwerden Interleukin-4, Prostaglandin E₂ und auch candidaspezifisches IgE bestimmt wird. Im Falle erhöhter Prostaglandin-Werte kann somit ein allergisches Geschehen als Ursache der Beschwerden in Betracht gezogen werden, im Falle erhöhter IL-4-Werte eine verminderte zellvermittelte Immunität. Ein Zusammenspiel beider Faktoren ist ebenfalls möglich und muss je nach Ergebnis der Elisa-Messungen bedacht werden.

Die erhöhten Werte der gemessenen optischen Dichte des candidaspezifischen IgEs waren in der Gruppe der PCR-positiv getesteten symptomatischen Patientinnen signifikant, im Falle der PCR-negativen symptomatischen Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls erhöht. Diese Erhöhung war statistisch jedoch nicht signifikant.

In Zusammenhang mit erhöhten PgE₂-Werten kann unserer Meinung nach jedoch die Bestimmung von candidaspezifischem IgE trotzdem hilfreich und in Richtung eines möglichen allergischen Geschehens richtungweisend sein.

4.2.5. Immunmodulatoren und Candidaspezies im Vergleich

Tabelle 11 zeigt das Verhältnis von Candida Spezies und Immunmodulatoren im Vaginalsekret bei Frauen mit der klinischen Diagnose einer CRVVC.

Hierbei war keiner der Unterschiede statistisch signifikant. Die in der Gruppe der Patientinnen mit Candida glabrata-Infektion errechneten Mediane scheinen im Vergleich zu den Patientinnen ohne Candida-Nachweis erniedrigt zu sein; aufgrund der geringen Fallzahl von sechs Patientinnen im Vergleich zu 73 Candida-negativen Patientinnen ist in diesem Falle jedoch keine verwertbare Aussage zu treffen.

Candidakultur mittels Chromagar

	C.albicans N = 25 Median	C.glabrata N = 6 Median	kein Candida N = 73 Median
Interleukin-4	62,0 pg/ml	29,0 pg/ml	55,0 pg/ml
Interleukin-5	21,0 pg/ml	39,0 pg/ml	7,0 pg/ml
Interleukin-13	0,0 pg/ml	12,0 pg/ml	0,0 pg/ml
Prostaglandin E ₂	1238,0 pg/ml	459,0 pg/ml	868,0 pg/ml
Gesamt-IgE	1,0 pg/ml	0,5 pg/ml	0,0 pg/ml
Candida-IgE	0,050 OD	0,035 OD	0,042 OD

Tabelle 11. *Vergleich von Immunmodulatoren und Candidaspezies*

5. Diskussion

Wir untersuchten in unserer Studie insgesamt 104 Patientinnen mit dem klinischen Bild einer chronisch rezidivierenden Vulvovaginal-Candidose. Die Patientinnen klagten über Brennen, Juckreiz, Fluor und Kohabitationsbeschwerden.

Um eine Candida-Besiedelung des Genitaltraktes nachzuweisen, legten wir Kulturen auf Sabouraud-Agar an; im Falle eines Pilzwachstums erfolgte die Candidaspezifizierung durch Überimpfung von Kulturen auf eine Chromagarplatte. Chromagar ist ein selektives chromogenes Medium, welches zur Identifikation und Spezifizierung einer Candidainfektion sinnvoll ist, da aufgrund der unterschiedlichen Farbreaktion der jeweiligen Candidagattung eine Spezifizierung des Pilzes möglich ist [29,43,52]. Dies ist von Bedeutung, da Stämme wie *Candida glabrata* und *Candida krusei* eine oft andere klinische Symptomatik verursachen, als dies durch Infektionen mit *Candida albicans* der Fall ist. Infektionen mit *Candida glabrata* verlaufen nicht selten ausgesprochen symptomarm mit nur leichtem Brennen und Jucken, wobei es selten zu einer Candidose kommt. Therapeutisch gesehen erweisen sich jedoch *Candida glabrata* und *Candida krusei* oft als äußerst hartnäckig, da diese Stämme nicht selten Fluconazolresistenzen aufweisen und somit auf eine übliche antimykotische Therapie wenig ansprechen [61,63,65,70].

Zusätzlich zu der kulturellen Anzucht wurde zum Nachweis einer Candida-Infektion die Methode der Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) angewandt.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass bei lediglich 29,8% der symptomatischen Patientinnen eine Candidainfektion kulturell nachzuweisen war. Mit Hilfe der PCR gelang jedoch in 42,3% der Fälle der Nachweis einer Candidainfektion. Ohne die Nachweismethode der PCR, welche sich als das deutlich sensitivere Verfahren zeigte, wäre damit bei insgesamt 13 Patientinnen eine Candidainfektion unentdeckt geblieben. Giraldo et. al. [27] kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die PCR als sensitiveres Nachweisverfahren im Vergleich zur kulturellen Anzucht angesehen werden kann. Diesbezüglich gibt es jedoch kontroverse Meinungen und Studien. Mardh et al [43] veröffentlichten 2003 Ergebnisse, die der PCR, im Vergleich zum kulturellen Nachweis, keinen Vorteil in Bezug auf die Sensitivität zusprachen: demnach waren 43,8% von 73 Frauen sowohl Kultur- als auch PCR-positiv, 17,8% waren nur PCR-positiv, 20,5% nur Kultur-positiv, in der PCR jedoch negativ.

Diese Ergebnisse können durch unsere Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden, zumal bei keiner der untersuchten Proben, die in der Kultur ein Candidawachstum zeigten, die anschließend durchgeführte PCR negativ war.

Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits erwähnt, zeigten unsere Ergebnisse bei lediglich 29,8% (Kultur) bzw. 42,3% (PCR) der symptomatischen Patientinnen eine Candidainfektion; somit war in Hinblick auf die Diagnosestellung mittels PCR bei 57,5%, in Bezug auf den kulturellen Nachweis sogar bei 70,2% der Patientinnen *keine* Infektion mit Candida nachzuweisen.

An dieser Stelle muss auch auf die möglichen Differentialdiagnosen, die neben einer Candidainfektion ebenfalls in Frage kommen, hingewiesen werden. Erkrankungen wie Bakterielle Vaginose, Herpes genitalis, Trichomonadeninfektion, Chlamydieninfektion oder Lichen ruber planus können ähnliche Beschwerden verursachen [18,45,64] und müssen daher in Betracht gezogen und auch ausgeschlossen werden.

Die Frage nach der Ursache für die Beschwerden und die daraus resultierende Wahl einer geeigneten Therapie steht bei diesen Patientinnen im Vordergrund. Noch bedeutender als das Therapieren der Beschwerden scheint das Erkennen Ihrer Ursache, so dass nicht eine symptombezogene, sondern vielmehr mit einer, am Ursprung der Erkrankung ansetzenden Therapie den Patienten geholfen werden kann.

„Psychosomatische Vulvovaginitis“ – so lautete die Überschrift eines Artikels von Dodson et al [16] im Januar 1978. Patientinnen, bei denen die vaginalen Beschwerden nicht mit den physisch zu erhebenden Befunden übereinstimmten, wurden demnach mit der Diagnose „Psychosomatische Vulvovaginitis“ abgetan. Diese Patientinnen suchten zahlreiche Ärzte auf, sprachen auf die meisten Medikamente nicht an und zeigten – so Dodson- eine emotionale Labilität. In vielen dieser Fälle wurde im Folgenden eine psychiatrische Therapie angesetzt.

Aber auch heutzutage, 2003, werden nicht selten Patientinnen, bei denen aufgrund fehlenden Keimnachweises die Diagnose der CRVVC nicht gestellt wird, an psychosomatische Abteilungen überwiesen.

Da ein Pilznachweis, abhängig von der Nachweismethode, bei Patientinnen mit den Beschwerden einer chronisch-rezidivierender Vulvovaginal-Candidose nur in etwa 1/3 der Fälle gelingt - diese Aussage wird durch vorangegangene Studien ebenfalls bestätigt [61,71] - ist die weitere Erforschung möglicher ätiologischer Ursachen der

Beschwerden unbedingt notwendig, um die angegebene Symptomatik verifizieren zu können. Dies war das Ziel unserer Studie.

Die Beschwerden und der Krankheitsverlauf der Patienten können durch zahlreiche Faktoren, seien es Veränderungen der lokalen Immunität, Allergien aber auch menstruationsabhängige Hormonschwankungen, Diabetes mellitus, Antibiotika-Einnahme und vieles mehr beeinflusst werden. Die CRVVC ist eine etiologisch multifaktorielle Erkrankung.

Es ist davon auszugehen, dass die Ursache der Beschwerden und im Speziellen des rezidivierenden Auftretens dieser Beschwerden unter anderem in einem erworbenem Defekt der lokalen Immunabwehr der Scheide zu finden ist. Wir untersuchten die Patientinnen der Kontrollgruppe, als auch die symptomatischen Frauen auf IL-4, IL-5, IL-13, Gesamt - IgE und candidaspezifisches IgE. In Bezug auf IL-5, IL-13 und Gesamt – IgE konnten wir im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede feststellen.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass das Zytokin IL-13 viele biologische Funktionen mit IL-4 teilt und eine wichtige immunregulatorische Rolle im Verteidigungsmechanismus gegen Candidainfektionen spielt [10,38,78] indem IL-13 und IL-4 als Th2-Zytokine die candidastatische Funktion der Makrophagen erhöht [9]. Auch Saito et al [60] zeigten, dass chronische Entzündungen mit der Präsenz von Th2 – Zytokinen, im speziellen von IL-4 und IL-13, vergesellschaftet sind. Ein Zusammenhang von IgE-Produktion und IL-13 wurde von Comoy et al [7] beschrieben. Demnach wird die IgE-Produktion durch die Zytokine IL-4 und IL-13 stimuliert und durch IFN-gamma inhibiert. Kimura et al [39] hingegen kommen zu dem Ergebnis, dass hohe IL-4–Spiegel in geringerem Maße als eine reduzierte IFN-gamma Sekretion für eine gegen Candida gerichtete IgE-Synthese verantwortlich ist. Patella et al [53] beschrieben hingegen eine IgE-induzierte IL-4 und IL-13-Sekretion, welche im Weiteren zu einer Histaminfreisetzung aus Basophilen führt. Diese engen Zusammenhänge von Interleukin-4, Interleukin -13 und IgE können durch unsere Studie jedoch nicht bestätigt werden. Für das Interleukin-13 waren weder im Vergleich zur Kontrollgruppe, noch im Vergleich der Candida-PCR-negativen zur Candida-PCR-positiven Gruppe symptomatischer Patientinnen signifikante Unterschiede festzustellen waren (siehe Tabellen 8,9,10).

Interleukin-5 ist als Schlüsselzytokin in Bezug auf die Lebensspanne von Eosinophilen anzusehen, da es die Bildung und Differenzierung von Eosinophilen fördert [69,80]. Ricer et al [56] fanden bei Patientinnen mit rezidivierenden Beschwerden ohne Nachweis einer Infektion eine erhöhte Anzahl an Eosinophilen; eine lokale intravaginale allergische Reaktion als Ursache der Beschwerden schien den Autoren daher wahrscheinlich.

Wir konnten jedoch aufgrund unserer Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen den Beschwerden und signifikant veränderten Interleukin-5-Werten im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Die Auswertung der Messergebnisse des von uns untersuchten Gesamt-IgEs im Vaginalsekret zeigte ebenfalls keine Signifikanzen, weder im Vergleich zur Kontrollgruppe, noch im Vergleich von PCR-positiven und PCR-negativen symptomatischen Patientinnen (siehe Tabelle 8,9,10).

Unsere Ergebnisse zeigten jedoch eine, im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikante Erhöhung ($p < .0001$) des Interleukin-4, das ein anti-inflammatorisches Zytokin der Immunantwort vom Th2-Typ darstellt [34,60,77]. Ebenso zeigten sich für Prostaglandin E₂ ($p < .0001$) und candidaspezifisches IgE ($p < 0.02$) eine signifikante Konzentrationserhöhung im Vaginalsekret symptomatischer Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Beobachtungen können folgendermaßen interpretiert werden:

Bei der Patientengruppe mit den Symptomen einer rezidivierenden vulvovaginalen Candidose liegt eine lokale vaginale Immunsuppression vor, welche den Boden für die Beschwerden bereitet. Bei denjenigen Frauen, bei denen eine Candidakolonisierung nachzuweisen war, führte diese Immunsuppression zu einer Proliferation von Candida in der Scheide. Die Candidainfektion kann daher zum einen als sekundäre Konsequenz der Immunsuppression, zum anderen als Ursache der bei der Anamnese angegebenen Beschwerden angesehen werden.

IL-4 führt zu einer Hemmung der Aktivität von Th1-Zellen und damit zellvermittelten Immunität; es kommt zu einer Downregulierung von IFN-gamma und IL-2 [77]. Zahlreiche Untersuchungen und Studien belegen den Zusammenhang rezidivierender Candidainfektionen mit Störungen der lokalen Th1-vermittelten Immunität und bestätigen unsere Ergebnisse, dass eine lokale Hemmung der zellvermittelten Immunität zu rezidivierenden Vulvovaginal-Candidosen führen kann [1,17,46,73,79].

Auch Fidel [21,23] verdeutlichte die wichtige Rolle der zellvermittelten Immunität, nicht jedoch ohne zu unterstreichen, dass der lokalen Immunität eine wichtigere Rolle zukommt, als der systemischen.

Ebenso kamen Saito et al [60] 2003 zu dem Ergebnis, dass chronische Entzündungen mit einer erhöhten Präsenz von Th2-Zytokinen und damit von IL-4 vergesellschaftet sind.

Piccini et al [54] untersuchten die sowohl Th1- als auch Th2 Zellen vermittelte Expression von Zytokinen im peripheren Blut von Patienten mit rezidivierender vulvovaginaler Candidose. Hier konnten, im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, erhöhte IFN-gamma und erniedrigte IL-4-Werte bei Patientinnen mit RVC nachgewiesen werden. Die Messungen wurden allerdings im peripheren Blut und nicht im Vaginalsekret der Patientinnen durchgeführt. Die von Piccini et al ebenfalls durchgeführten Untersuchungen im Vaginalsekret zeigten eine erhöhte IFN-gamma Produktion bei RVC-Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine erhöhte IL-4 Produktion konnte, im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, nicht nachgewiesen werden.

Es gibt aber auch Untersuchungen, die den Anstieg von Zytokinen und Prostaglandin im Vaginalsekret auf Hormonschwankungen im Rahmen des Menstruationszyklus und nicht auf die eigentliche Infektion mit Candida zurückführen [22]. Im Rahmen dieser Studie wurden gesunde Frauen ohne Anzeichen rezidivierender Beschwerden in ihrer Krankengeschichte mit einem Antigen eines Candida-Hauttests inokuliert; die Zytokinmessungen wurden vor- und nach Antigengabe durchgeführt. Es lies sich kein Anhalt für eine Immunstimulation oder ein allergisches Geschehen im Sinne von Veränderungen der gemessenen Zytokine, Prostaglandin, IgE und Histamin finden [22].

Betrachtet man diese Studie kritisch, so stellt sich die Frage, ob sich die lokalen immunologischen Verhältnisse in der Vagina von gesunden Frauen, mit denen seit Jahren an rezidivierenden Pilzinfektionen leidenden Patienten vergleichen lassen.

Außerdem müsste die Frage nach der Virulenz des verwendeten Antigens beantwortet werden und zusätzlich mit anderen vorkommenden Candidastämmen verglichen werden.

In einer Studie von Nikitin et al [51] wurde die adhäsive Aktivität von *Candida albicans* gegen vaginale Epithelzellen als hormonabhängig beschrieben, wobei zwei

unterschiedliche *Candida-albicans*-Adhäsine entdeckt wurden, die zum einen polyphenyloxidase-sensitiv und zum anderen asparaginase-sensitiv waren.

Ein gewisser hormoneller Einfluß auf den Status der zellulären Immunität ist jedoch durchaus wahrscheinlich. So scheinen Frauen mit rezidivierenden Beschwerden, die sich in der „follikulären Menstruationsphase“ befinden für einen Ausbruch anfälliger zu sein, als diejenigen, die sich in der „lutealen Phase“ befinden [8]. Clancy et al [6] fanden eine höhere Rate an Pilzrezidiven im Zusammenhang mit hohen Östrogenspiegeln. So hängt das Auftreten von *Candida* bei postmenopausalen Frauen, die jedoch in dieser Studie nicht mit eingeschlossen waren, eng mit der Einnahme von Östrogenen, welche wiederum die Glykogenproduktion anregen, zusammen [13].

Trotz alledem kommt der zellvermittelten Immunität und deren Störung bei der Ursache rezidivierender Beschwerden eine sehr bedeutende Rolle zu.

Die, im Vergleich zur Kontrollgruppe, von uns gemessene signifikante Erhöhung von PgE₂ und candidaspezifischem IgE im Vaginalsekret bei Frauen mit der klinischen Diagnose einer CRVVC kann als Konsequenz einer lokalen allergischen Immunantwort interpretiert werden. Eine solche allergische Reaktion kann, wenn nicht direkt ursächlich im Sinne einer Candidainfektion, zumindest eine Verlängerung der Beschwerden und eine hohe Empfänglichkeit für Re-Infektionen verursachen.

Prostaglandin E₂ blockiert die IL-2-Produktion und inhibiert somit die Aktivierung der zellvermittelten Immunität, wodurch wiederum rezidivierende Infektionen mit *Candida* begünstigt werden [31,41,47,48,75,77]. PgE₂ fördert zusätzlich die Auskeimung des Hefepilzes *Candida* durch Förderung der Hyphenbildung [35,58]. Das in Kapitel 1 bereits beschriebene IFN-gamma hat in diesem Zusammenhang eine antagonistische Funktion, da es die Pilzauskeimung hemmt. Dies geschieht entweder auf direktem Weg oder indirekt über eine Hemmung der PgE₂-Produktion [35,76].

Als Ursache der Erhöhung des candidaspezifischen IgEs im Vaginalsekret sehen wir eine allergische Reaktion auf Komponenten von *Candida*, welche als Allergene wirken. Auch andere Allergene, die eine allergische Reaktion verursachen können, sind denkbar. Daher kann auch bei Patientinnen mit niedrigen Konzentrationen an candidaspezifischem IgE eine allergische Reaktion die Ursache der Beschwerden sein. PgE₂ und *Candida*-IgE müssen, speziell in Hinblick auf ein allergisches

Geschehen, gemeinsam betrachtet werden, da in Bezug auf die Pathogenese ein enger Zusammenhang zwischen diesen beiden Immunparametern besteht.

So kann es zum einen direkt durch eine Candidainfektion zu erhöhten Prostaglandin E₂- Spiegeln kommen; andererseits können diese auch als Konsequenz einer allergischen Immunantwort auftreten.

Auch Witkin et al [75] kommen in einer Studie zu dem Ergebnis, dass eine vaginale allergische Immunantwort eine chronische Candidose prädisponieren kann, indem es zu einer Induktion der PgE₂-Synthese kommt, die wiederum die zellvermittelte Immunantwort unterdrückt. Ebenso wurden in dieser Studie bei Patientinnen mit chronischen Pilzbeschwerden erhöhte Werte von Prostaglandin E₂ und candidaspezifischem IgE gefunden.

In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass Makrophagen als Antwort auf eine Candidainfektion Prostaglandin produzieren, welches die Lymphozytenproliferation als Reaktion des Organismus auf diese Infektion hemmt [73,74].

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Candida, als auch Histamin für eine gesteigerte Prostaglandin-Produktion verantwortlich sind, da beide synergistisch wirken. Ohne die Anwesenheit von Candida führte Histamin zu keiner signifikanten Erhöhung der Prostaglandinproduktion [76].

Die Ursache für das Auftreten von Rezidiven kann verschiedenste Ursachen haben, wobei die lokale Immunität der Scheide eine Schlüsselrolle spielt.

Da Candida albicans ein häufiger Organismus im Intestinaltrakt ist, besitzen viele klinisch unauffällige und gesunde Frauen eine nachweisbare candidaspezifisch-angepasste Immunität, der eine protektive Rolle zukommt [21].

Mardh et al [42] konnten 2003 zeigen, dass es bei Patientinnen mit einer Candida-Kolonisierung des Genitaltraktes signifikant häufiger auch zu einer extragenitalen Kolonisierung kommt; interessanterweise ist das Vorkommen von selteneren Stämmen als Candida albicans extragenital häufiger als dies im Genitalbereich der Fall ist. Eine extragenitale Pilzbesiedlung stellt ein Reservoir für Rekolonisierungen des Genitale dar und könne daher zu Rezidiven führen oder diese begünstigen.

Neben der zellvermittelten Immunität spielen auch allergische Geschehen eine wichtige Rolle bei Patientinnen mit Verdacht auf eine chronisch rezidivierende Vulvovaginal-Candidose. So sprechen auch Rigg et al [57] von „recurrent allergic

vaginitis“ und konnten in Ihrer Studie bei Frauen mit rezidivierender Candidose eine lokale vaginale hypersensitive Reaktion auf Candida nachweisen.

Auch Ricer et al [56] untersuchten chronisch kranke Patientinnen mit rezidivierenden vaginalen Beschwerden ohne Nachweis einer Infektion. Aufgrund einer hohen Anzahl von eosinophilen Zellen wurde auch in dieser Studie eine lokale intravaginale allergische Reaktion vermutet. Ricer et al [56] sprechen ebenso wie Rigg [57] et al von dem klinischen Syndrom der „allergischen vaginitis“, welches in weiteren Studien beschrieben wird. So zeigten Moraes et al [49] durch ihre Literaturrecherche, dass eine Vielzahl von Artikeln zu dem Thema „allergische vaginitis“ zu finden sind, die ebenfalls allergische Reaktionen des weiblichen Genitale beschreiben, wobei diese Reaktionen durch verschiedenste Allergene verursacht werden können.

Demgegenüber stehen Aussagen von Clancy et al [6] wonach die chronisch rezidivierende vulvovaginal-Candidose weniger eine IgE-vermittelte hypersensitive Störung als vielmehr eine reine Störung des Immunsystems der Mukosa aufgrund einer Reduktion von Th1-Lymphozyten darstellt. Die Antwort der Frage „Allergie oder Immunstörung“ fällt in dieser Studie zugunsten einer lokalen Immunstörung aus.

Wie oben beschrieben, zeigten unsere Ergebnisse eine Erhöhung von IL-4, PgE₂ und candidaspezifischem IgE der symptomatischen Patientinnen mit Verdacht auf CRVVC im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Subtypisierung der Patientengruppe in PCR-positive und PCR-negative Patientinnen und der jeweilige Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigte, dass die symptomatischen Patientinnen, die PCR-negativ waren, bei denen also kein Pilz nachzuweisen war, ebenso wie die PCR-positiven Patientinnen, eine signifikante Erhöhung von Interleukin-4 ($p < .0001$) und Prostaglandin E₂ ($p < .0001$) aufwiesen (Tabelle 8 und 9).

Somit könnte, unseren Ergebnissen nach, die Bestimmung sowohl von Interleukin-4 als auch von Prostaglandin E₂ bei Patientinnen, bei denen keine Pilzinfektion nachzuweisen ist, zur Ursachenklärung der Beschwerden beitragen.

Auch Witkin et al [77] konnten zeigen, dass allergische Reaktionen auf Candida albicans die Ursache von rezidivierenden Beschwerden sein können. Als verursachendes Allergen kommt neben Komponenten von Candida albicans auch der Samen des Partners in Frage [3,77]. Ito et al [32] identifizierten die Candida albicans Enolase als eines der wichtigsten Allergene, ebenso wie Ishiguro et al [31]. Diese Studien bezogen sich jedoch auf systemische Candidosen, so dass es fraglich scheint, daraus Rückschlüsse auf vaginale Candidosen zu ziehen. In weitere Studien

hingegen wurden Mannane – Homoglykane, die in der Zellwand von Hefezellen vorkommen- als wichtigste Antigene zur Bindung candidaspezifischer Antikörper identifiziert [36,68].

Wie oben beschrieben, schwächt eine vaginale Allergie die immunologische Pilzabwehr indem die TH1-vermittelte Immunantwort geschwächt wird.

Die Antwort auf eine Infektion des weiblichen Genitaltraktes variiert unter den Frauen weitaus mehr als erwartet. Da die Frauen weder genetisch identisch noch den gleichen umweltbedingten Faktoren ausgesetzt sind, ist nicht davon auszugehen, dass ein einzelner Organismus nur ein und dieselbe Immunreaktion hervorruft.

Des Weiteren unterscheiden sich Candidastämme in Hinblick auf ihre Virulenz durch die Expression verschiedener Proteasen. So ist davon auszugehen, dass rezidivierende Infektionen durch höher-virulente Subtypen verursacht werden, als einmalige Infektionen [5,50]. So konnten auch Witkin et al [77] zeigen, dass nicht nur genetische Veranlagung sondern auch Art und Quantität einer Infektion, oder auch Co-Infektionen mit anderen Erregern als Candida, Hypersensitivitätsreaktionen verursachen oder beeinflussen können und daher für die Symptomatik der Patientinnen mitverantwortlich sind.

Eine lokale Hypersensitivität bzw. vaginale allergische Reaktion muss also bei Patientinnen mit rezidivierenden Beschwerden und Verdacht auf eine CRVVC sowohl diagnostisch als auch therapeutisch in Betracht gezogen werden. Es finden sich sogar Studien [25,47], die Zusammenhänge zwischen einer allergischen Rhinitis, verursacht durch Hausstaubmilben, und einer bestehenden Vulvovaginitis, sehen [25]. Da es sich hierbei nur um eine Fallstudie handelt, kann dies vorübergehend als Einzelfall betrachtet werden, zumindest bis diese Zusammenhänge in größer angelegten Studien belegt werden können. Dieser Fall soll nur verdeutlichen, in welche Richtungen, speziell in Hinblick auf Allergie und rezidivierende Vulvovaginitis geforscht wird und eventuell geforscht werden muss.

Aufgrund der Ergebnisse unserer Studie ergeben sich sowohl neue diagnostische als auch therapeutische Aspekte. Da keine statistisch signifikanten Konzentrationsunterschiede von Interleukin-4, PgE₂, und candidaspezifischem IgE zwischen Candida-PCR-positiven, als auch Candida-PCR-negativen symptomatischen Patientinnen vorhanden waren (siehe Tabelle 8), könnten somit bei Patientinnen mit den klinischen vaginalen Symptomen einer chronisch

rezidivierenden vulvovaginalen Candidose, bei denen jedoch keine Candida-Kolonisierung nachzuweisen ist, die vorhandenen Beschwerden mittels Bestimmung von Interleukin-4, Prostaglandin E₂ und candidaspezifischem IgE verifiziert werden. Wie bereits beschrieben, sprechen erhöhte IL-4-Konzentrationen daher für eine lokale vaginale Immunsuppression, erhöhte Werte von PgE₂ können als Konsequenz einer allergischen Antwort interpretiert werden.

Bei Patientinnen mit Nachweis von candidaspezifischem IgE könnte eine allergische Reaktion auf Candida-Komponenten die Ursache einer allergischen Antwort sein.

Diese Ergebnisse zeigen neue Möglichkeiten in der Therapie der chronisch rezidivierenden vulvovaginalen Candidose auf. So könnte zum einen die Gabe von Immunstimulanzien bei Patientinnen mit lokaler Immunsuppression Vorteile zeigen. Zum anderen besteht bei Patientinnen, mit Verdacht auf eine allergische Antwort als Ursache der Beschwerden, die Möglichkeit mit Antihistaminika zu therapieren. Liegen erhöhte PgE₂ – Werte vor, könnten auch Prostaglandin-Synthese-Inhibitoren einen Benefit bringen. Diese neuen Therapieoptionen müssen jedoch erst durch Vergleiche verschiedener Therapieansätze untersucht werden.

Zahlreiche veröffentlichte Studien belegen, dass die Zukunft der Therapie der CRVVC nicht rein antimykotischer Natur sein wird, sondern dass ein Umdenken in Richtung Kombinationstherapie geht. Hierbei werden sowohl immunmodulatorische als auch antiallergische Therapieformen eine wichtige Rolle spielen [3,6,19,55,57,59,77].

So konnten Cenci et al [4] zeigen, dass die Effektivität einer antimykotischen Therapie durch die zusätzliche Gabe eines Interleukin-4-Antagonisten deutlich gesteigert werden kann, indem eine probate Th1-Antwort induziert wird. Auch Versuche mit Hyposensibilisierung wurden bereits unternommen [59] und zeigten in dieser Studie gute Ergebnisse; da in dieser Studie jedoch nur eine geringe Fallzahl untersucht wurde, bleiben weitere Ergebnisse abzuwarten.

Eine weitere immunmodulatorische Therapiemöglichkeit kommt von Clancy et al [6], wonach eine orale Immunisierung - welche die Produktion von antigenspezifischen Th1-Zellen in der Peyer'schen Plaque anregt - als neue Therapieoption angesehen werden kann.

Liegt der Verdacht einer lokalen Hypersensitivität vor kann eine Verbesserung durch eine allergische Immuntherapie mit *Candida-albicans* Extrakt erzielt werden, so Rigg et al [57].

Auch die Adenylyl - Cyclase und andere Regulatoren der cAMP Signalübertragung könnten laut Rocha et al [58] einen Ansatzpunkt für eine antimykotisch wirkende Therapie darstellen, da die Adenylyl – Cyclase essentiell für das Hyphenwachstum ist.

Die Studiengruppe um Deva et al [15] aus Berlin kommen sogar zu dem Ergebnis, dass Aspirin über eine Inhibition der 3(R) – hydroxyoxylin – Formierung einen Benefit bei der Behandlung von Patientinnen mit CRVVC darstellt.

Es finden sich zahlreiche Ansätze zur Verbesserung der Therapie von Patientinnen mit CRVVC, die auf übliche antimykotische Therapien kaum noch Besserung zeigen. Welche der Therapieoptionen in Zukunft eine gute Ergänzungstherapie – oder sogar Alternative - zu Antimykotika darstellt bleibt abzuwarten.

Unseren Daten zufolge sollten sowohl neue immunmodulatorische als auch anti - allergische Therapieformen bei Patientinnen mit CRVVC in Betracht gezogen werden und Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Krankheitsbild der chronisch rezidivierenden vulvovaginalen Candidose stellt sowohl diagnostisch als auch therapeutisch nach wie vor eine Herausforderung für den behandelnden Arzt dar.

Wir untersuchten 104 Patientinnen, die klinisch Symptome wie Erythem, Pruritus, Brennen und weißlichen Fluor aufwiesen und mbei mindestens vier Episoden pro Jahr die Diagnose einer CRVVC gestellt wurde. Als Kontrollgruppe dienten 44 asymptomatische Patientinnen ohne anamnestische Pilzinfektion.

Zum Nachweis von Candida und der Spezifizierung des Pilzes aus gewonnenem Vaginalsekret verwendeten wir sowohl die Methode der kulturellen Anzüchtung als die der PCR. Des Weiteren bestimmten wir mittels Elisa die Zytokine Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-13 wie auch ProstaglandinE₂, candidaspezifisches IgE und Gesamt-IgE aus dem Vaginalsekret.

In der Gruppe der symptomatischen Patientinnen konnte bei nur 42,3% eine Pilzinfektion mittels PCR nachgewiesen werden, kulturell sogar nur bei 29,8% der Frauen, so dass bei 57,7% keine Pilzinfektion zum Zeitpunkt der Probenentnahme nachzuweisen war. Innerhalb der asymptomatischen und klinisch befundfreien Kontrollgruppe wurden 3 Patientinnen mit Hilfe der PCR positiv auf Candida getestet. Die Auswertung der Messergebnisse von IL-5, IL-13 und Gesamt-IgE zeigte im Vergleich der symptomatischen Patientinnen mit der Kontrollgruppe keine Zusammenhänge. Signifikante Unterschiede hingegen bestanden in der Konzentration von IL-4 ($p < .0001$), PgE₂ ($p < .0001$) und candidaspezifischem IgE ($p < .02$). Auch der Vergleich der symptomatischen Patientinnen, bei denen keine Pilzinfektion nachzuweisen war, mit der Kontrollgruppe zeigte für IL-4 ($p < .0001$) und PgE₂ ($p < .0001$) signifikante Unterschiede; das candidaspezifische IgE war mit $p < 0.09$ grenzwertig signifikant. Der Nachweis von IL-4 bei symptomatischen Patientinnen deutet auf eine lokale Immnsuppression als Ursache der Beschwerden hin.

Erhöhte PgE₂ – Werte, als auch der Nachweis von candidaspezifischem IgE, sprechen für ein allergisches Geschehen als Ursache der Symptomatik.

Die Bestimmung von IL-4, PgE2 und candidaspezifischem IgE könnte somit, speziell bei symptomatischen Patientinnen ohne Pilznachweis, der Verifizierung der Beschwerden als auch der Anwendung neuer therapeutischer Möglichkeiten dienen. So könnte zum einen die Gabe von Immunstimulanzien bei erhöhten IL-4-Werten, als auch die Gabe von Antihistaminika und Prostaglandin-Synthese-Inhibitoren bei erhöhten PgE2-Konzentrationen und Nachweis von candidaspezifischem IgE neue Therapieformen und damit Besserung der chronischen Beschwerden ermöglichen. Das Ziel sollte eine Identifikation und Katalogisierung der Unterschiede in der Empfänglichkeit eines jeden Patienten für eine Infektion sein, so dass der Arzt in der Lage ist, abseits der üblichen Basistherapie eine speziell auf jede Patientin einzeln fokussiertes Therapieschema zu erstellen.

7.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Altamura M, Casale D, Pepe M, Tafaro A: Immune responses to fungal infections and therapeutic implications. *Curr Drug Immune Endocr Metabol Disord.* 1(3): 189-97, 2001
2. Barousse MM, Steele C, Dunlap K, Espinosa T, Boikov D, Dobel JD, Fidel PL Jr.: Growth inhibition of *Candida albicans* by human vaginal epithelia cells. *J Infect Dis* 184 (11):1489-93, 2001
3. Bernstein JA, Herd ZA, Bernstein DI, Korbee L, Bernstein IL: Evaluation and treatment of localized vaginal immunoglobulin E-mediated hypersensitivity to human seminal plasma. *Obstet Gynecol* 82(4 Pt 2 Suppl):667-73, 1993
4. Cenci E, Mencacci A, Del Sero G, Bistoni F, Romani L: Induction of protective Th 1 responses to *Candida albicans* by antifungal therapy alone or in combination with an interleukin-4 antagonist. *J Infect Dis* 176(1): 217-26, 1997
5. Chong PP, Lee YL, Tan BC, Ng KP: Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. *J Med Microbiol* 52(Pt 8):657-66, 2003
6. Clancy R, Corrigan E, Dunkley M, Eyers F, Beagley K: Recurrent Vulvovaginal Candidiasis-Allergy or Immune Deficiency? *Int Arch Allergy Immunol* 118:349-350, 1999
7. Comoy E, Pestel J, Stewart GA, Finkelman F, Capron A, Thyphronitis G: Do Allergens induce Type-2 Immune Responses? *Int Arch Allergy Immunol* 118:399-402, 1999

8. Corrigan EM, Clancy RL, Dunkley ML, Evers FM, Beagley KW: Cellular immunity in recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Exp Immunol* 111(3):574-8, 1998
9. Coste A, Linas MD, Cassaing S, Bernad J, Chalmeton S, Seguela JP, Pipy B: A sub-inhibitory concentration of amphotericin B enhances candidastatic activity of interferon-gamma- and interleukin-13-treated murine peritoneal macrophages. *J Antimicrob Chemother* 49(5):731-40, 2002
10. Coste A, Dubourdeau M, Linas MD, Cassaing S, Lepert JC, Balard P, Chalmeton S, Bernad J, Orfila C, Seguela JP, Pipy B: PPARgamma promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13. *Immunity* 19(3):329-39, 2003-12-02
11. Dan M, Kaneti N, Levin D, Poch F, Samara Z: Vaginitis in a gynecologic practice in Israel: causes and risk factors. *Isr Med Assoc J* 5(9):629-32, 2003-12-02
12. De Bernardis F, Santoni G, Boccanera M, Spreghini E, Adriani D, Morelli L, Cassone A: Local anticandidal immune responses in a rat model of vaginal infection by and protection against *Candida albicans*. *Infect Immun* 68(6):3297-304, 2000
13. Dennerstein GJ, Ellis DH: Oestrogen, glycogen and vaginal candidiasis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 41(3):326-8, 2001
14. De Leon EM, Jacober SJ, Sobel JD, Foxman B: Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. *BMC Infect Dis* 2(1):1, 2002
15. Deva R, Ciccoli R, Kock L, Nigam S: Involvement of aspirin-sensitive oxylipins in vulvovaginal candidiasis. *FEMS Microbiol Lett* 198(1):37-43, 2001

16. Dodson MG, Friedrich EG Jr.: Psychosomatic vulvovaginitis. *Obstet Gynecol* 51(1 Suppl): 23-25, 1978
17. Donders GG: Lower genital tract infections in diabetic women: *Curr Infect Dis Rep* 4(6):536-539, 2002
18. Eckert LO, Hawes SE, Stevens CE, Koutsky LA, Eschenbach DA, Holmes KK: Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm. *Obstet Gynecol* 92(5): 757-65, 1998
19. Faith A, Richards DF, Verhoef A, Lamb JR, Lee TH, Hawrylowicz CM: Impaired secretion of interleukin-4 and interleukin-13 by allergen-specific T cells correlates with defective nuclear expression of NF-AT2 and jun B: relevance to immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 44(9):1209-15, 2003
20. Fidel PL Jr.: Immunity to *Candida*. *Oral Dis* 8 Suppl 2:69-75, 2002
21. Fidel PL Jr.: The protective immune response against vaginal candidiasis: lessons learned from clinical studies and animal models. *Int Rev Immunol* 21(6):515-48, 2002
22. Fidel PL Jr, Barousse M, Lounev V, Espinosa T, Chesson RR, Dunlap K: Local immune responsiveness following intravaginal challenge with *Candida* antigen in adult women at different stages of the menstrual cycle. *Med Mycol* 41(2):97-109, 2003
23. Fidel PL Jr, Lynch ME, Sobel JD: *Candida*-specific cell-mediated immunity is demonstrable in mice with experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* 61(5):1990-5, 1993
24. Fidel PL Jr, Lynch ME, Sobel JD: Effects of preinduced *Candida*-specific systemic cell-mediated immunity on experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* 62(3):1032-8, 1994

25. Garcia-Aviles C, Carvalho N, Fernandez-Benitez M: Allergic vulvovaginitis in infancy: study of a case. *Allergol Immunopathol (Madr)* 29(4):137-40, 2001
26. Ghaleb M, Hamad M, Abu-Elteen KH: Vaginal T lymphocyte population kinetics during experimental vaginal candidosis: evidence for a possible role of CD8+ T cells in protection against vaginal candidosis. *Clin Exp Immunol* 131(1):26-33, 2003
27. Giraldo P, von Nowaskonski A, Gomes FA, Linhares I, Neves NA, Witkin SS: Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol* 95(3):413-6, 2000
28. Heidenreich S, Otte B, Lang D, Schmidt M: Infection by *Candida albicans* inhibits apoptosis of human monocytes and monocytic U937 cells. *J Leukoc Biol* 60(6):737-43, 1996
29. Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP: Direct isolation of *Candida* spp. From blood cultures on chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol* 41(6):2629-32, 2003
30. Ibelgaufts H: *Lexikon Zytokine*. Medikon Verlag, München, 1992
31. Ishiguro A, Homma M, Torii S, Tanaka K: Identification of *Candida albicans* antigens reactive with immunoglobulin E antibody of human sera. *Infect Immun* 69(4):1550-7, 1992
32. Ito K, Ishiguro A, Kanbe T, Tanaka K, Torii S: Characterization of IgE-binding epitopes on *Candida albicans* enolase. *Clin Exp Allergy* 25(6): 529-35, 1995
33. Izuhara K, Arima K, Yasunaga S: IL-4 and IL-13: their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1(3):263-9, 2002

34. Johnson AG: Immunologie auf 70 Seiten. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001
35. Kalo-Klein A, Witkin SS: ProstaglandinE₂ enhances and gamma interferon inhibits germ tube formation in *Candida albicans*. *Infect Immun* 58(1):260-2, 1990
36. Kanbe T, Morishita M, Ito K, Tomita K, Utsunomiya K, Ishiguro A: Evidence for the presence of immunoglobulin E antibodies specific to the cell wall phosphomannoproteins of *Candida albicans* in patients with allergies. *Clin Diagn Lab Immunol* 3(6):645-50, 1996
37. Kapsenberg ML, Wierenga EA, Bos JD, Jansen HM: Aberrant T cell regulation of IgE production in atopy. *Eur Respir J Suppl* 13:27s-30s, 1991
38. Katsifa H, Tsaparidou S, Diza E, Gil-Lamaignere C, Walsh TJ, Roilides E: Effects of interleukin-13 on antifungal activity of human monocytes against *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 31(3):211-7, 2001
39. Kimura M, Tsuruta S, Yoshida T: IFN-gamma plays a dominant role in upregulation of *Candida*-specific IgE synthesis in patients with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 122(3):195-9, 2000
40. Linhares LM, Witkin SS, Miranda SD, Fonseca AM, Pinotti JA, Ledger WJ: Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for *Candida* species by culture. *Infect Dis Obstet Gynecol* 9(4):221-5, 2001
41. Maccato ML, Kaufman RH: Fungal vulvovaginitis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 3(6):849-52, 1991
42. Mardh PA, Novikova N, Stukalova E: Colonisation of extragenital sites by *Candida* in women with recurrent vulvovaginal candidosis. *BJOG* 110:934-937, 2003

43. Mardh PA, Novikova N, Witkin SS, Korneeva I, Rodrigues AR: Detection of candida by polymerase chain reaction vs microscopy and culture in women diagnosed as recurrent vulvovaginal cases. *Int J STD AIDS* 14(11):753-6, 2003
44. Mardh PA, Rodrigues AG, Genc M, Novikova N, Martinez-de-Oliviera J, Guaschino S: Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis—a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. *Int J STD AIDS* 13(8):522-39, 2002
45. Marrazzo J: Vulvovaginal candidiasis. *BMJ* 326:993-994, 2003
46. Metzner G, Weissenbacher ER: *Candidainfektionen des weiblichen Genitaltraktes*. Medifact publishing, München, 1. Auflage 1999
47. Moraes PS: Recurrent vaginal candidiasis and allergic rhinitis: a common association. *Ann Allergy Asthma Immunol* 81(2):165-9, 1998
48. Moraes PS, de Lima Goiaba S, Taketomi EA: Candida albicans allergen immunotherapy in recurrent vaginal candidiasis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 10(5):305-9, 2000
49. Moraes PS, Taketomi EA: Allergic vulvovaginitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 85(4):253-65; quiz 265-7, 2000
50. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D, Agabian N, Challacombe SJ: Differential expression of Candida albicans secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis* 188(3):469-79, 2003

51. Nikitin MV, Artemova LV, Kravtsov EG, Dalin MV, Radzinskii VE, Doyle RJ: Study of *Candida albicans* Strains Isolated from Women with Various Forms of Vaginal Candidiasis. *Bull Exp Biol Med* 135(3):276-80, 2003
52. Novikova N, Rodrigues A, Mardh PA: Can the diagnosis of recurrent vulvovaginal candidosis be improved by use of vaginal lavage and cultures on chromogenic agar? *Infect Dis Obstet Gynecol* 10(2):89-92, 2002
53. Patella V, Giuliano A, Florio G, Bouvet JP, Marone G: Endogenous Superallergen Protein Fv Interacts with the V_H3 Region of IgE to Induce Cytokine Secretion from human Basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 118:197-199, 1999
54. Piccinni MP, Vultaggio A, Scaletti C, Livi C, Gomez MJ, Giudizi MG, Biagiotti R, Cassone A, Romagnani S, Maggi E: Type 1 T helper cells specific for *Candida albicans* antigens in peripheral blood and vaginal mucosa of women with recurrent vaginal candidiasis. *J Infect Dis* 186(1):87-93, 2002
55. Pirotta MV, Gunn JM, Chondros P: "Not thrush again!" Women`s experience of post-antibiotic vulvovaginitis. *Med J Aust* 179(1):43-6, 2003
56. Ricer RE, Guthrie RM: Allergic vaginitis, a possibly new syndrome. A case report. *J Reprod Med* 33(9):781-3, 1988
57. Rigg D, Miller MM, Metzger WJ: Recurrent vulvovaginitis: treatment with *Candida albicans* allergen immunotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 162(2):332-6, 1990
58. Rocha CR, Schroppel K, Harcus D, Marcil A, Dignard D, Taylor BN, Thomas DY, Whiteway M, Leberer E: Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 12(11):3631-43, 2001

59. Rosedale N, Browne K: Hyposensitisation in the management of recurring vaginal candidiasis. *Ann Allergy* 43(4):250-3, 1979
60. Saito A, Okazaki H, Sugawara I, Yamamoto K, Takizawa: Potential Action of IL-4 and IL-13 as Fibrogenic Factors on Lung Fibroblasts in vitro. *Int Arch Allergy Immunol* 132:168-176, 2003
61. Saporiti AM, Gomez D, Levalle S, Galeano M, Davel G, Vivot W, Rodero L: Vaginal candidiasis: etiology and sensitivity profile to antifungal agents in clinical use. *Rev Argent Microbiol* 33(4):217-22, 2001
62. Savolainen J, Lintu P, Kosonen J, Kortekangas-Savolainen O, Viander M, Pene J, Kalimo K, Terho EO, Bousquet J: Pityrosporum and Candida specific and non-specific humoral, cellular and cytokine responses in atopic dermatitis patients. *Clin Exp Allergy* 31(1):125-34, 2001
63. Singh S, Sobel JD, Bhargava P, Boikov D, Vazquez JA: Vaginitis due to Candida krusei: epidemiology, clinical aspects and therapy. *Clin Infect Dis* 35(9):1066-70, 2002
64. Sobel JD: Management of patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Drugs* 63(11):1059-66, 2003
65. Sobel JD: Treatment of vaginal Candida infections. *Expert Opin Pharmacother* 3(8):1059-65, 2002
66. Sobel JD: Vulvovaginal candidiasis: a comparison of HIV-positive and – negative women. *Int J STD AIDS* 13(6):358-62, 2002
67. Taylor BN, Saavedra M, Fidel PL Jr.: Local Th1/Th2 cytokine production during experimental vaginal candidiasis: potential importance of transforming growth factor-beta. *Med Mycol* 38(6):419-31, 2000

68. Tomsikova A, Sach J, Zavazal V, Masler L, Novackova D: Immunodiagnosis of candida-infections. I. Sensitivity of the antigens. *Mycopathologia* 71(2):103-11, 1980
69. Wauwe JV: Interleukin-5 as a potential target for asthma treatment. *Drug News Perspect* 13(4):197-205, 2000
70. Weissenbacher ER: Fluorpraktikum, 4. Neuauflage Medifact Publishing, München, 77-97, 2001
71. Weissenbacher ER, Weissenbacher S, Witkin S, Tolbert V, Ledger WJ: Diagnostik und Therapie der chronisch rezidivierenden Vulvo-Vaginal-Candidose (CRVVC). *Infektionen im neuen Millennium*, 1. Auflage Medifact Publishing, München, 25-29, 2002
72. Wilton L, Kollarova M, Heeley E, Shakir S: Relative risk of vaginal candidiasis after use of antibiotics compared with antidepressants in women: postmarketing surveillance data in England. *Drug Saf* 26(8):589-97, 2003
73. Witkin SS: Immunology of recurrent vaginitis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 15(1):34-7, 1987
74. Witkin SS, Hirsch J, Ledger WJ: A macrophage defect in women with recurrent *Candida* vaginitis and its reversal in vitro by prostaglandin inhibitors. *Am J Obstet Gynecol* 155(4):790-5, 1986
75. Witkin SS, Jeremias J, Ledger WJ: A localized vaginal allergic response in women with recurrent vaginitis. *J Allergy Clin Immunol* 81(2):412-6, 1988
76. Witkin SS, Kalo-Klein A, Galland L, Teich M, Ledger WJ: Effect of *Candida albicans* plus histamine on prostaglandin E2 production by peripheral blood mononuclear cells from healthy women and women with recurrent candidal vaginitis. *J Infect Dis* 164(2):396-9, 1991

77. Witkin SS, Linhares I, Giraldo P, Jeremias J, Ledger WJ: Individual immunity and susceptibility to female genital tract infection. *Am J Obstet gynecol* 183:252-256, 2000
78. Wongpiyabovorn J, Suto H, Ushio H, Izuhara K, Mitsuishi K, Ikeda S, Nakao A, Okumura K, Ogawa H: Up-regulation of interleukin-13 receptor alpha1 on human keratinocytes in the skin of psoriasis and atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 33(1):31-40, 2003
79. Wozniak KL, Wormley FL Jr, Fidel PL Jr: Candida-specific antibodies during experimental vaginal candidiasis in mice. *Infect Immun* 79(10):5790-9, 2002
80. Zabeau L, Gevaert P, Bachert C, Tavernier J: Interleukin-5, eosinophilic diseases and therapeutic intervention. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2(4):319-28, 2003

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. E.R. Weissenbacher für die Überlassung des Themas und die wertvolle Unterstützung und durchgehende Beratung im Rahmen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Spitzbart danke ich für die fachliche Beratung auf dem Gebiet der Mykologie und organisatorische Unterstützung.

Herrn Prof. Steven S. Witkin, PhD, danke ich für seine hilfreiche Unterstützung, sowohl im Vorfeld dieser Studie als auch im Abschluss, in der Interpretation und Auswertung der Messergebnisse, speziell auf dem Gebiet der Immunologie.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Michael Unterhalt für seine unermüdliche Hilfe und Unterstützung bei statistischen Fragen.

Frau Dr. V. Tolbert danke ich für die fachliche Unterstützung und hilfreiche Zusammenarbeit als auch für die Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen.

CURRICULUM VITAE

Name: Tobias Marcus Weissenbacher

Adresse: Fuggerstr. 4
81373 München

e-Mail: tweissenbacher@hotmail.com

Geburtsdatum: 13.12.1973

Geburtsort: München

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

SCHULAUSSBILDUNG:

1980 - 1984	Grundschule Pöcking
1984 - 1993	Gymnasium Starnberg, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

ZIVILDienst:

1994 - 1995	Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern, München
-------------	---

STUDIUM:

1995 - 1997	Musikstudium, Freies Musikzentrum, München e.V.
seit Mai 1996	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
August 1998	Ärztliche Vorprüfung
August 1999	1. Staatsexamen
März 2002	2. Staatsexamen
Mai 2003	3. Staatsexamen

PRAKTIKA:	September - November 1993	Nebentätigkeit in der Radiologie im Klinikum Großhadern, München
	März - April 1997	Pflegepraktikum im Klinikum Großhadern, München
Famulaturen:	Oktober 1998	Unfallchirurgie im Klinikum Großhadern, München
	März 2000	Orthopädische Praxis Prof. Dr. W. Pförringer, München
	September 2000	Radiologie im Klinikum Großhadern, München
	April 2001	Gynäkologie im Klinikum Großhadern, München
	September 2001	Neurochirurgie im Klinikum Großhadern, München
Praktisches Jahr:	April – August 2002	1. Tertial des Praktischen Jahres in der Chirurgie im Krankenhaus München-Harlaching
	August – November 2002	2. Tertial des Praktischen Jahres in der Inneren Medizin im Krankenhaus München-Harlaching
	November 2002 - März 2003	3. Tertial des Praktischen Jahres in der Gynäkologie im Klinikum Großhadern, München
Arzt im Praktikum:	Seit 01. März 2004	I. Universitätsfrauenklinik Maistraße