

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

(Direktor: Prof. Dr. K. Friese)

**„SERION ELISA antigen Candida“ im Vergleich zu  
Kultur und PCR als Nachweisverfahren bei Vulvovaginalcandidosen**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Maria Brigitte Kollmer

aus

Deggendorf

2009



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Frank Ebel

Priv. Doz. Dr. Tina Buchholz

Prof. Dr. Hans C. Korting

Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:

Dr. rer. biol. hum. G. Anton

Prof. Dr. med. H. Spitzbart

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

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2009



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Problemstellung .....	7
3	Material und Methoden.....	8
3.1	Material.....	8
3.1.1	Geräte.....	8
3.1.2	Material für die kulturelle Anzuchtung.....	8
3.1.3	Material für die DNA-Extraktion nach Methode A.....	8
3.1.4	Material für die DNA-Extraktion nach Methode B .....	9
3.1.5	Material für die Durchführung der PCR.....	9
3.1.6	Material für die Gelelektrophorese .....	10
3.1.7	Material für den Candida-Antigen-Elisa.....	11
3.2	Methoden .....	12
3.2.1	Studiengruppe .....	12
3.2.2	Probengewinnung .....	12
3.2.3	Kultur .....	13
3.2.3.1	Sabouraud-Flüssigmedium .....	13
3.2.3.2	Chromagarplatten.....	13
3.2.4	Durchführung der Candida-PCR.....	15
3.2.4.1	DNA-Extraktion.....	15
3.2.4.1.1	DNA-Extraktion nach Methode A .....	15
3.2.4.1.2	DNA-Extraktion nach Methode B .....	16
3.2.4.2	Durchführung der Candida-PCR.....	18
3.2.4.3	Gelelektrophorese .....	20
3.2.4.3.1	Methode der Herstellung des Agarosegels .....	20
3.2.4.3.2	Methode der Herstellung des Laufpuffers .....	20
3.2.4.3.3	Methode der Herstellung des DNA-Längenstandards .....	21
3.2.4.3.4	Durchführung der Gelelektrophorese .....	21

3.2.5	Candida-Elisa .....	22
3.2.5.1	Testprinzip .....	24
3.2.5.2	Durchführung des Elisa.....	25
3.2.5.2.1	Vorbereitung der Proben.....	25
3.2.5.2.2	Testdurchführung.....	25
3.2.5.2.3	Verdünnungsreihen.....	26
3.2.5.2.4	Mischungsverhältnis 1:1 .....	27
4	Ergebnisse.....	28
4.1	Candidanachweis in Kultur, PCR und Elisa .....	28
4.1.1	Kultur .....	28
4.1.2	PCR.....	28
4.1.3	Elisa.....	31
4.1.4	Kultur, PCR, Elisa – Ergebnisse im Vergleich.....	32
4.1.5	Ergebnisse der Verdünnungsreihen .....	35
4.1.6	Ergebnis im Mischungsverhältnis 1:1.....	37
4.2	Auswertung.....	38
4.2.1	Sensitivität und Spezifität des Elisa in Abhängigkeit von der PCR .....	38
4.2.2	Sensitivität und Spezifität des Elisa in Abhängigkeit von der Kultur .....	39
5	Diskussion.....	40
6	Zusammenfassung.....	50
7	Literaturverzeichnis .....	52
8	Anhang.....	57
8.1	Abkürzungen.....	57
8.2	Tabellenverzeichnis .....	58
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	58
8.4	Geräte.....	59
	Danksagung.....	60
	Lebenslauf.....	61

## 1 Einleitung

Die Vulvovaginalcandidose gilt heute als eine opportunistische Erkrankung, die fast immer durch fakultativ pathogene imperfekte Pilze der Gattung *Candida* verursacht wird (Weissenbacher et al. 2001; Sobel 2007). Diese Hefepilze sind als normale Kommensalen häufig, zumindest transient, im Orointestinaltrakt, auf der Haut und in der Vagina zu finden (Ansorg 2008). Das bedeutet, dass es neben der Kolonisation der Vaginalschleimhaut auch einer systemischen oder lokalen Disposition bedarf, damit eine Mykose, also eine durch Pilze verursachte Infektion und ihre damit verbundenen Symptome, entstehen kann. Eine asymptomatische Besiedelung mit Sprosspilzen tritt bei etwa 10-20% der prämenopausalen, gesunden, nichtschwangeren Frauen auf (AWMFonline 08/2006). Somit ist der alleinige Nachweis von *Candida* ohne klinische Symptomatik außerhalb der Gravidität ohne klinische Relevanz (Mylonas et al. 2007).

Die Symptome einer Vulvovaginalmykose umfassen je nach Schweregrad Juckreiz, Brennen, weißen, bröckeligen Fluor vaginalis bis hin zur Kolpitis (Mendling 2001).

Eine der ersten genauen Beschreibungen des klinischen Erscheinungsbildes einer Vaginalmykose stammt von Martin aus dem Jahre 1856: „Am 15. October 1855 wurde die geburts-hülfliche Poliklinik zu Jena für die angeblich an lästigem, die Nachtruhe raubendem Brennen und Jucken der Genitalien nebst Schleimfluss leidende Z. in einem benachbarten Dorfe verlangt. (...) Nachdem ich die Kranke in die unter meiner Leitung stehende Gebäranstalt (...) aufgenommen, ergab die Untersuchung mit dem Speculum eine intensive Röthung und ungewöhnliche Schwellung der ganzen Scheide, und den gedachten weisslich-fleckigen Belag über die Schleimhaut ausgebreitet“ (Martin 1856).

Obwohl schon in der Antike Hippokrates und Galen Soor als klinisches Erscheinungsbild beobachteten (Scheininger 2004), dauerte es fast bis zur Mitte des 19. Jahrhunderts bis der Erreger der Soorerkrankung entdeckt wurde. Die erste Veröffentlichung, in der ein Hefepilz für vaginalen Fluor verantwortlich gemacht wurde, stammt aus dem Jahr 1849 (Wilkinson 1849).

In der 2. Hälfte des 19. Jahrhunderts erfolgten weitere Beschreibungen und Veröffentlichungen über den Pilz. Hier waren es vornehmlich Kinderärzte und Dermatologen, die intensiv an dessen Erforschung arbeiteten (Meinhof 1991; Scheininger 2004).

„Über Scheidenmykosen“ berichtete zum ersten Mal von Herff zusammenfassend im Jahre 1895 (von Herff 1895). Darin schildert er seine systematisch gesammelten Beobachtungen über die Colpitis mycotica bei Schwangeren und prämenopausalen Frauen und diskutiert seine Befunde mit der damaligen Literatur.

In den Folgejahren wurden zahlreiche wissenschaftliche Beiträge zu diesem Thema, denen stets mikroskopische Untersuchungen und Anzüchtungen in Nährgelatine, Agar oder Blutserum zugrunde lagen, veröffentlicht, bis schließlich der französische Dermatologe Sabouraud in seinem Werk „Les teignes“ die Vielzahl der neu entdeckten und gezüchteten Pilzarten ordnete (Sabouraud 1910). „Les teignes“ galt über Jahrzehnte als Standardwerk der medizinischen Mykologie (Bruhns et al. 1928). Sabouraud war es auch, der ab 1892 die Technik der Anzüchtung von Reinkulturen auf einem standardisierten Nährboden, dem heute noch gebräuchlichen Sabouraud-Glucose-Agar, einführte.

Auch in der deutschsprachigen Gynäkologie und Geburtshilfe sind Pilzkrankungen seit circa 150 Jahren bekannt. Lange Zeit wurden mykologische Themen von Dermatologen und Mikrobiologen wie zum Beispiel von Unna, Kaufmann-Wolf und Seeliger bearbeitet (Meinhof 1991). Als Begründer der Mykologie in Deutschland gilt der Arzt Schönlein, der aufgrund mikroskopischer Untersuchungen vermutete, dass Hauterkrankungen des Menschen durch Pilze verursacht werden könnten (Schönlein 1856).

Auf dem Gebiet der gynäkologischen Mykologie galt das Interesse der Forscher Martin, Haußmann, v. Winckel, Döderlein und Colpe den Vaginalmykosen und deren Therapiemöglichkeiten (Scheininger 2004).

Im 1930 erschienenen „Handbuch der Gynäkologie“ fasste Nürnberger in dem Kapitel „Pilzkrankungen der Scheide“ den damals aktuellen Erkenntnisstand zusammen. Neben einer genauen morphologischen Schilderung des Soorpilzes beschrieb er darin den Unterschied zwischen dem latenten Soormikrobismus, also der asymptomatischen Besiedelung der Vagina, und der echten Kolpitis mycotica (Nürnberger 1930).

Parallel zur Entdeckung der ersten Antimykotika (Nystatin 1950 sowie Griseofulvin 1958) entstanden nach den Kriegsjahren zahlreiche Pilzforschungslaboratorien in Deutschland. Als herausragende deutsche Wissenschaftler dieser Zeit gelten Seeliger, Grimmer, Schabinski, Polemann, Götz und Marchionini (Meinhof 1991; Scheininger 2004). Anfang der 60iger Jahre kam es zur Gründung mehrerer mykologischer Fachgesellschaften auf nationaler und internationaler Ebene. So wurde 1961 in Westdeutschland durch Hans Götz die Deutschsprachige Mykologische Gesellschaft (DmykG e.V.) gegründet, die bis heute als gewichtige nationale Gesellschaft besteht.

Der deutsche Mykologe Rieth veröffentlichte 1973 seine bis dato gültige Einteilung der Erreger von Mykosen nach dem D-H-S-System. Demnach sind nicht Dermatophyten oder Schimmelpilze, sondern Hefen, besonders der Gattung *Candida*, für Vulvovaginalmykosen verantwortlich (Rieth 1973).

Aktuelle Daten belegen, dass eine vulvovaginale Hefepilzinfektion in 80-90% durch *Candida albicans*, in 5-10% durch *Candida glabrata* und in 1-3% durch *Candida krusei* oder andere *Candida*-Arten verursacht wird (AWMFOonline 08/2006; Mendling 2002; Anderson et al. 2004; Sobel 2007). Die exakte Feststellung der jeweils vorliegenden *Candida*-Art ist deshalb so wichtig, da diese die Behandlung mit unterschiedlichen medikamentösen Therapeutika erfordern (AWMFOonline 08/2006). Die aktuellen Leitlinien zur Vulvovaginalcandidose empfehlen, die jeweilige Erkrankung mit dem verursachenden Erreger in der Bezeichnung zu verbinden, z.B. „*Candida albicans*-Vaginitis“ (AWMFOonline 08/2006; Odds et al. 1992).

Zur Stellung der exakten Diagnose einer mutmaßlichen Vulvovaginalcandidose ist demzufolge ein Erregernachweis notwendig. Nach dem Erfassen der klinischen Symptome ist die unverzichtbare Basis dafür das Betrachten von nativem Vaginalsekret unter dem Mikroskop bei entsprechender Vergrößerung. Schon 1856 beschrieb der Jenaer Frauenarzt Martin eindrucksvoll den mikroskopischen Befund eines vaginalen Pilzbefalles: „Unter dem Mikroskop erschien dieser Beleg aus einfachen, platten Epithelien, welche zum Theil noch eng aneinander hafteten, aus Schleim und Eiterkörperchen und aus einer Unmasse von Pilzfäden zusammengesetzt und auf das mannigfaltigste verfilzt. In und auf den Epithelien sassen die Pilzfäden, waren gegliedert, an den Gliedern verästelt, und an dem Ende stellenweise kolbig angeschwollen.; daneben fanden sich zahlreiche länglich-runde Sporen.“ (Martin 1856).

Heute werden dafür üblicherweise Phasenkontrastmikroskope in 250-facher bis 400-facher Vergrößerung benutzt, welche plastischere Bilder als ein Hellfeld-Mikroskop erzeugen (Weissenbacher et al. 2001). Das Präparat wird auf einen Objektträger mit einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung aufgebracht. Durch Färbungen werden keine besseren Resultate erzielt als nativ (Mendling 2006). In der dermatologischen Praxis wird durch Zugabe von 10-15%iger Kalilauge eine Auflösung der Hornschuppen der Haut erreicht, sodass man anschließend systematisch das Präparat mikroskopieren kann (Mendling 2001). Dabei ist es abhängig von der Keimzahl und der Dauer der Beschwerden, ob Hefezellen oder Myzelien gefunden werden können oder nicht. Doch selbst für erfahrene Untersucher kann die mikroskopische Diagnosestellung schwierig und fehlerbehaftet sein (Engberts et al. 2007).

Nach Perry und Miller besteht eine weitere Methode zur Identifikation von *Candida albicans* in der Erzeugung einer spezifischen Fluoreszenz. Durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes auf den beimpften Objektträger kommen nach Anlagerung an das Chitin der Zellwand Sprosszellen und Pseudomyzelien eindrucksvoll zur Darstellung (Perry et al. 1987; Weissenbacher et al.

2001). Dieses Verfahren ist aber wenig spezifisch, sodass es speziellen histologischen Fragestellungen vorbehalten bleibt.

Da die Auswertung eines Nativpräparates eine geringe Sensitivität aufweist und von der mikroskopischen Erfahrung des jeweiligen Untersuchers abhängt (AWMFonline 08/2006; Engberts et al. 2007), ist es zweckmäßig, eine Pilzkultur anzulegen. Diese Empfehlung gilt bereits seit der Jahrhundertwende. So riet der deutsche Gynäkologe Nürnberger neben dem Untersuchen von gefärbten Ausstrichpräparaten zum kulturellen Nachweis auf 3%igem Bierwurze-Agar (Nürnberger 1930).

Heute wie damals wird zur Anzüchtung von Sprosspilzen Vaginalsekret mit einem Spekulum oder Wattetupfer auf Sabouraud-Glukose-Agar, Kimmig-Agar oder einem anderen geeigneten Agar ausgestrichen. Die Kultur wird anschließend bei 37°C im Brutschrank bebrütet und nach 24-48 Stunden auf das Wachstum von Sprosspilzen hin kontrolliert. Dem Nährboden zugesetzte Antibiotika hemmen ein Anwachsen der bakteriellen Flora und ermöglichen dadurch den Hefen ein charakteristisches Wachstum mit typischem Geruch (Mendling 2006). Sogenannte „Chromagar-Platten“ erlauben aufgrund farblicher Unterschiede der Kolonien eine verlässliche Spezifizierung von klinisch wichtigen Hefearten, sodass eine Differenzierung im Labor meist entbehrlich ist (Mardh et al. 2002; BDDiagnosticSystems 2005). Sie enthalten chromogene Substrate, die beim Anwachsen einer Pilzkolonie eine charakteristische Färbung und Morphologie der Kolonie hervorbringen und somit eine zuverlässige Artbestimmung ermöglichen (Odds et al. 1994). Festagarplatten erlauben die Beurteilung einer typischen Morphologie der Hefepilzkolonien, während Flüssignährmedien ein um wenige Prozent besseres Wachsen auch bei kleinem Inokulum ergeben (AWMFonline 08/2006).

Im Falle einer positiven Hefepilzkultur kann *Candida albicans* durch Überimpfung auf eine Subkultur identifiziert werden. Hierfür wird ein Agar aus dem nährstoffarmen Filtrat von gekochtem Brühreis verwendet (Taschdjian et al. 1960). Auf diesem Reisagar wächst *Candida albicans* unter Ausbildung von pathognomonischen dickwandigen Chlamydosporen.

Zur sicheren Identifizierung der *Candida*-Art kann auch eine biochemische Differenzierung durch Zuckerfermentation und -assimilation erfolgen, da viele Arten über charakteristische fermentative und oxidative Stoffwechselwege verfügen. Ein Beispiel hierfür ist das API-32C-Auxanogramm (Mendling 2006).

Mit dem Fortschritt der technischen Möglichkeiten wurden im 20. Jahrhundert zunehmend nicht-kulturelle Nachweismethoden entwickelt. Es handelt sich dabei um immunologische, molekularbiologische und genetische Verfahren (Bangsow et al. 2007; Ansorg 2008). Diese sind aber im Bereich der Vulvovaginalcandidosen bislang noch wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten.

Die immunologische Methode der Bestimmung von Antikörpern gegen *Candida* im Serum wird bei Vulvovaginalcandidosen für nicht sinnvoll erachtet, da man heute weiß, dass oberflächliche Mykosen bei Gesunden eine lokale Antwort hervorrufen und keine Titerveränderungen verursachen (Mendling 2006). Für die Messung des Antigengehaltes in Scheidenspülungen stehen keine evidenten Tests zur Verfügung (Evans 1990). Die Ermittlung des Antikörpergehaltes im Scheidensekret ist mit Test-Kits, die für die Analyse von biologischen Proben konzipiert sind, mit guten Ergebnissen möglich. Auch Immunglobuline und Zytokine können im Vaginalsekret gemessen werden. Die daraus gewonnenen Daten und Erkenntnisse werden intensiv zur Erforschung der Vulvovaginalcandidosen genutzt.

Seit den 90iger Jahren stehen molekularbiologische Nachweismethoden zur Verfügung. Da diese Techniken aber arbeitsaufwändig und zeitintensiv sind, werden sie vor allem im Rahmen von epidemiologischen Studien oder zur Klärung von wissenschaftlichen Fragestellungen angewandt (Schonian et al. 1996). Allerdings gilt der Nachweis von *Candida* mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) als Goldstandard (Tabrizi et al. 2006; Weissenbacher et al. 2008).

Mit der PCR konnte 1987 Kary B. Mullis eine revolutionäre Methode zur Vermehrung von DNA-Abschnitten etablieren, die sich durch eine hohe Spezifität und Sensitivität auszeichnet (Saiki et al. 1988). Dabei werden nach der Isolation der DNA aus den Zellen *Candida*-spezifische DNA-Abschnitte des Genoms vervielfältigt (=Amplifikation). Bei der PCR wird die vorher gewonnene DNA *in vitro*, d.h. in einem Röhrchen, durch eine DNA-Polymerase vermehrt und dann durch Anfärben in einer Gelelektrophorese nachweisbar. Als Startpunkte werden hefe-spezifische Universalprimer (=synthetische DNA-Oligonucleotide) eingesetzt, die gruppenspezifische Abschnitte von *Candida* spezie vermehren (Bangsow et al. 2007). Da auf diese Art aber nur wahllos polymorphe DNA-Stränge amplifiziert werden können, wurden molekulare Typisierungsverfahren entwickelt, um auch einzelne Stämme voneinander zu unterscheiden und z.B. deren epidemiologische Verwandtschaften aufzuzeigen. Die Southern Hybridisation und die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) sind Methoden, die reproduzierbare Ergebnisse liefern und eine bessere Differenzierung zwischen verschiedenen *Candida*-Stämmen erlauben (Reiss et al. 1998).

SHIN et al. (Shin et al. 1997) verwendeten die PCR zum Nachweis von *Candida* spp. in Kombination mit einem EIA (Enzymimmunoassay).

Einige Autoren führten zur Bestätigung der Speziesdifferenzierung im Anschluss an die PCR einen restriktionsenzymatischen Verdau der Amplifikate einen sog. RFLP (= Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) durch oder setzten direkt genomische DNA ein, ohne zuvor ein bestimmtes Genfragment zu amplifizieren (Bangsow et al. 2007). Durch spezies-spezifische Schnittstellen der eingesetzten Restriktionsenzyme zeigen sich dann arteigene Bandenmuster.

*Candida* spezies steht auch im Zentrum genetischer Forschungen. So wird derzeit beispielsweise an der Stanford University in Pao Alto, Kalifornien, intensiv an der kompletten Entschlüsselung des Genoms des *Candida albicans*-Stammes SC5314 gearbeitet (Chibana et al. 2005). Das diploide Genom mit einer Gesamtgröße von 15,6 Mb enthält 8 Chromosomenpaare, von denen 7 eine konstante Größe haben. Das achte ist polymorph bei einer Größe zwischen etwa 3,2 und 4,0 Mb. Mittels der „Whole-genome-shotgun-sequencing“-Methode konnte an der Stanford University 2005 das Chromosom 7 entschlüsselt werden (Chibana et al. 2005). Es enthält 404 Gene und wurde in seiner kompletten Sequenz analysiert.

Ausgehend von der Entschlüsselung des gesamten Genoms von Chromosom 7 konnten beispielsweise Anpassungsstrategien von *Candida albicans* identifiziert werden. So kommt es durch strukturelle und numerische Chromosomen-Rearrangements über eine veränderte Genexpression zu Änderungen des Phänotyps (Jones et al. 2004).

Die Erkenntnisse auf dem Gebiet der Genomforschung führten zur ersten Entwicklung von DNA-Microarrays und DNA-Chip-Techniken, die aber noch einzelnen spezialisierten Zentren vorbehalten sind. Nichtsdestotrotz wird diesen Verfahren zur computergestützten Genexpressionsanalyse ein hohes Potential für die zukünftige *Candida*-Diagnostik zugeschrieben (Garaizar et al. 2006).

Das Fehlen von schnellen, einfachen und kostengünstigen Nachweisverfahren hat weiterhin sowohl Über- als auch Unterdiagnostik des vulvovaginalen *Candida*-Befalles zur Folge (Sobel 2007). Da jedoch der exakte mykologische Befund die Basis für eine sinnvolle Therapie ist, egal welches Organ des Körpers vom Pilz befallen ist (Weissenbacher et al. 2001), werden neben den verfügbaren Diagnostika immer wieder innovative Verfahren erprobt, wie auch in der vorliegenden Arbeit geschehen.

## 2 Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es herauszufinden, ob sich der Candida-Elisa „SERION ELISA *antigen* Candida“ zum qualitativen Nachweis von Candida spezie in Vaginalsekret eignet. Bei dem Test handelt sich um einen Enzym-linked-immuno-sorbent-assay zum Nachweis von candidaspezifischen Antigenen, der zur Bestimmung einer Candida-Fungämie im humanen Serum zugelassen ist (Virion\Serion 2005).

Bei den Candida-Antigenen handelt es sich um spezifische Polysaccharide der Zellwand von Candida spezie, sogenannte Mannane (Chaffin et al. 1998). Da sie bei jeder Besiedelung oder Infektion mit Candida spezie vorhanden sind, müsste ihr Nachweis im Serum wie auch im Vaginalsekret gelingen.

Um den „SERION ELISA *antigen* Candida“ auf seine Eignung für den Candida-Nachweis im Vaginalsekret zu untersuchen, verglichen wir ihn mit den etablierten Methoden der kulturellen Anzucht und der PCR. Wir wählten zum einen die kulturelle Anzucht, weil sie in der klinischen Routine nach Anamnese, klinischem Befund und Mikroskopie die Methode der Wahl zum Candida-Nachweis ist (AWMFOonline 08/2006; Zdolsek et al. 1995; Stauber 2005). Zum anderen führten wir den Nachweis von candidaspezifischer DNA mittels PCR durch, da dies die sensitivste Methode zum Candidanachweis im Vaginalsekret ist (Tabrizi et al. 2006; Weissenbacher et al. 2008).

Gelänge ein ausreichend sensibler und spezifischer Nachweis von Candida-Antigenen mittels des „SERION ELISA *antigen* Candida“ im Vaginalsekret im Vergleich zu den etablierten Untersuchungsverfahren, wäre dies eine innovative Methode, um kostengünstig in kurzer Zeit viele Patientenproben zu untersuchen. So könnte der bestehenden Über- und Unterdiagnostik des vulvovaginalen Candida-Befalles (Sobel 2007) in der klinischen Routine abgeholfen werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Eine Übersicht über die verwendeten Geräte findet sich im Anhang unter Kap. 8.4.

##### 3.1.2 Material für die kulturelle Anzucht

Die Röhren mit Sabouraud-Flüssigmedium wurden von der Firma bioMérieux (Marcy l'Etoile, Frankreich) bezogen.

Die Chromagarplatten BBL CHROMagar Candida® stammten von BectonDickinson (New York, USA).

##### 3.1.3 Material für die DNA-Extraktion nach Methode A

###### Aqua ad injectabilia

###### Lytikase-Lösung

Zusammensetzung von 8,6 ml 0,11% Lytikase-Lösung

Lytikase	9,5 mg	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
PBS	6,7 ml	Invitrogen Corporation, Paisley, Scotland
0,5 M EDTA	1,7 ml	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
2-Mercaptoethanol	168 µl	Sigma, St. Louis, Missouri/USA

###### PBS

Invitrogen Corporation, Paisley, Scotland

###### Lysis-Puffer

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Dtl.

###### NID-Puffer

Zusammensetzung von 50 ml Nonionic Detergent Puffer

1 M KCl	2,5 ml	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
1 M Tris	0,5 ml	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
1 M MgCl <sub>2</sub>	125 µl	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
Brij 35	0,5 g	Sigma, St. Louis, Missouri/USA

###### Proteinkinase K

5,0 mg/ml Sigma, St. Louis, Missouri/USA

### 3.1.4 Material für die DNA-Extraktion nach Methode B

Das Kit zum Herauslösen der DNA aus Hefezellen setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenzien	Zusammensetzung
Zellsuspensionslösung	Tris, Aminomethan, EDTA, Sorbitol
Lytic-Enzym-Lösung	4000 U/ml
Zell-Lysis-Lösung	Tris, EDTA, SDS
Protein-Ausfäll-Lösung	Ammoniumacetat
DNA-Hydratations-Lösung	Tris, EDTA
RNase A-Lösung	80 U/ml

Tab. 1: Zusammensetzung des PURGENE DNA Purification Kit.

### 3.1.5 Material für die Durchführung der PCR

Es wurden äquivalente PCR-Kits/Taq-Polymerasen von verschiedenen Firmen verwendet:

a) Go Taq Flexi DNA-Polymerase Firma Promega Corporation (Madison, WI/USA)

geliefert mit Puffer und  $MgCl_2$

Puffer mit grünem Farbstoff 10X-Green Go Taq Flexi Buffer

$MgCl_2$  25 mM

b) Taq-DNA-Polymerase Firma Genaxxon bioscience GmbH (Deutschland)

geliefert mit  $MgCl_2$ -haltigem Puffer

dNTP-Mix Firma Promega Corporation (Madison, WI/USA)

Zusammensetzung: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, jedes in einer Konzentration von 10 mM in sterilem Wasser.

PCR-Primer Firma Invitrogen Corporation (USA)

Die beiden Primer ITS3, Nummer H6526D08, und ITS4, Nummer H6526D09, wurden in gefriergetrockneter Form geliefert und, mit sterilem Wasser aufgelöst, in einer Konzentration von 20 µM gebraucht.

ITS3 (Sequenz 5' to 3'): GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC

ITS4 (Sequenz 3' to 5'): TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

Die synthetischen Oligonukleotide ITS3 und ITS4 sind candidaspezifische Universalprimer, die die 310-410bp-Region von 5.8S und von 28S rDNA von Candida spezies amplifizieren.

### **3.1.6 Material für die Gelelektrophorese**

Agarose Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

ROTIPHORESE 10X TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA) Firma Carl Roth GmbH  
(Karlsruhe, Deutschland)

Zusammensetzung: 1,0 M Tris-Borat  
25 mM EDTA  
in destilliertem, deionisiertem Wasser  
pH 8,3

1%-ige Ethidiumbromidlösung Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

DNA-Längenstandard 100 bp Firma New England BioLabs (Ipswich, MA/USA)

Produktbezeichnung: N3231S DNA-Ladder

Blue Run Firma Promega Corporation (Madison, WI/USA)

### 3.1.7 Material für den Candida-Antigen-Elisa

<b>Komponenten und Zusammensetzung der Testpackung</b>	<b>Menge</b>
<b>Brechbare Mikrotiterstreifen mit je 8 erregerspezifischen Antikörpern beschichteten Einzelkavitäten (insg. 96)</b> 1 Testrahmen	12 Stück
<b>Negativkontrolle</b> Konservierungsmittel: < 0,09% Natriumazid	2 x 3 ml
<b>Standard versetzt mit Candida albicans Antigen</b> Das Antigen für die Positivkontrolle ist inaktiviert, Konservierungsmittel: < 0,1% Natriumazid	4 x 3 ml
<b>Anti-Candida albicans Konjugat</b> Gegen Candida albicans gerichteter Antikörper, konjugiert mit Peroxidase, stabilisiert in Protein-Stabilisatorlösung Konservierungsmittel: 0,02% Methylisothiazolon 0,02% Bromnitrodioxan	0,15 ml
<b>Konjugatpuffer</b> PBS mit BSA und Detergenz; Konservierungsmittel: 0,1 mg/ml Gentamycin, 0,1% Kathon CG, 0,1% Phenol	10 ml
<b>Waschlösungskonzentrat (ausreichend für 500 ml)</b> Natriumchlorid-Lösung mit Tween 20 Konservierungsmittel: 0,1% Kathon CG	25 ml
<b>Probenpuffer</b> <b>(spezieller Serumverdünnungspuffer für SERION ELISA antigen Candida)</b> Saure Lösung ohne Konservierungsmittel	15 ml
<b>Stopplösung</b> 0,5 N Schwefelsäure	12 ml
<b>TMB-Substratlösung (gebrauchsfertig)</b> TMB-Wasserstoffperoxid-Substratlösung, lösungsmittelfreier Puffer Konservierungsmittel: <0,1% Kathon CG	11 ml
<b>Qualitätskontroll-Zertifikat</b>	1

Tab. 2: Komponenten und Zusammensetzung der Testpackung.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Studiengruppe**

Bei 147 prämenopausalen und nichtschwangeren Patientinnen, die sich in der infektiologischen Sprechstunde der Frauenklinik des Klinikums Großhadern vorstellten, wurde im Rahmen der klinischen Untersuchung Vaginalsekret zur Analyse im Labor gewonnen. Kriterien für die Entnahme einer Probe durch den konsultierten Arzt waren, das schriftliche Einverständnis der Patientin vorausgesetzt, akute oder chronische Beschwerden im Genitalbereich wie Brennen, Juckreiz oder Fluor vaginalis. Diese Symptome lenken den klinischen Verdacht auf eine Vulvovaginalcandidose.

### **3.2.2 Probengewinnung**

Zur Gewinnung einer Scheidenprobe wurden mittels einer sterilen Einweg-Spritze 2 ml physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) in die Vagina instilliert. Mit einem Watteträger wurde die eingebrachte NaCl-Lösung im hinteren Scheidengewölbe mit dem Vaginalsekret durchmischt und dann mit der gleichen Spritze wieder abgesaugt. Bis zur Verbringung ins Labor lagerten die Spritzen für einige Stunden im Kühlschrank bei +2°C - +8°C.

Die anschließende Verarbeitung der Proben in unserem Labor begann mit einem kurzen Vortexen der Spritze, um die Suspension aus NaCl und Vaginalsekret homogen zu vermischen.

Zwei bis drei Tropfen der jeweiligen Probe wurden in ein Röhrchen mit Sabouraud-Flüssigmedium (SAB-Agar) gegeben und bei 37°C im Inkubator bebrütet. War nach der Inkubationszeit das SAB-Agar-Röhrchen *Candida* spp. positiv, wurde das Material auf einer Chromagar-Platte ausgestrichen.

Der restliche Inhalt der Spritze wurde zu je 1 ml auf zwei Eppendorfgefäße verteilt und anschließend bei 10900 rounds per minute (rpm) drei Minuten lang zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde abpipettiert und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Er diente zur Bestimmung der *Candida*-Antigene mittels Elisa. Das im Gefäß verbliebene Sediment wurde mit 500 µl PBS überschichtet und für die *Candida*-PCR verwendet.

Die fertig aufbereiteten Proben lagerten bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei -74°C im Gefrierschrank.

### **3.2.3 Kultur**

#### **3.2.3.1 Sabouraud-Flüssigmedium**

Zwei bis drei Tropfen des durch Vortexen homogen suspendierten Probenmaterials wurden in das Sabouraud-Flüssig-Agar-Röhrchen eingebracht, welches zur Anzucht von Hefen und Schimmelpilzen geeignet ist. Flüssignährmedium ergibt ein um wenige Prozent besseres Wachsen der Pilze, auch bei kleinem Inokulum (AWMOnline 08/2006). Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank wurde das Nährmedium auf eine Trübung hin beurteilt. Diese gilt als Kriterium für das Vorhandensein von *Candida* spezie. Blieb das bebrütete Nährmedium klar, wurde ein Tropfen davon nativ unter dem Mikroskop (Okular 10, Objektiv 40x) betrachtet. Konnten dabei Pilzsporen oder Myzelien festgestellt werden, galt die Probe ebenfalls als positiv und wurde folglich ausgespatelt.

Jede positive Probe wurde zur genaueren Spezifizierung des jeweiligen *Candida*-Stammes auf einer Chromagarplatte ausgestrichen.

#### **3.2.3.2 Chromagarplatten**

Wenn im Sabouraud-Flüssigmedium Pilze angezüchtet werden konnten, wurden diese zur weiteren Spezifizierung auf Chromagarplatten (BBL CHROMagar *Candida*®) mittels einer sterilen Öse überimpft und ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h im Dunkeln konnte durch die für den jeweiligen *Candida*-Stamm typische Farbreaktion eine Identifizierung erfolgen. Die jeweiligen Farbreaktionen kommen durch Hydrolyse von chromogenen Substraten des CHROMagar zustande (BDDiagnosticSystems 2005).

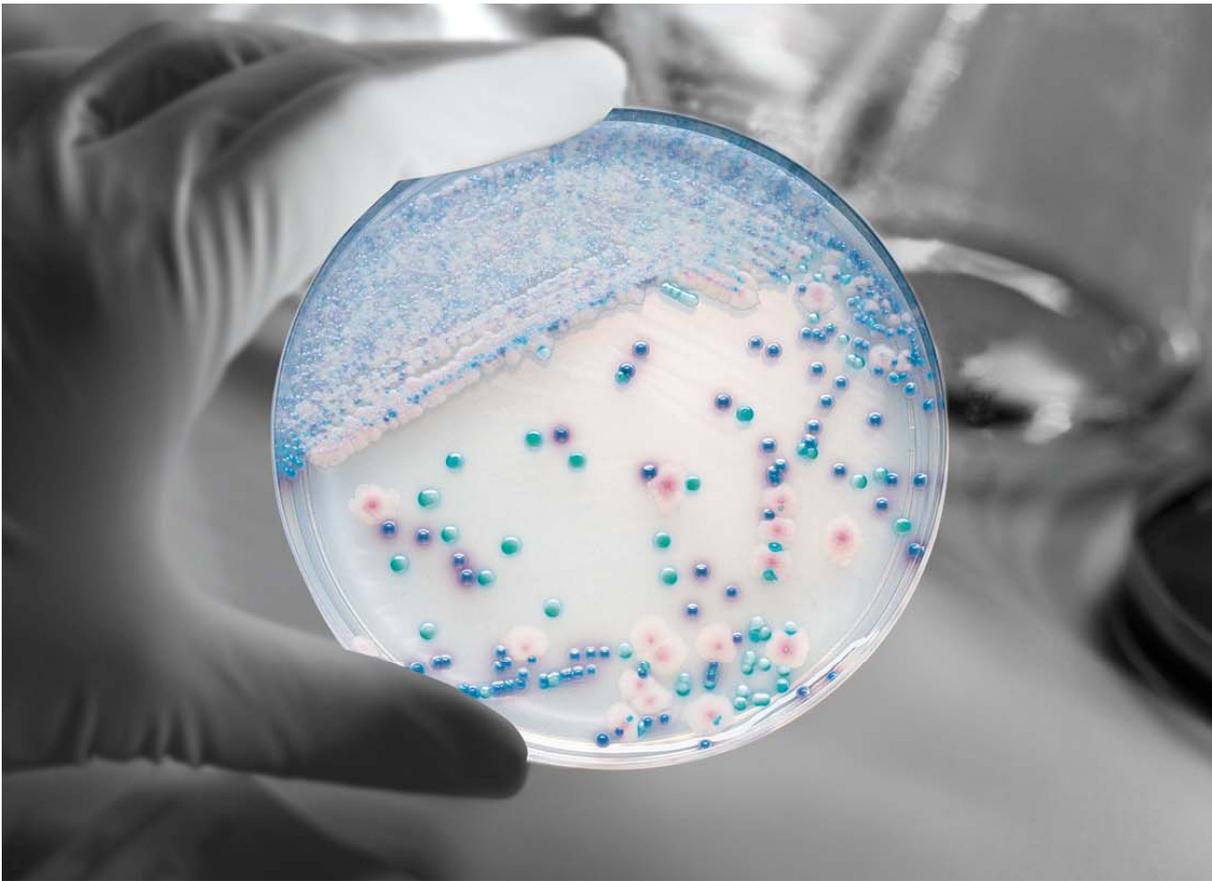


Abb. 1: Ausstrich auf der BBL CHROMagar Candida-Platte (BDDiagnosticSystems 2005).

Die Candida-Spezies kann durch folgendes Farbschema identifiziert werden:

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

Tab. 3: Farbschema zur Identifizierung der Candidasubspezies.

Da der im Vergleich untersuchte Candida-Antigen-Elisa keine Speziesdifferenzierung erlaubt, erscheint es nicht unbedingt nötig, die im Chromagar ermittelte Spezies auszuwerten, weshalb wir darauf verzichteten.

### 3.2.4 Durchführung der Candida-PCR

Mit der PCR steht eine molekularbiologische Methode zur in vitro Vermehrung von DNA-Abschnitten zur Verfügung, die sich durch eine hohe Spezifität, Sensitivität und Geschwindigkeit auszeichnet (Saiki et al. 1988; Weissenbacher et al. 2008). Dabei wird nach Extraktion der DNA aus den fungalen Zellen mittels Hitzedenaturierung bei 92-95°C die doppelsträngige DNA in Einzelstränge zerlegt, die dann als Matrizen fungieren. Bei der nachfolgenden Abkühlung des Reaktionsansatzes hybridisieren zwei Oligonukleotide („Primer“) an den komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA. Hierfür werden die hefespezifischen Universalprimer ITS3 und ITS4 verwendet. In einem dritten Schritt katalysiert eine hitzebeständige Polymerase (Taq-Polymerase) im Bereich ihrer Optimaltemperatur dann in 5'-3'-Richtung die Synthese des komplementären Stranges, indem sie freie Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) verknüpft. Der von den Primern hybridisierte Bereich ist dabei der Startpunkt für das Enzym. Die im ersten Zyklus entstandenen Reaktionsprodukte (Amplifikate) dienen in nachfolgenden Zyklen selbst als Matrize. Der Temperaturzyklus wird so oft wiederholt bis eine so große Produktmenge amplifiziert wurde, dass sie durch Anfärben in der Gelelektrophorese beurteilt und dokumentiert werden können (Bangsow et al. 2007).

#### 3.2.4.1 DNA-Extraktion

##### 3.2.4.1.1 DNA-Extraktion nach Methode A

Um die DNA aus den Pilzzellen zu isolieren, erfolgte der Zellaufschluss aller 147 Proben nach der laborüblichen und im Folgenden beschriebenen Extraktionsmethode.

Für die Herauslösung der DNA aus den Zellen verwandten wir das Sediment der jeweiligen Probe. Das mit PBS überschichtete Sediment wurde so lange kräftig gevortext, bis es homogen suspendiert war. Danach zentrifugierten wir die Probe eine Minute lang und pipettierten den Überstand ab. Im anschließenden Waschschrift durchmischten wir das Sediment mit 500 µl sterilem Wasser kräftig auf dem Vortexgerät. Anschließend wurde die Probe fünf Minuten bei 10900 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Zum Aufbrechen der fungalen Zellwände erfolgte die Resuspendierung mit 100 µl Lytikase-Lösung und der Inkubation der Probe für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad.

Danach wurden 500 µl PBS zupipettiert, die Probe gevortext, bei 10900 rpm zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Anschließend resuspendierten wir das Sediment in 200 µl Lysis-Puffer und inkubierten es zehn Minuten bei Raumtemperatur. Nach dem Zupipettieren von 500 µl PBS wurde fünf Minuten bei 10900 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Resuspendierung der Probe mit 240 µl NID-Puffer und 10 µl Proteinkinase K, um die im Vaginalsekret zahlreich vorkommenden Proteine zu denaturieren, welche die PCR empfindlich stören könnten.

Nach Überführung des Ansatzes in ein 0,5 ml Eppendorf-Cap inkubierten wir die Probe im Mastercycler eine Stunde bei 56°C. Anschließend erfolgte über zehn Minuten die Inaktivierung der Proteinkinase K bei 95°C.

Auf die gleiche Art und Weise wie beschrieben wurden auch von einer *Candida albicans* - Kultur und einer *Candida glabrata* - Kultur zwei Positivkontrollen gewonnen.

Bei dieser Methode A zur DNA-Extraktion konnte nur bei 5 von 58 Proben, die in der zuvor angelegten Pilzkultur positiv waren, auch mittels PCR *Candida* nachgewiesen werden. Aus diesem Grund führten wir bei allen Proben, die nach der Aufschlussmethode A in der PCR keine *Candida*-spezifische DNA enthielten, nochmals einen Zellaufschluss nach der Methode B durch.

#### **3.2.4.1.2 DNA-Extraktion nach Methode B**

Bei allen Proben, die nach der beschriebenen Methode A in der PCR keinen Nachweis von *Candida* spp. erbrachten, wurde nochmals ein Zellaufschluss durchgeführt. Hierfür wurde das Produkt „PURGENE DNA Purification Kit“ der Firma Gentra Systems (Minneapolis, MN/USA) für Hefezellen verwendet.

Zum Herauslösen der DNA aus dem Sediment des Patientenmaterials wurde die Probe mit den 500 µl PBS kräftig durchmischt, abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Es wurden 300 µl Zellsuspensionslösung hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren suspendiert. Um die Zellwände aufzuschließen, wurden 1,5 µl Lytic-Enzym-Lösung hinzupipettiert, das Gefäß 25-mal gekippt und anschließend bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Probe gelegentlich gekippt, um für eine optimale Durchmischung zu sorgen. Nach einer Minute Zentrifugieren wurden der Überstand abpipettiert und nachfolgend 300 µl Zell-Lysis-Lösung mit dem Niederschlag vermischt, um die fungalen Zellmembranen zu zerstören.

Um die in der Probe enthaltenen Eiweiße zu entfernen, wurde 100 µl Protein-Ausfäll-Lösung zugegeben und 20 Sekunden lang gevortext. Nach dem Zentrifugieren bei 10900 rpm für drei Minuten bildeten die ausgefällten Proteine ein dichtes weißes Pellet.

Der Überstand der Probe, der die DNA enthielt, wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 300 µl 100%igem Isopropanol abgegossen und der Zelleniederschlag verworfen.

Durch 50-maliges Kippen des Reaktionsgefäßes wurde ein Ausfallen der DNA erreicht. Nach dem Zentrifugieren der Probe bei 10900 rpm für eine Minute war die DNA als weißes Sediment sichtbar. Der Überstand wurde abgegossen.

Das anschließende Waschen der DNA erfolgte durch das Zufügen von 300 µl 70%igem Ethanol zum Pellet und mehrmaliges Kippen des Reaktionsgefäßes. Nach dem Zentrifugieren der Probe über eine Minute bei 10900 rpm wurde der Ethanol vorsichtig abgegossen, sodass die gereinigte DNA im Gefäß zurückblieb.

Anschließend konnte das geöffnete Eppendorf-Gefäß 10-15 Minuten an der Luft abtrocknen.

Danach wurden 50 µl DNA-Hydratation-Solution und 1,5 µl RNase-A-Solution zu der gereinigten DNA-Probe hinzupipettiert, durch Vortexen vermischt und kurz herunterzentrifugiert.

Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 37°C erfolgte die vollständige Rehydrierung der DNA bei 65°C über eine Stunde, wobei das Probengefäß gelegentlich angetippt wurde, um das Dispergieren zu erleichtern.

### 3.2.4.2 Durchführung der Candida-PCR

Bei jeder PCR wurden eine negative und zwei positive Kontrollen mitgeführt, um etwaige Fehler bei der Durchführung der PCR sofort erkennen zu können.

a) Ansatz mit der Polymerase der Firma Promega

Reagenzien	Konzentration	Menge
dNTP	10 mM	1 µl
Puffer	10fach konzentriert	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 µl
Primer ITS3	20 µM	2,5 µl
Primer ITS4	20 µM	2,5 µl
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,5 µl
H <sub>2</sub> O		34,5 µl

Tab. 4: Mastermix für eine Probe mit Polymerase der Firma Promega.

b) Ansatz mit der Polymerase der Firma Genaxxon

Reagenzien	Konzentration	Menge
dNTP	10 mM	1 µl
Puffer	10fach konzentriert	5 µl
Primer ITS3	20 µM	2,5 µl
Primer ITS4	20 µM	2,5 µl
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,5 µl
H <sub>2</sub> O		37,5 µl

Tab. 5: Mastermix für eine Probe mit Polymerase der Firma Genaxxon.

Um ein Volumen von 50  $\mu\text{l}$  pro Reaktionsgefäß zu erreichen, wurden je 49  $\mu\text{l}$  Polymerisationsmix (Mastermix) mit 1  $\mu\text{l}$  der zu amplifizierenden DNA vermischt und kurz abzentrifugiert.

Der Ansatz für die Negativkontrolle bestand aus 49  $\mu\text{l}$  Polymerisationsmix + 1  $\mu\text{l}$  steriles Wasser. Analog dazu bestand die eine Positivkontrolle aus 49  $\mu\text{l}$  Polymerisationsmix + 1  $\mu\text{l}$  extrahierte *Candida albicans* – DNA, die andere aus 49  $\mu\text{l}$  Polymerisationsmix + 1  $\mu\text{l}$  extrahierte *Candida glabrata* - DNA.

Im Thermocycler durchliefen die Reaktionsansätze 40 Zyklen des folgenden Programms:

<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>	<b>PCR-Schritt</b>
5 min	95°C	Denaturierung
1 min	49°C	Anlagerung der Primer
1,5 min	72°C	Verlängerung der Primer

Tab. 6: PCR – Zyklus im Thermocycler.

Am Ende des letzten Amplifikationszyklus wurden die Proben auf 21°C heruntergekühlt. Abschließend wurden die Proben entweder bis zur Weiterverarbeitung bei -72°C eingefroren oder unmittelbar elektrophoretisch aufgetrennt.

### **3.2.4.3 Gelelektrophorese**

Um die in der PCR amplifizierte candidaspezifischen Banden zu verifizieren, wurde die Probe auf 1,5% Agarose-Gel aufgetragen und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Die verschiedenen Candida spezies konnten aufgrund der Länge der Basenpaare bestimmt werden.

Bei jeder PCR wurde in der ersten Spur des Agarosegels ein DNA-Längenstandard, in der Spur zwei eine negative Kontrolle und in den Spuren drei und vier positive Kontrollen mitgeführt. Die Spuren fünf bis zwölf enthielten die Patientenproben.

Die negative Kontrolle diente zum Erkennen einer möglichen Kontamination, die beiden positiven Kontrollen zum Nachweis der korrekten Durchführung der PCR. Eine beispielhafte Abbildung hierzu findet sich im Ergebnisteil der Arbeit unter Kapitel 4.1.2.

#### **3.2.4.3.1 Methode der Herstellung des Agarosegels**

Zur Herstellung des 1,5%-igen Agarosegels wurden 25 ml 1X TBE-Puffer mit 375 mg Agarose auf dem Magnetrührer miteinander vermengt. Anschließend wurde das Gemisch circa zwei Minuten lang in der Mikrowelle bei 900 W so lange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte und die Lösung klar wurde. Nach einer Abkühlphase von zwei Minuten wurden 2 µl 1%ige Ethidiumbromid-Färbelösung zupipettiert und eingeschwenkt. In noch flüssigem Zustand erfolgte das luftblasenfreie Eingießen des Gels in die Gelkammer und umgehend das Einhängen der Gelkämme, um Geltaschen für das Probenmaterial zu erzeugen. Nach 15 Minuten Aushärtungszeit wurden die Gelkämme entfernt und das gebrauchsfertige Agarosegel in das Elektrophoresegerät eingelegt.

#### **3.2.4.3.2 Methode der Herstellung des Laufpuffers**

Der ROTIPHORESE 10X TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA) wurde im Verhältnis 1 : 10 mit sterilem Wasser verdünnt und demnach als 1X TBE-Laufpuffer verwendet.

### **3.2.4.3.3 Methode der Herstellung des DNA-Längenstandards**

In jeder Gelelektrophorese wurde ein Längenstandard mit 100 bp mitgeführt, um die Länge der amplifizierten DNA-Sequenzen beurteilen zu können. Anhand der Anzahl der Basenpaare (bp) in der Probe lässt sich der vorliegende Candida-Stamm bestimmen.

Das gelieferte Produkt enthielt Basenpaare in einer Konzentration von 500 µg/ml und wurde im Verhältnis 1 : 5 mit sterilem Wasser verdünnt, so dass es in einer gebrauchsfähigen Konzentration von 100 µg/ml vorlag.

In eine Geltasche wurden 5 µl Längenstandard, dem 1 µl Blue Run als Färbelösung zugemischt wurde, eingebracht.

### **3.2.4.3.4 Durchführung der Gelelektrophorese**

Das erhärtete Agarosegel wurde in das Elektrophoresegerät eingelegt und mit circa 300 ml Laufpuffer übergossen bis das Gel vollständig mit Flüssigkeit bedeckt war.

Anschließend wurden in die erste Geltasche der DNA-Längenstandard mit einem Volumen von 6 µl und in jede weitere Geltasche Probenmaterial mit einem Volumen von je 10 µl hineinpipettiert.

Bei einer Spannung von 300 V und einer Stromstärke von 120 mA liefen die Banden 15 Minuten lang.

Der entstandene Ethidiumbromid-DNA-Komplex wurde auf der UV-Lampe bei 302 nm sichtbar gemacht und das Ergebnis mittels Polaroidkamera dokumentiert. Ein Beispiel dafür findet sich im Ergebnisteil unter 4.1.2.

### 3.2.5 Candida-Elisa

Der untersuchte Candida-Elisa „SERION ELISA *antigen* Candida“ ist ein Produkt der Firma Virion\Serion GmbH (Würzburg, Deutschland). Es handelt sich dabei um einen Enzymimmunoassay, der candidaspezifische Antigene im Serum nachweist.

Dieser Test, der nach dem Sandwich-Prinzip funktioniert, eignet sich zur Bestimmung einer Candida-Fungämie und ist für diesen Anwendungsbereich seit August 2005 auf dem Markt erhältlich (Virion\Serion 2005).

Da diese Antigene nicht spezifisch für *Candida albicans* sind, sondern generelle Bestandteile der Zellwand von *Candida* spp. darstellen, wurden in einer internen Studie der Herstellerfirma für folgende *Candida* spezie Kreuzreaktivitäten mit dem „SERION ELISA *antigen* Candida“ festgestellt: *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. orientalis* und *C. tropicalis*.

Die Zellwand von *Candida* spp. besteht etwa zu 80-90% aus Kohlenhydraten, wobei hauptsächlich drei Polysaccharide vorkommen: Glucane, Chitine und Mannane. Die restlichen 10-20% stellen zum größeren Teil Proteine und zum kleineren Teil Lipide (Chaffin et al. 1998). Glucane (verzweigte Polymere von glukosehaltigen  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,6- Bindungen) und Chitine (unverzweigte N-acetyl-D-glucosamin-Polymere) sind die strukturellen Bestandteile der Zellwand, die die Festigkeit und die äußere Form der Zelle bedingen. Mannane (verzweigte Homoglykan-Polymere aus D-Mannose), die über Proteine kovalent in der Zellwand verankert sind, machen 40% aller Zellwand-Polysaccharide aus. Sie sind die spezifischen Antigene, welche die Immunantwort im Wirt modulieren und praktisch alle Arme des Immunsystems regulieren können: natürliche Killerzellen, Phagozyten, zellvermittelte Immunität und humorale Abwehrmechanismen (Chaffin et al. 1998). Eine Reihe von bio- und immunchemischen Untersuchungen identifizierte unter den medizinisch relevanten *Candida* spezie 10 Antigen-Faktoren, die als Antigen-Faktor 1, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 13b, und 34 bezeichnet werden (Suzuki 1997). In der folgenden Tabelle 7 sind die Antigen-Faktoren der jeweiligen *Candida* spezie aufgeführt.

<b>Stamm</b>	<b>Antigen-Faktor</b>
<i>C. albicans, Serotyp A</i>	1, 4, 5, 6
<i>C. albicans, Serotyp B</i>	1, 4, 5, 13b
<i>C. tropicalis</i>	1, 4, 5, 8
<i>C. guilliermondii</i>	1, 4, 9
<i>C. krusei</i>	1, 5, 11
<i>C. parapsilosis</i>	1, 5, 13
<i>C. pseudotropicalis</i>	1, 8
<i>C. glabrata</i>	1, 4, 6, 34

Tab. 7: Antigen-Faktoren der medizinisch relevanten Candida-Stämme (Fukazawa 1989)

Der „SERION ELISA *antigen* Candida“ kann acht dieser spezifischen Faktoren nachweisen, nämlich 1, 4, 5, 6, 8, 9, 13b, 34. Deshalb ist der Test mit einer Sensitivität von 80% und einer Spezifität von 93,4% nach Herstellerangaben geeignet, um in Zusammenschau mit dem klinischen Bild und dem Antikörpertiter im Serum eine Candida-Fungämie zu diagnostizieren (Virion\Serion 2005).

Aus der Überlegung heraus, dass Zellwandbestandteile von Candida spezieis nicht nur im Serum, sondern auch in anderen Körperflüssigkeiten bei einer Besiedelung oder Infektion vorkommen müssen, führten wir den experimentellen Nachweis mittels „SERION ELISA *antigen* Candida“ in Scheidenproben durch.

### 3.2.5.1 Testprinzip

Bei der Sandwich-ELISA-Technik sind die Mikrotteststreifen mit Antikörpern gegen die spezifischen Erreger beschichtet. Der vorliegende Test kann acht verschiedene candida-spezifische Mannane der fungalen Zellwand im Probenmaterial erkennen und diese an die festphasenfixierten Antikörper binden.

Um die Reaktion sichtbar zu machen, setzt man mit Peroxidase markierte erregerspezifische Nachweisantikörper ein, die gegen das Antigen gerichtet sind (sog. Sandwich-Methode). Im positiven Falle bindet dieser Antikörper an das Antigen. Gibt man das Substrat (Wasserstoffperoxid) und das Chromogen (Tetramethylbenzidin) zu, erfolgt eine Enzym-Substrat-Chromogen-Reaktion zu einem blauen Farbstoff. Nach Zugabe von Stopplösung erfolgt ein Farbumschlag zu gelb. Die Intensität der Gelbfärbung, die dem Gehalt an Antigen proportional ist, wird photometrisch ermittelt.

### **3.2.5.2 Durchführung des Elisa**

#### **3.2.5.2.1 Vorbereitung der Proben**

Der Test wurde aus dem Überstand der Scheidenproben durchgeführt (siehe Kap. 3.2.2).

Vor Testbeginn wurde jede Probe mit Probenpuffer vermischt. Für die Analyse von Serumproben empfiehlt der Hersteller ein Mischungsverhältnis von 300 µl Serum + 100 µl Probenpuffer. Dies entspricht einem Mischungsverhältnis von 3 : 1. Aufgrund der niedrigen Scheidenproben volumina führten wir analog dazu bei allen 147 Proben den Elisa mit 75 µl Überstand + 25 µl Probenpuffer durch. Auch aus der Negativkontrolle und dem Standard (in doppelter Ausführung) wurde ein Proben-Puffer-Gemisch hergestellt.

Die Proben wurden auf dem Vortexgerät gut durchmischt, sodass eine homogene Lösung aus Probe und Puffer vorlag.

Im anschließenden Denaturierungsschritt wurden die Proben für fünf Minuten bei 100°C erhitzt, um bestehende Immunkomplexe aus Antigen und Antikörper zu lösen und damit die Antigene zu demaskieren. Danach wurden die Proben zehn Minuten lang bei 10900 rpm zentrifugiert. Für den eigentlichen Testablauf wurde der niederschlagsfreie Überstand verwendet.

#### **3.2.5.2.2 Testdurchführung**

Im mitgelieferten Testrahmen wurde die jeweils erforderliche Anzahl an Einzelkavitäten in den Rahmen eingesetzt und ein Protokollblatt angelegt. Die erste Kavität war für den Substratleerwert vorgesehen, die zweite für die Negativkontrolle, die Kavitäten drei und vier für Standardpositivkontrollen. Alle Weiteren dienten zur Analyse der Proben.

In jede Kavität außer dem Substratleerwert wurden 50 µl verdünnte Konjugatlösung, welche aus 1 Teil Konjugat + 50 Teile Konjugatpuffer hergestellt wurde, vorgelegt. Es wurde darauf geachtet, dass beim Pipettieren der Konjugatlösung keinesfalls der obere Rand der Kavität von der Pipettenspitze berührt oder durch diese benetzt wurde.

Entsprechend des angelegten Protokollblattes wurden nun in jede Kavität 50 µl des niederschlagsfreien Überstandes zupipettiert.

Anschließend wurde der gesamte Testrahmen zum Schutz vor Verdunstung und Kontamination mit einem Klebestreifen abgedeckt und bei 37°C für 90 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert.

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Kavitäten manuell gewaschen. Hierzu wurde Waschlösung, welche aus Waschlösungskonzentrat und Aqua dest. im Verhältnis 1 : 20 bestand, verwendet. Initial klopfen wir die in den Kavitäten enthaltene Flüssigkeit aus. Dann wurde in jede Kavität 300 µl Waschlösung eingefüllt und wieder ausgeklopft. Dieser Waschvorgang wurde viermal wiederholt, sodass insgesamt fünf Waschvorgänge durchgeführt wurden. Danach wurde die Platte sorgfältig auf Papiertüchern ausgeklopft.

Um die Enzym-Substrat-Chromogen-Reaktion zu induzieren, wurden jeweils 100 µl der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung in alle Kavitäten zupipettiert. Durch das Substrat Wasserstoffperoxid und das Chromogen TMB (Tetramethylbenzidin) erfolgte die Reaktion zu einem blauen Farbstoff.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur (18–25°C), die geschützt vor Licht und Verdunstung ablief, wurde die Enzym-Substrat-Chromogen-Reaktion durch Zupipettieren von 100 µl 0,5 N Schwefelsäure gestoppt. Durch diese Zugabe erfolgte ein Farbumschlag zu gelb. Die Intensität der Gelbfärbung wurde photometrisch ermittelt, da diese dem Gehalt an Antigen proportional ist. Die Extinktion wurde unmittelbar nach dem Stoppen der Reaktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen den Substratleerwert bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

### **3.2.5.2.3 Verdünnungsreihen**

Da insgesamt 84,4% der analysierten Proben im Elisa positiv ausfielen, führten wir mit zwei Stichproben Verdünnungsreihen durch. Bei allen 147 Proben war der Elisa mit 75 µl Überstand + 25 µl Probenpuffer durchgeführt worden. Dies entspricht dem vorgegebenen Mischungsverhältnis von 3:1. Ausgehend von dem Probenvolumen von 75 µl wollten wir mittels der Verdünnungsreihen herausfinden, ob sich ein anderes Mischungsverhältnis zwischen Probe und Puffer besser eignet, um die Spezifität des Elisa zu erhöhen.

Die Verdünnungsreihe wurde mit der Standardpositivkontrolle, mit einer Probe, die im Vergleich PCR zu Elisa richtig positiv war und mit einer Probe, die im Vergleich PCR zu Elisa falsch positiv war, durchgeführt.

Anhand des Protokollblatts in Tabelle 8 lässt sich ablesen in welchen Schritten die Proben verdünnt wurden.

	1	2	3	4
A	blank	70 $\mu$ l + 20 $\mu$ l	70 $\mu$ l + 20 $\mu$ l	70 $\mu$ l + 20 $\mu$ l
B	Negativkontrolle	60 $\mu$ l + 20 $\mu$ l	60 $\mu$ l + 20 $\mu$ l	60 $\mu$ l + 20 $\mu$ l
C	STD	50 $\mu$ l + 20 $\mu$ l	50 $\mu$ l + 20 $\mu$ l	50 $\mu$ l + 20 $\mu$ l
D	STD	40 $\mu$ l + 30 $\mu$ l	40 $\mu$ l + 30 $\mu$ l	40 $\mu$ l + 30 $\mu$ l
E		30 $\mu$ l + 40 $\mu$ l	30 $\mu$ l + 40 $\mu$ l	30 $\mu$ l + 40 $\mu$ l
F		20 $\mu$ l + 50 $\mu$ l	20 $\mu$ l + 50 $\mu$ l	20 $\mu$ l + 50 $\mu$ l
G		10 $\mu$ l + 60 $\mu$ l	10 $\mu$ l + 60 $\mu$ l	10 $\mu$ l + 60 $\mu$ l
H		5 $\mu$ l + 65 $\mu$ l	5 $\mu$ l + 65 $\mu$ l	5 $\mu$ l + 65 $\mu$ l

Tab. 8: Protokollblatt zu den Verdünnungsreihen.

Spalte 1: Kontrolle

Spalte 2: Standardpositivkontrolle beginnend mit 70  $\mu$ l Probe + 20  $\mu$ l Puffer

Spalte 3: Scheidenprobe: in PCR und Elisa positiv

Spalte 4: Scheidenprobe: in PCR negativ und Elisa positiv

### 3.2.5.2.4 Mischungsverhältnis 1:1

Da sich bei den Verdünnungsreihen gezeigt hat, dass bei einem Mischungsverhältnis von in etwa 1:1 die Spezifität des Testes erhöht werden könnte, wurden nochmals Proben getestet.

Hierfür wurden 20 Scheidenproben, die sowohl in PCR als auch im Elisa positiv waren, und 20 Proben, in der PCR negativ und im Elisa positiv waren, zufällig ausgewählt.

Der Testansatz bestand aus je 35  $\mu$ l Probe + 35  $\mu$ l Probenpuffer.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Candidanachweis in Kultur, PCR und Elisa

#### 4.1.1 Kultur

Die Kolonisation oder Infektion der Vagina mit *Candida* spp. wurde mittels kultureller Anzucht in Sabouraud-Agar-Röhrchen und im Falle positiver Ergebnisse auf Chromagar-platten für die weitere Spezifizierung der Kolonien festgestellt. In Abb. 2 sind die Ergebnisse der kulturellen Anzucht aufgezeigt. Das Bild verdeutlicht, dass bei 58 von 147 Scheidenproben (39,5%) *Candida* spp. in der Kultur angezchtet werden konnte. Bei 89 von 147 Proben (60,5%) gelang dies nicht.

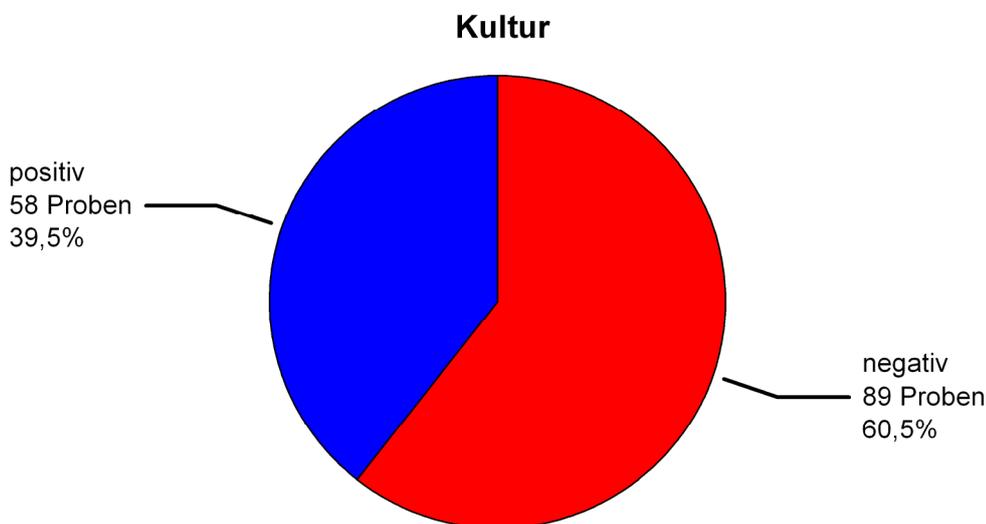


Abb. 2: Kultureller Nachweis von *Candida* spp. mittels SAB-Agar und Chromagar; n=147.

#### 4.1.2 PCR

Zur Amplifizierung der genomischen DNA wurde mit allen 147 Scheidenproben eine PCR durchgeführt.

Abb. 3 zeigt ein Beispiel für ein PCR-Ergebnis, wie es mittels Gelkamera dokumentiert wurde. Bei jeder PCR wurde in der ersten Spur des Agarosegels ein DNA-Längenstandard, in der Spur zwei eine negative Kontrolle und in den Spuren drei und vier positive Kontrollen mitgeführt. Die Spuren fünf bis zwölf enthielten die Patientenproben.

Die negative Kontrolle diente zum Erkennen einer möglichen Kontamination, die beiden positiven Kontrollen zum Beweis der korrekten Durchführung der PCR.

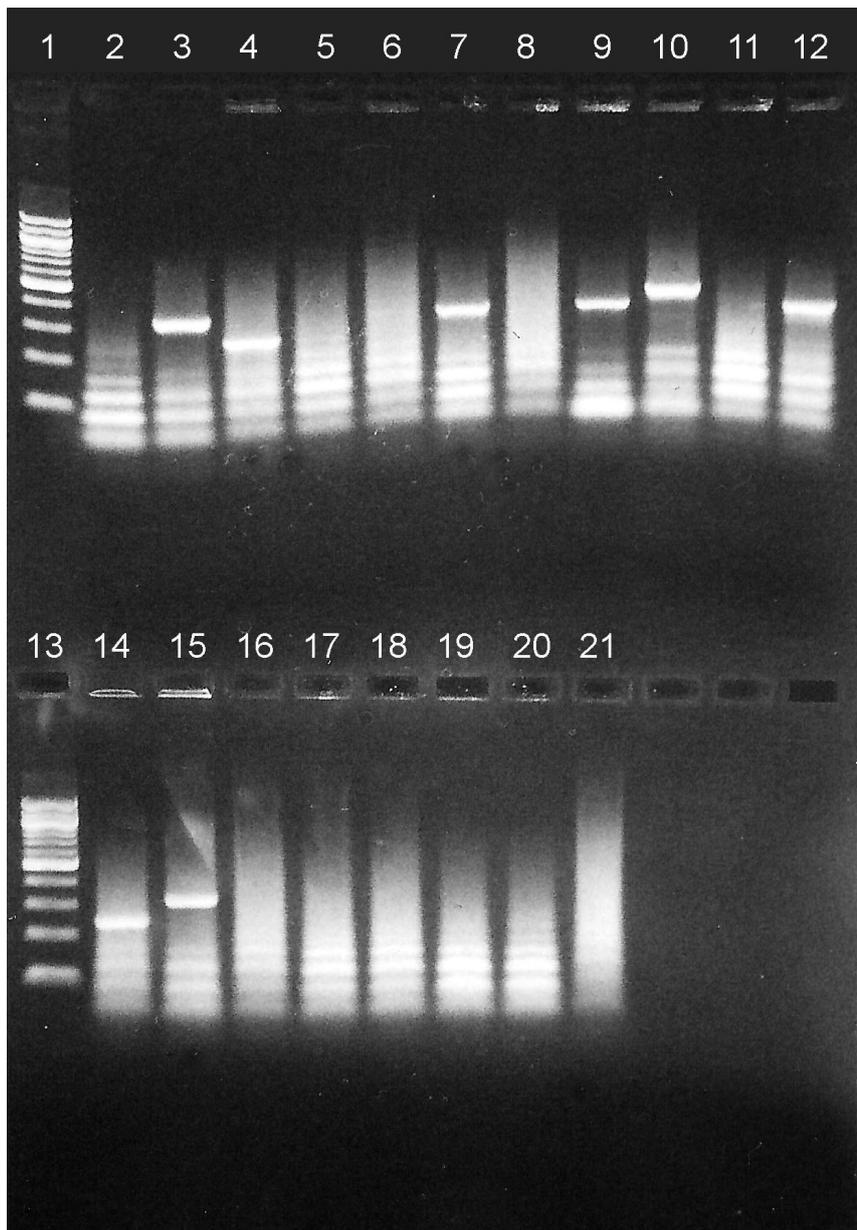


Abb. 3: Beispiel für ein fotografisch dokumentiertes PCR-Ergebnis.

Spur 1: DNA-Längenstandard

Spur 3: positive Kontrolle für *C. albicans*

Spur 5: negative Scheidenprobe

Spur 7: *C. albicans*-positive Scheidenprobe

Spur 9: *C. albicans*-positive Scheidenprobe

Spur 11: negative Scheidenprobe

Spur 13: DNA-Längenstandard

Spur 15: *C. albicans*-positive Scheidenprobe

Spur 2: negative Kontrollprobe

Spur 4: positive Kontrolle für *C. glabrata*

Spur 6: negative Scheidenprobe

Spur 8: negative Scheidenprobe

Spur 10: *C. albicans*-positive Scheidenprobe

Spur 12: *C. albicans*-positive Scheidenprobe

Spur 14: *C. glabrata*-positive Scheidenprobe

Spur 16-21: negative Scheidenproben

In Abb. 4 ist das Ergebnis aller PCR-Untersuchungen zusammenfassend grafisch dargestellt. Bei 76 von 147 Proben (51,7%) konnte *Candida* spp. nachgewiesen werden, 71 von 147 Proben (48,3%) enthielten keine *Candida*-spezifische DNA.

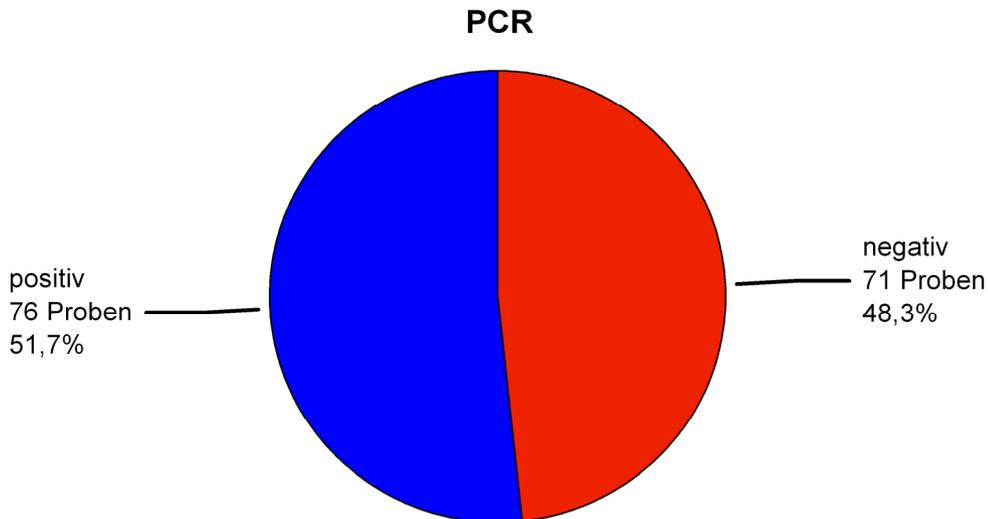


Abb. 4: Ergebnisse der PCR-Untersuchung; n=147.

Es konnte mittels PCR in mehr Proben *Candida* spezie nachgewiesen werden als mittels Kultur (76 versus 58 Proben).

Dieses Ergebnis deckt sich mit aktuellen Angaben in der Literatur, wonach die PCR die sensitivste Methode zum *Candida*-Nachweis im Vaginalsekret ist (Tabrizi et al. 2006; Weissenbacher et al. 2008). Die Amplifizierung von spezifischer DNA gelingt auch dann, wenn nur sehr wenig Material oder tote Pilzzellen in der Probe vorhanden sind, wohingegen zum Anwachsen auf Nährmedien obligat vitale Hefezellen in ausreichender Zellzahl nötig sind.

### 4.1.3 Elisa

Mit jeder der 147 Proben wurde der zu beurteilende Elisa durchgeführt. Ein positives Testergebnis zeigt das Vorhandensein von mindestens einem von acht möglichen candida-spezifischen Mannanen im Probenmaterial an.

Abb. 5 zeigt, dass 124 (84,4%) von 147 Proben im Elisa positiv und 23 (15,6%) negativ getestet wurden.

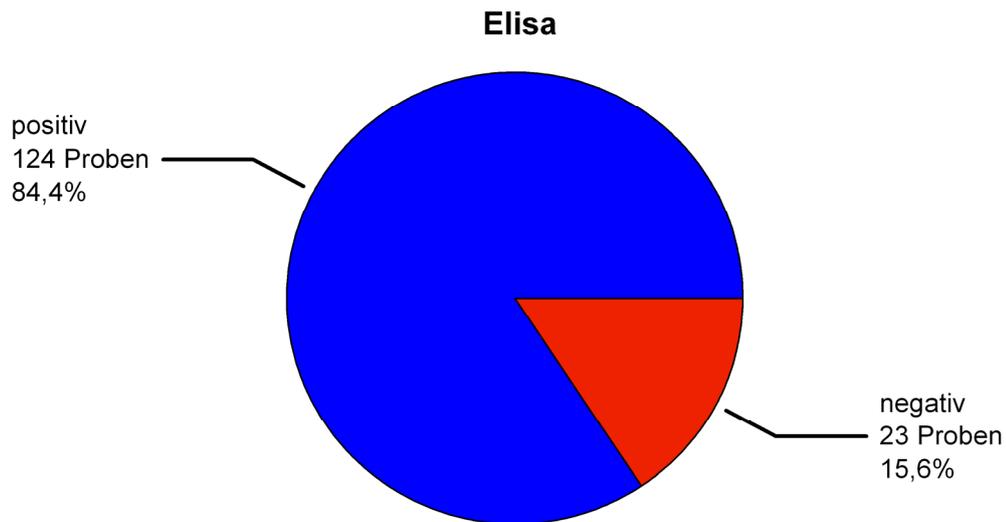


Abb. 5: Candidanachweis mittels Elisa; n=147.

#### 4.1.4 Kultur, PCR, Elisa – Ergebnisse im Vergleich

Im folgenden Kapitel wird zusammenfassend gezeigt, bei wie vielen Proben je nach Methode der Nachweis von *Candida* spp. gelang und bei wie vielen nicht.

Mittels Kultur ließ sich in lediglich 58 Proben und mittels PCR bei insgesamt 76 Proben *Candida* nachweisen. Mit 124 positiven Testergebnissen erbrachte der Elisa die mit Abstand höchste Anzahl an Candidanachweisen. In Abb. 6 sind die deutlich verschiedenen Ergebnisse der drei Testverfahren grafisch dargestellt.

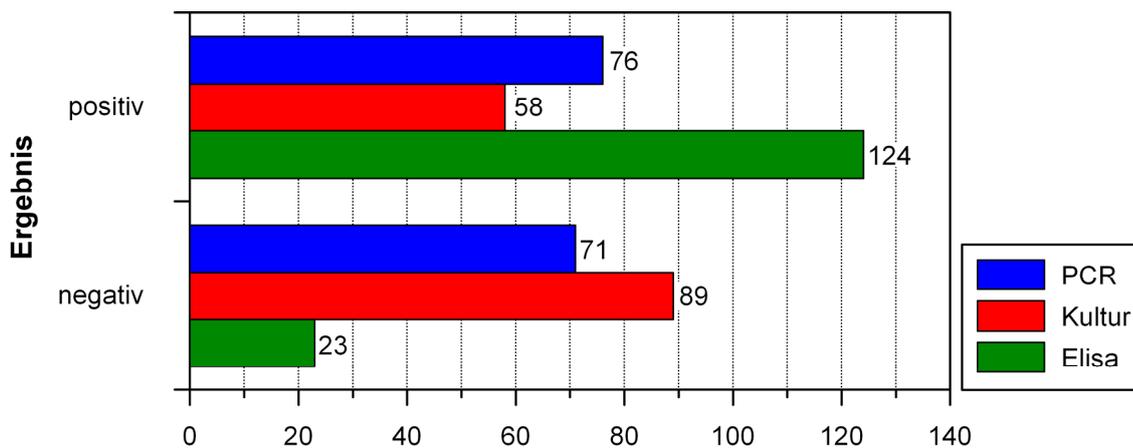


Abb. 6: Ergebnisse von PCR, Kultur und Elisa im Vergleich, n=147.

Um dieses Ergebnis besser einordnen und analysieren zu können, sind die Einzelergebnisse der drei Testverfahren in Abb. 7 in Form einer hierarchischen Tabelle abgebildet. Hierbei sind für die PCR, die Kultur und den Elisatest die positiven und negativen Ergebnisse sowie die Summe (n=147) in der jeweiligen Farbe analog zu Abb. 6 aufgeführt.

Dementsprechend ist in blau ersichtlich, dass in der PCR 76 Proben positiv und 71 Proben negativ ermittelt wurden. Die Kultur, bei der in 58 Proben die Anzucht von *Candida* spezia gelang und bei 89 Proben nicht, ist rot aufgeführt. Grün stellt die 124 im Elisa positiven und die 23 negativen Ergebnisse dar.

Die detaillierte Einzelauswertung ist in Abb. 7 schwarz bzw. grau dargestellt.

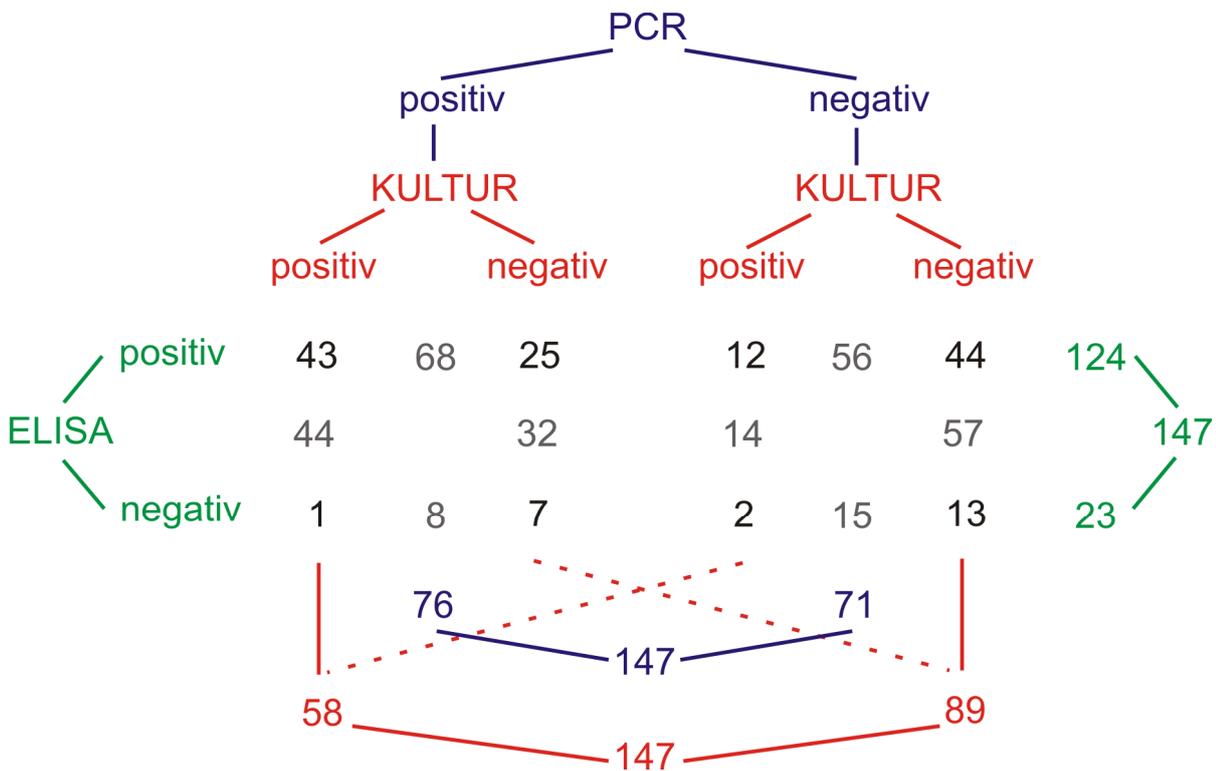


Abb. 7: Hierarchische Darstellung der Ergebnisse von PCR, Kultur und Elisa, n=147.

Vergleicht man die Ergebnisse der PCR in Relation zum Elisa, ist erkennbar, dass von den 76 candidahaltigen Proben in der PCR im Elisatest 68 Proben ebenfalls positiv und lediglich acht Proben negativ getestet wurden. Dies weist auf eine sehr hohe Sensitivität des Elisa hin.

Dagegen zeigten von den 76 positiven PCR-Proben in der Kultur lediglich 44 Proben einen positiven Befall. Näher betrachtet lässt sich zudem noch sagen, dass 44 von 58 Proben, die bei der kulturellen Anzucht positiv waren, auch ein positives PCR-Ergebnis hatten. Dagegen sind 32 Proben, die bei der kulturellen Untersuchung negativ waren, bei der PCR-Untersuchung positiv ausgefallen, was auf eine hohe Sensitivität der Methode der PCR zurückzuführen ist.

Von den 44 Proben, die sowohl in der PCR wie auch in der Kultur positiv getestet wurden, zeigten 43 Proben auch beim Elisatest ein positives Ergebnis. Nur eine Probe, die sowohl mittels PCR als auch mittels Kultur Candida enthielt, wurde vom Elisa nicht erkannt.

Der Vergleich der kulturellen Anzucht mit dem Elisa zeigt, dass 94,8% der Proben, nämlich 55 ( $43+12=55$ ) von 58, bei denen mittels Kultur Candida spp. nachgewiesen werden konnte, auch im Elisa positiv waren. Auch dies spricht für eine sehr hohe Sensitivität des Elisa.

Wesentlich schwerwiegender sind die Unterschiede, wenn man die 71 mittels PCR als negativ eingestuften Proben mit den Ergebnissen im Elisatest vergleicht. Hier zeigten diese Proben nämlich in nur 15 Fällen ein negatives, in 56 Fällen jedoch ein positives Ergebnis. Dadurch kommt es zu dem augenfälligen, bereits in Abb. 6 ersichtlichen Unterschied zwischen PCR und Elisa, der auf eine geringe Spezifität des Elisa hindeutet. Diese Vermutung wird auch durch die niedrige Anzahl der Proben ( $13+7=20$ ), die sowohl in der Kultur als auch im Elisa als frei von *Candida* spp. identifiziert wurden, bestätigt.

Zwei Proben, die in der PCR und im Elisa negativ waren, enthielten so viele vitale Hefezellen, dass eine kulturelle Anzucht gelang.

Demgegenüber erwiesen sich von den 71 Proben, bei denen in der PCR kein *Candida*-Nachweis gelang, nur 44 Proben ebenso bei der Kultur als frei von *Candida*. In 12 Proben wuchsen jedoch *Candida*-Kolonien an.

Bei 13 Proben blieb übereinstimmend in allen drei Testverfahren ein *Candida*-Nachweis aus.

Sieben Proben, die sowohl im Elisa als auch in der kulturellen Anzuchtung negativ waren, enthielten in der PCR candidaspezifische DNA.

Zusammenfassend zeichnet sich ab, dass der *Candida*-Antigen-Elisa für jene Proben, die *Candida* spp. enthalten, eine sensitive, jedoch nur wenig spezifische Nachweismethode ist. Möglicherweise ist der Elisa nicht geeignet, um in einer Verdünnung von 3:1 *Candida* spp. im Vaginalsekret nachzuweisen.

#### 4.1.5 Ergebnisse der Verdünnungsreihen

Der im Kap 3.2.5.2.3 beschriebene Ansatz lieferte folgende, in Tabelle 9 dargestellten, Ergebnisse.

	1	2	3	4
A	0,25	0,612	overflow	1,452
B	0,107	0,696	overflow	0,930
C	0,719	0,701	overflow	1,124
D	0,723	0,540	overflow	0,437
E		0,435	overflow	0,278
F		0,303	overflow	0,236
G		0,203	2,434	0,225
H		0,172	1,434	0,201

Tab. 9: Ergebnisblatt der Extinktionsmessung.

Spalte 1: Kontrolle

Spalte 2: Standardpositivkontrolle

Spalte 3: Scheidenprobe: in PCR und Elisa positiv

Spalte 4: Scheidenprobe: in PCR negativ und Elisa positiv

Anhand des Mittelwertes aus den beiden Standardpositivkontrollen konnte im Qualitäts-kontroll-zertifikat der Testpackung folgende Interpretation der Ergebnisse abgelesen werden.

STD = 0,72, daraus folgt:

negativ (neg.)	< 0,33
grenzwertig positiv (gw. pos.)	0,33 – 0,50
positiv (pos.)	> 0,50
overflow	so viel Antigen, dass nicht mehr messbar

	1	2	3	4
A	0,25	pos.	pos.	pos.
B	neg.	pos.	pos.	pos.
C	pos.	pos.	pos.	pos.
D	pos.	pos.	pos.	gw. pos.
E		gw. pos.	pos.	neg.
F		neg.	pos.	neg.
G		neg.	pos.	neg.
H		neg.	pos.	neg.

Tab. 10: Auswertung des Ergebnisses der Verdünnungsreihen.

Spalte 1: Kontrolle

Spalte 2: Standardpositivkontrolle

Spalte 3: Scheidenprobe: in PCR und Elisa positiv

Spalte 4: Scheidenprobe: in PCR negativ und Elisa positiv

In den durchgeführten Verdünnungsreihen wird deutlich, dass die Probe, die in der PCR positiv war (siehe Spalte 3 auf dem Ergebnisblatt), selbst noch in der niedrigsten Verdünnung, in der der Testansatz nur noch 5 µl Probenmaterial enthielt, auch im Elisa positiv ausfiel. Dies bedeutet, dass der Nachweis von *Candida* spp. im Elisa sensitiv gelingt, aber auch, dass der Elisa unspezifisch bindet.

Die Probe in Spalte 4, die in der PCR negativ, aber im Elisa im Mischungsverhältnis 3:1 positiv war, wird bei einem Mischungsverhältnis von 30 µl Probe + 40 µl Puffer im Elisa negativ. Um herauszufinden, ob ein anderes Mischungsverhältnis den Aussagewert des Elisa verbessern könnte, wurden noch weitere 40 Proben im Mischungsverhältnis 1:1 analysiert.

#### 4.1.6 Ergebnis im Mischungsverhältnis 1:1

Der Candida-Antigen-Elisa wurde mit einem Testansatz von je 35 µl Probe + 35 µl Puffer durchgeführt. Dieses Mischungsverhältnis wurde gewählt, da sich bei den Verdünnungsreihen gezeigt hat, dass so die Spezifität des Testes erhöht werden könnte.

Hierfür wurden 20 Scheidenproben, die sowohl in der PCR als auch im Elisa positiv waren, und 20 Proben, in der PCR negativ und im Elisa positiv waren zufällig ausgewählt.

11 von den 20 (55%) mittels Elisa und PCR positiven Proben waren im Mischungsverhältnis 1:1 immer noch positiv, wohingegen bei neun Proben kein Candida-Antigen mehr nachweisbar war. Bei der angenommenen hohen Sensitivität des Elisa hätte dieses Ergebnis erwartungsgemäß jedoch höher ausfallen müssen. Der Grund dafür könnte sein, dass bei den neun von 20 Proben, die mit Sicherheit unterschiedliche Mengen an Candida-Antigen enthielten, die Nachweisgrenze des Elisa bei einem Probenvolumen von nur 35 µl unterschritten wurde.

12 von den 20 (60%) Proben, die in der PCR negativ und im Elisa positiv waren, wurden im Mischungsverhältnis 1:1 negativ getestet. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass selbst bei diesem niedrigen Mischungsverhältnis immer noch 40% der Proben Candida spp. im Elisa aufwiesen. Es ist weiterhin anzunehmen, dass der Elisa bei diesen Proben, die aus Vaginalsekret bestehen, sehr unspezifisch bindet.

Somit bringt auch die Testdurchführung im Mischungsverhältnis 1:1 statt 3:1 keine wesentliche Erhöhung der Spezifität. Statistisch gesehen müssten alle 147 Proben im Verhältnis 1:1 getestet werden, um auch zu diesem Mischungsverhältnis signifikante Zahlen angeben zu können. Dies war aber nicht mehr möglich, da die Proben teilweise aufgebraucht waren.

## 4.2 Auswertung

### 4.2.1 Sensitivität und Spezifität des Elisa in Abhängigkeit von der PCR

		PCR		
		+	-	
Elisa	+	68	56	124
	-	8	15	23
		76	71	147

Tab. 11: Vierfeldertafel PCR – Elisa.

Sensitivität: 89,5% (95%-KI = [ 79,8% ; 95,0% ])

Spezifität: 21,1% (95%-KI = [ 12,7% ; 32,7% ])

PPW = 54,8%

NPW = 65,2%

Der Elisa erkennt mit einer hohen Sensitivität von 89,5% diejenigen Scheidenproben, bei denen auch in der PCR *Candida* spp. nachgewiesen werden konnte.

Allerdings wird nur etwa jede fünfte Probe mittels Elisa negativ getestet.

Die errechnete Wahrscheinlichkeit, dass ein positives Ergebnis im Elisa auch wirklich positiv ist (PPW), beträgt 54,8%.

Der negative prädikative Wert (NPW) dieses diagnostischen Untersuchungsverfahrens zur Erkennung von *Candida* spp. in der Scheidenprobe zeigt an, wie viele Proben, bei denen der Nachweis von *Candida* spp. mittels Elisa nicht festgestellt wurde, auch tatsächlich im Vergleich zur PCR negativ sind. Dieser Wert beträgt 65,2%.

## 4.2.2 Sensitivität und Spezifität des Elisa in Abhängigkeit von der Kultur

		Kultur		
		+	-	
Elisa	+	55	69	124
	-	3	20	3
		58	89	147

Tab. 12: Vierfeldertafel Kultur – Elisa.

Sensitivität: 94,8% (95%-KI = [ 84,7% ; 98,7% ])

Spezifität: 22,5% (95%-KI = [ 14,6% ; 32,8% ])

PPW = 44,4%

NPW = 87,0%

Der Elisa erkennt mit einer hohen Sensitivität von 94,8% diejenigen Scheidenproben, bei denen auch in der Kultur *Candida* spp. nachgewiesen werden konnte.

Allerdings wird auch hier nur etwa jede fünfte Probe mittels Elisa negativ getestet.

Der positive Vorhersagewert beträgt 44,4%, der negative Vorhersagewert 87,0%.

## 5 Diskussion

Wir untersuchten in unserer Studie insgesamt 147 Scheidenproben von Patientinnen mit dem klinischen Bild einer Vulvovaginalcandidose. Die prämenopausalen und nichtschwangeren Frauen wiesen akute oder chronische Beschwerden im Genitalbereich wie Brennen, Juckreiz oder Fluor vaginalis auf. Diese Symptome lenken den klinischen Verdacht auf eine Vulvovaginalcandidose.

Wir wählten dieses vorselektierte Patientenkollektiv, da die Kolonisation oder Infektion mit *Candida* spezies bei symptomatischen Frauen in etwa 30% beträgt (Giraldo et al. 2000). Bei beschwerdefreien Frauen ohne eine anamnestiche Candidose lässt sich nur in etwa 10-20% *Candida* spezies nachweisen (AWMFOonline 08/2006; Mylonas et al. 2007). Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Nachweis von candidaspezifischer DNA bei symptomatischen Frauen mit Hilfe der PCR in 51,7% der Fälle gelang. In einer aktuellen Veröffentlichung von Daten aus demselben Patientengut beträgt der Anteil 42,3% (Weissenbacher et al. 2008). Da in unserer Studie bei allen Patientinnen der klinische Verdacht auf eine Vulvovaginalcandidose bestand, hätte erwartungsgemäß bei mehr Proben *Candida* spp. nachweisbar sein müssen. Diese Unstimmigkeit beschreibt auch Sobel in seiner Übersichtsarbeit über Vulvovaginalcandidosen. Darin stellt er fest, dass Vulvovaginalcandidosen sowohl über- als auch unterdiagnostiziert werden. Dies bedeutet einerseits, dass bei gesunden Frauen *Candida* nachgewiesen wird und andererseits, dass bei Frauen mit Vulvovaginalcandidose der Nachweis nicht gelingt. Folglich werden unnötige Therapien eingeleitet oder erforderliche Therapien unterlassen. Sobel macht dafür das Fehlen von schnellen, einfachen und billigen Nachweismethoden verantwortlich. Dies mündet zusammen mit einem noch mangelhaften Verständnis der Pathomechanismen von *Candida* spp. in eine Über- und Unterdiagnostik, sodass trotz therapeutischer Fortschritte die Vulvovaginalcandidosen ein weltweites Problem bleiben (Sobel 2007).

Zum Nachweis von *Candida* spp. im Genitaltrakt legten wir initial Kulturen in Sabouraud-Flüssigagar an, denn Flüssignährmedium ergibt ein um wenige Prozent besseres Wachsen der Pilze bei kleinem Inokulum als die Anzucht auf Festagarplatten (AWMFOonline 08/2006). Hierbei wird die Nachweisgrenze für *Candida* spezies in der kulturellen Anzucht auf  $10^3$  Organismen/ml geschätzt, da für das Anwachsen obligat vitale Zellen, die sich teilen und vermehren können, in ausreichender Zahl nötig sind (Odds 1982; Giraldo et al. 2000). Im Falle eines Pilzwachstums erfolgte zur Speziesdifferenzierung die Überimpfung auf eine Chromagar-Platte. Der Gebrauch von Chromagar-Kulturmedien ist eine zuverlässige und günstige Methode, um die Besiedelung mit *Candida* zu erfassen und anhand der unterschiedlichen Farbreaktion der

jeweiligen Candidagattung den Pilz zu spezifizieren (Novikova et al. 2002; Horvath et al. 2003; Mardh et al. 2003). Dadurch, dass der im Vergleich untersuchte Candida-Antigen-Elisa aber keine Speziesdifferenzierung erlaubt, erschien es nicht unbedingt nötig, die im Chromagar ermittelte Spezies auszuwerten, weshalb in dieser Studie auf eine Subspezifizierung verzichtet wurde. Die Speziesdifferenzierung ist indessen in der klinischen Routine bei der Behandlung von Patientinnen wichtig, da Stämme wie *Candida glabrata* und *Candida krusei* oft eine andere klinische Symptomatik verursachen, als dies durch Infektionen mit *Candida albicans* der Fall ist. Infektionen mit *Candida glabrata* können mit nur leichtem Brennen und Jucken ausgesprochen symptomarm verlaufen. Therapeutisch gesehen erweisen sich *Candida glabrata* und *Candida krusei* jedoch oft als sehr hartnäckig, da diese Stämme gegenüber Azolen resistent oder weniger sensitiv sind und somit auf eine übliche antimykotische Therapie unzureichend ansprechen (Weissenbacher et al. 2001; Mardh et al. 2002; Singh et al. 2002; Sobel 2007).

Parallel zu der kulturellen Anzuchtung wurde zum Nachweis von *Candida* die Methode der PCR angewandt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass 32 Patientinnen, bei denen kulturell keine *Candida*-infektion nachweisbar war, in der PCR-Untersuchung positiv getestet wurden, was auf sehr kleine Mengen von *Candida* spp. in der jeweiligen Probe und eine hohe Sensitivität der Methode zurückzuführen ist. Dies stützt die Meinung mehrerer Autoren, wonach die PCR als Goldstandard zum *Candida*-nachweis im Vaginalsekret gilt (Luo et al. 2002; Tabrizi et al. 2006; Xiang et al. 2007; Weissenbacher et al. 2008). All diese Publikationen sprechen der PCR eine höhere Spezifität und Sensitivität im Vergleich zur kulturellen Anzuchtung zu und konnten bei einer größeren Anzahl von Proben *Candida* spezies in der PCR nachweisen als in der Kultur.

In der statistischen Auswertung unserer Ergebnisse zeigte sich für den „SERION ELISA *antigen* *Candida*“ im Vergleich mit der PCR eine Sensitivität von 89,5% (95%-KI = [ 79,8% ; 95,0% ]) und eine Spezifität von 21,1% (95%-KI = [ 12,7% ; 32,7% ]). Das bedeutet, dass der Elisa mit einer hohen Sensitivität diejenigen Scheidenproben identifiziert, bei denen auch in der PCR *Candida* spp. nachgewiesen werden konnte. Allerdings wird nur etwa jede fünfte Probe im Elisa negativ getestet. Die errechnete Wahrscheinlichkeit, dass ein positives Ergebnis im Elisa auch wirklich positiv ist (PPW), beträgt 54,8%. Umgekehrt beträgt der negative prädikative Wert (NPW) dieses diagnostischen Untersuchungsverfahrens zum Nachweis von *Candida* spp. in der Scheidenprobe 65,2%. Dieser Wert sagt aus, wie viele Proben, bei denen der Nachweis von *Candida* spp. mittels Elisa nicht erbracht wurde, auch tatsächlich im Vergleich zur PCR negativ sind.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der „SERION ELISA *antigen Candida*“ im Vergleich zur PCR und Kultur weniger sensitiv ist. Damit liegt die Aussage nahe, dass er nicht für die Untersuchung von Vaginalsekret geeignet ist.

Wie oben erwähnt, führten wir den Elisa aus dem Überstand der Scheidenproben durch. Im Vorfeld der eigentlichen Experimente hatte sich bei den ersten Testversuchen aus dem Sediment gezeigt, dass 11 von 12 Scheidenproben im Elisa negativ waren und nur eine von 12 grenzwertig positiv. Die 12 ausgewählten Scheidenproben wiesen jedoch sowohl in der PCR als auch in der Kultur *Candida* spezies auf. Dies lässt darauf schließen, dass die Antigen-Antikörper-Komplexe in den Proben durch den Denaturierungsschritt (Inkubation bei 100°C für fünf Minuten) nicht demaskiert werden konnten. Ein negatives Testergebnis schließt also eine akute Infektion mit den entsprechenden Erregern nicht aus. Besonders bei hohen anti-*Candida* Antikörper-Titern kann es sein, dass die Antikörper das Antigen so stark maskieren, dass selbst durch den Denaturierungsschritt in der Probenvorbereitung das Antigen nicht erkannt wird (Virion\Serion 2005). So haben wir uns für die Testdurchführung aus dem Überstand entschieden, zumal auch die Bestimmung von Zytokinen und Immunglobulinen seit langem erfolgreich aus dem Überstand durchgeführt wird.

Der Nachweis von *Candida*-Antigenen wurde bisher nur zur Diagnostik von invasiven Candidosen, also Fungämien, eingesetzt. Ein Beispiel dafür ist der Test Platelia® *Candida* Mannan Antigen Enzymimmunoassay, der seit 1999 zum Nachweis einer Fungämie im Serum verwendet wird (Sendid et al. 1999). Da verschiedene Untersuchungen Sensitivitäten zwischen 40-86% ermittelten, führten Rimek et al. eine klärende Studie an 59 hospitalisierten Patienten durch. Dabei erwies sich Platelia® als geeignet, um mit einer Sensitivität von 73% im Vergleich zur Blutkultur eine Candidämie nachzuweisen. Ein wichtiger Vorteil dieses Tests ist, dass der Candidanachweis vor dem Anwachsen in der Blutkultur gelingt, da Blutkulturen mehrere Tage bis zum sichtbaren Wachstum von Sprosspilzen benötigen. Rimek stellt allerdings fest, dass der Wert zur Diagnostik der Candidämie nach wie vor unklar ist, weil die Sensitivität in Bezug auf die jeweilige *Candida* spp. ausgewertet werden muss. Platelia® beruht auf einem Antikörper, der gegen *C. albicans* gerichtet ist. Kreuzreaktionen mit anderen fakultativ pathogenen *Candida*-Arten verursachen in verschiedenen Untersuchungen eine Spezifität zwischen 32-98% (Rimek et al. 2004).

Der „SERION ELISA *antigen Candida*“ weist mit einer Sensitivität von 80% acht verschiedene Mannane im Serum nach (Virion\Serion 2005). Die hohe Spezifität von 93,4% für die Untersuchung von Serum lässt sich damit erklären, dass aufgrund der bekannten Kreuzreaktivität nicht nur *C. albicans*, sondern auch *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. orientalis* und

*C. tropicalis* ein positives Testergebnis verursachen. Eine genaue Spezifizierung ist folglich nicht möglich. Somit lässt sich nur die Aussage *Candida* spp. „ja“ oder „nein“ treffen (Virion\Serion 2005). Die exakte Speziesdifferenzierung wird aber sowohl für die Diagnostik von invasiven wie auch lokalen Candidosen gefordert (Sobel 2007). Für die Untersuchung von Scheidenproben ist der „SERION ELISA *antigen Candida*“ zwar sensitiv genug (89,5%), aber zu wenig spezifisch (21,1%).

Die korrekte Durchführung des Testes wurde stets durch die jeweils mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen belegt. Klärende Versuche, in denen wir das empfohlene Mischungsverhältnis von 3:1 zwischen Probe und Probenpuffer variierten, führten ebenfalls nicht zu einer Verbesserung der Sensitivität und Spezifität (siehe Kap. 4.1.5 und 4.1.6). Besonders die Ergebnisse im Mischungsverhältnis 1:1 erhärten den Verdacht, dass der Elisa unspezifisch bindet oder Substrate, die über eine ähnliche molekulare Struktur wie die 8 *Candida*-Mannane verfügen, nachweist. In diesem niedrigen Verhältnis von Probe zu Puffer erbrachte der Elisa noch bei 8 von 20 Proben (40%), die in der PCR frei von *Candida* waren, ein positives Testergebnis.

Aufgrund der bekannten molekularen Ähnlichkeit von Mannanen mit der Hydroxyethylstärke (HAES), die als Plasmaexpander bei der Behandlung von Kreislaufinsuffizienz eingesetzt wird, wurde ebenfalls von vornherein eine unerwünschte Kreuzreaktion bei diesem Test für die Anwendung im Serum untersucht und ausgeschlossen (Virion\Serion 2005).

Möglicherweise verursachen also Bestandteile des Vaginalsekretes Kreuzreaktionen und damit positive Ergebnisse im *Candida*-Elisa. So wird der Blick auf die Zusammensetzung bzw. die molekulare Beschaffenheit von Vaginalsekret gelenkt. Die vaginale Normalflora wird unter anderem von Laktobazillen (=Döderlein-Bakterien) in hoher Keimzahl gebildet (Dathe et al. 2005). Hierbei handelt es sich um Milchsäure produzierende grampositive Stäbchenbakterien, die in einer Konzentration von  $10^5$ – $10^8$  Keimen/ml im Scheidensekret vorkommen (Mendling 2006). Die häufigsten Vertreter sind *Lactobacillus jensenii*, *L. acidophilus*, *L. gasseri* und *L. fermenti*, wobei mehrere Typen gleichzeitig vorkommen können (Vasquez et al. 2002). Die Funktion dieser Döderlein-Bakterien ist die Aufrechterhaltung eines sauren Scheidenmilieus, in dem pathogene Keime wie Bakterien, Pilze und Protozoen kaum lebensfähig sind. Sie lysieren die abgeschilferten, glykogenhaltigen Zellen des vaginalen Oberflächenepithels. Bei der Zellauflösung (Lyse) entstehen während der Glykogenolyse Hexosen, die anschließend zu Milchsäure vergärt werden. Der Gehalt an Milchsäure definiert letztlich den pH-Wert der Scheide, der physiologischerweise bei 4,0 – 4,5 liegt (Dathe et al. 2005).

Bei Hexosen handelt es sich um Monosaccharide, deren Kohlenstoffgrundgerüst sechs Kohlenstoff-Atome enthält. Sie haben alle die Summenformel  $C_6H_{12}O_6$ . Die bekanntesten Vertreter sind

die Glucose (eine Aldohexose) und die Fructose (eine Ketohexose). Die Mannose ist ein Epimer der Glucose (Roempp 2008). Als Epimere bezeichnet man Paare von Diastereoisomeren eines Moleküls mit mehreren Stereozentren, die sich nur an einem dieser Zentren unterscheiden (z.B. Glucose, Galaktose und Mannose). Die Mannose ist die Einheit, aus der die hochverzweigten Glykane der Hefe-Mannane bestehen (Roempp 2008).

Der untersuchte „SERION ELISA *antigen Candida*“ weist Mannane nach, also Hexosen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass der Elisa deshalb nicht für die Anwendung im Scheidensekret geeignet ist, weil dort obligat aus dem glykogenhaltigen Epithel durch die Aktivität der Laktobazillen Substrate vorliegen, welche ein positives Testergebnis verursachen. Folglich müssten aber 100% der untersuchten Scheidenproben im Elisa positiv reagieren. Dass nur 84,4% positiv waren, könnte aus dem pH-Wert der Scheide bzw. der Anzahl der Döderlein-Stäbchen resultieren. So bedingen viele Döderlein-Stäbchen eine hohe Glykolyse-Aktivität und damit einen erniedrigten pH-Wert. Es ist bekannt, dass der pH-Wert kurz vor der Menstruationsblutung und in der Schwangerschaft, wo die Zellen hormonbedingt sehr glykogenreich sind, erniedrigt ist (Sobel 2007). Auch Dennerstein konnte in einer Studie an postmenopausalen Frauen einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen Östrogen-anwendung und Vorkommen von *Candida albicans* Infektionen aufzeigen. Glykogen, welches in den östrogenstimulierten Epithelzellen vermehrt produziert wird, ist ein hervorragender Nährstoff für *Candida albicans* (Dennerstein et al. 2001). Auch die Arbeitsgruppe um Clancy fand in einer Studie mit Frauen, die an der chronischen Variante der Vulvovaginalcandidose leiden, eine erhöhte Rate an Pilzrezidiven im Zusammenhang mit hohen Östrogenspiegeln (Clancy et al. 1999).

Hypothetisch müssten dann Scheidenproben, bei denen mittels PCR kein *Candida*-Nachweis gelingt, im Elisa ebenfalls negativ getestet werden, wenn der pH-Wert  $>4,5$  ist. Wenn der pH-Wert  $<4,0$  ist, sollten die Proben im Elisa positiv ausfallen.

Um diese These zu verifizieren, wäre es hilfreich gewesen, wenn zu jeder Scheidenprobe der jeweilige pH-Wert erfasst worden wäre. Es wird also eine Kreuzreaktivität des Testes mit dem Glykogen bzw. den Hexosen im Scheidensekret vermutet. Auch Kreuzreaktionen mit anderen häufig im Fluor genitalis vorkommenden Erregern sind denkbar, z.B. *Gardnerella vaginalis*, Mykoplasmen, Streptokokken, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* und Herpes genitalis (Marrazzo 2003; Sobel 2007). Diese möglichen Infektionen wurden in der vorliegenden Studie nicht ausgeschlossen.

Ein weiterer Grund für die vielen im Elisa positiv getesteten Scheidenproben könnte in der bekannten Überexprimierung von *Candida*-Antigenen unter sauren Wachstumsbedingungen liegen (Kobayashi et al. 1997). Diese Vermutung wurde bereits 1989 von Fukazawa im Rahmen

seiner Forschungen zur Antigen-Struktur von *Candida* speziez publiziert (Fukazawa 1989). Einführend sei erwähnt, dass die Antigen-Faktoren mithilfe von monoklonalen Antikörpern, die an spezifische Mannan-Epitope binden, ermittelt werden konnten. Die erste Beschreibung eines solchen Antikörpers, der gegen Zellwand-Moleküle von *Candida albicans* gerichtet ist, stammt aus dem Jahr 1984 (Strockbine et al. 1984). Die exprimierten Mannan-Epitope sind für jede Candidagattung spezifisch, z.B. verleiht Antigen-Faktor 6 mit seiner charakteristischen Mannopyranosyl-Struktur dem *Candida albicans* Serotyp A seine Spezifität und definiert gleichzeitig den Unterschied zu *Candida albicans* Serotyp B, der durch Faktor 13b gekennzeichnet ist (Casanova et al. 1991; Gil et al. 1991). Eine Reihe von derartigen bio- und immunchemischen Untersuchungen identifizierte unter den medizinisch relevanten *Candida* speziez 10 Antigen-Faktoren, die als Antigen-Faktor 1, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 13b, und 34 bezeichnet werden (Suzuki 1997). Dies wurde auch in der jüngsten Vergangenheit in verschiedenen Studien bestätigt (Shibata et al. 2007; Oyamada et al. 2008).

Wie bereits erwähnt, fungieren jeweils typische Mannose-Polymere (sog. Mannane) von *Candida* speziez als Antigen-Faktoren und modulieren die Immunantwort im Wirt. Mannane sind verzweigte Homoglykan-Polymere aus D-Mannose, die über Proteine kovalent in der Zellwand verankert sind (Chaffin et al. 1998; Marcilla et al. 1998). Sie machen 40% aller Zellwand-Polysaccharide aus und stellen den wichtigsten Bestandteil dar. Die anderen 40-50% der Hauptkomponenten ( $\beta$ -Glucane und Chitin) sind strukturelle Bestandteile und bedingen somit die äußere Form und Beweglichkeit, beispielsweise bei der Knospung (Molano et al. 1980; Elorza et al. 1983; Marcilla et al. 1998).

Die Mannose-Polymere sind entweder über Asparagin N-glycosidisch oder O-glycosidisch über Threonin bzw. Serin an Protein-Reste der äußeren Zellwand geknüpft (Chaffin et al. 1998).

Die O-glycosidischen Mannane bestehen aus einzelnen Mannose-Resten und kurzen, unverzweigten Mannose-Oligosacchariden (Podzorski et al. 1990).

Bei den N-glycosidischen Mannose-Polymeren handelt es sich um  $\alpha$ -1,6-verknüpfte Mannopyranosyl-Ketten, an die wiederum verschiedene Oligosaccharid-Seitenketten angehängt sind. Diese Seitenketten enthalten ihrerseits Verzweigungen in Form von  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3,  $\beta$ -1,2,  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,6 und auch  $\alpha$ -1,6-Verknüpfungen (Shibata et al. 1986; Kogan et al. 1988; Fukazawa 1989; Shibata et al. 1989; Kobayashi et al. 1991). Dabei ist bekannt, dass es unter sauren Wachstumsbedingungen zur übermäßigen Ausbildung von  $\alpha$ -1,6-Verzweigungen kommt (Chaffin et al. 1998). Die Studien dazu stammen aus den 90iger Jahren von der Arbeitsgruppe um Kobayashi. Er führte den immunologischen Nachweis von Antigenfaktoren mit einem kommerziell erhältlichen Test-Kit (*Candida Check*®) durch, nachdem zuvor *Candida albicans*

Serotyp A in Sabouraud-Flüssigagar einmal bei einem pH-Wert von 5,9 im Vergleich zu einem pH-Wert von 2,0 kultiviert worden war (Kobayashi et al. 1991). Er konnte zeigen, dass durch einen niedrigen pH-Wert die  $\beta$ -1,2-Mannosyltransferase unterdrückt wird, wodurch gleichzeitig die Aktivierung des kompetitiven Enzyms, der  $\alpha$ -1,3-Mannosyltransferase, induziert wird. Parallel dazu nimmt auch die  $\alpha$ -1,6-Mannosyltransferase-Aktivität zu, welche ihrerseits die Synthese von 3,6-verzweigten Oligomannosyl-Seitenketten (=Antigen-Faktor 4) katalysiert. So war beim pH-Wert von 2,0 viel mehr Antigen-Faktor 4 messbar als beim pH-Wert von 5,9 (Kobayashi et al. 1997).

Wie aus Tab. 7 ersichtlich, weisen sich unter anderem auch die beiden häufigsten Verursacher von Vulvovaginalcandidosen, nämlich *Candida albicans* und *Candida glabrata*, durch den Antigen-Faktor 4, der auch durch den „SERION ELISA *antigen Candida*“ nachgewiesen wird, aus. Es ist also möglich, dass bei einem pH-Wert von 4-4,5 die Überexpression von Antigen-Faktor 4 für den hohen Anteil an *Candida*-Antigen-haltigen Proben verantwortlich ist. Dem widerspricht, dass eine Kolonisierung bei asymptomatischen Patientinnen oder gar Infektion bei symptomatischen Patientinnen mit vitalen Zellen vorliegen muss, die in der Lage sind, auf Umgebungsbedingungen mit einem veränderten Stoffwechsel, ergo einer veränderten Genexpression, zu reagieren. Dann müsste aber zumindest in der PCR, wenn nicht auch in der kulturellen Anzucht, *Candida* spezie nachweisbar sein. Unsere Ergebnisse zeigen aber, dass von 124 *Candida*-Antigen-haltigen Scheidenproben nur 68 auch in der PCR Pilz-DNA enthielten, wohingegen bei 56 Proben keine Pilz-DNA nachweisbar war.

Ungeachtet dieser Ergebnisse ist die Fähigkeit zur Antigen-Variabilität, d.h. die Antigen-Struktur unter verschiedenen Umgebungsbedingungen zu verändern, einer von zahlreichen Virulenzfaktoren, mittels derer *Candida* spezie über die Änderung des Phänotyps eine stets wandlungsfähige und optimierte Anpassung an den jeweiligen Wirt gelingt (Cutler 1991).

Generell wird nicht nur zur Behandlung von Vulvovaginalcandidosen ein exakter Erregernachweis gefordert (Weissenbacher et al. 2001), auch bei Candidämien ist die genaue Bestimmung der *Candida* spezie von entscheidender Bedeutung, da diese einen zunehmend wichtigen Faktor für die Letalität hospitalisierter Patienten darstellt (Rimek et al. 2004). Bei der Untersuchung von Vaginalproben wie auch Serum-Proben ist es wichtig, *albicans* und nicht-*albicans* Stämme diagnostisch zu erfassen, um eine gezielte Therapie einleiten zu können und Resistenzentwicklungen im Auge zu haben (Trama et al. 2005). Zwar sind mit dem „SERION ELISA *antigen Candida*“ *Candida*-Antigene im Serum qualitativ nachweisbar und die Menge an *candida*spezifischen Antigenen ist auch quantifizierbar (Virion\Serion 2005), eine Spezies-

Differenzierung ist mit diesem Test aber wegen der Kreuzreaktivitäten mit nicht-albicans Stämmen nicht möglich.

Auch ist bekannt, dass die Candida-Antigene oft sehr schnell vom Immunsystem aus dem Serum eliminiert werden, sodass es entsprechenden Test-Kits an Sensitivität mangelt (Ellepola et al. 2005). So erscheint es fraglich, ob sich der „SERION ELISA *antigen* Candida“ im klinischen Alltag für den Nachweis einer Fungämie durchsetzen kann. Eine sinnvolle Anwendung könnte darin bestehen, die Dynamik der Antigenmenge im Serum zu erfassen und somit den eventuellen Therapieerfolg serologisch zu überwachen.

In der vorliegenden Arbeit ergab sich die Notwendigkeit, den Zellaufschluss im Vorfeld der PCR auf zwei Arten durchzuführen. Nach dem Aufschluss-Protokoll (von uns als Methode A bezeichnet), welches bis dahin die laborübliche Methode darstellte (siehe 3.2.4.1.1), konnte nur bei insgesamt fünf Proben ein Candida-Nachweis mittels PCR erbracht werden. Das Problem wurde behoben, indem wir alle Reagenzien und die Primer erneuerten und für den Zellaufschluss ein anwenderfreundliches, kommerzielles Test-Kit für Hefezellen verwendeten (siehe 3.1.4). Hiermit gelangen der Zellaufschluss und die nachfolgende PCR problemlos. Wir gehen deshalb davon aus, dass ein denaturiertes Enzym oder ein verdorbener Puffer für die mangelnde Produktbildung in der PCR verantwortlich war. Laut Bangsow kann dies die Ursache für eine mangelhafte Produktbildung sein, sodass es nur bei Proben mit bereits initial sehr hohem Gehalt an Candida-DNA zur Produktbildung kommt (Bangsow et al. 2007). Diese These wird dadurch gestützt, dass die in unserer Studie mitgeführten Positiv-Kontrollen (Candida-Reinkulturen) stets auch ein positives PCR-Ergebnis erbrachten.

Der Vergleich der PCR mit der kulturellen Anzüchtung zeigt, dass nur bei 44 von 58 Proben (75,9%), bei denen in der Kultur Candida angezchtet werden konnte, auch der Candida-Nachweis in der PCR gelang. Erwartungsgemäß hätten jedoch alle 58 Proben in der PCR positiv sein sollen. Weder der Zellaufschluss nach Methode A noch nach Methode B führten zum erwarteten Ergebnis. In unserer Studie blieb bei 57 von 89 Proben (64,0%) der Candidanachweis in beiden Testverfahren aus. Bei 32 symptomatischen Patientinnen konnte Candida in der PCR nachgewiesen werden, wobei die entsprechenden Vaginalabstriche in der zuvor vorgenommenen kulturellen Anzüchtung kein Pilzwachstum zeigten. Es war also bei 42,1% der PCR-positiven Patientinnen kein Pilznachweis mittels kultureller Anzüchtung zu erbringen. Somit lässt sich sagen, dass das Anlegen von Kulturen bei ca. 2/5 der Patientinnen diagnostisch keine Klärung bringt. Laut Mendling kann dies durch eine zu geringe Keimzahl erklärt werden, sodass es in der Kultur zu keinem Wachstum kommt (Mendling 2006). Für die PCR hingegen sind weitaus

geringere Mengen ausreichend, um ein positives Candida-Ergebnis zu erhalten, da es sich bei dieser Methode um einen DNA-Nachweis handelt (Bangsow et al. 2007). Somit ist die Sensitivität der PCR weitaus höher als die der Kultur. Dies deckt sich mit mehreren Studien, bei denen die PCR ebenso wie in der vorliegenden Arbeit aus klinischen Proben, also aus Vaginalabstrichen oder Vaginalspülungen durchgeführt wurde (Giraldo et al. 2000; Luo et al. 2002; Tabrizi et al. 2006; Xiang et al. 2007; Weissenbacher et al. 2008). Bei den zitierten Autoren war jede Scheidenprobe, die in PCR Candida enthielt, auch zuvor in der kulturellen Anzucht candidapositiv gewesen. In der Studie von Xiang et al., in der ebenfalls Vaginalproben im Vergleich Kultur zu PCR untersucht wurden, stimmten von 300 Kulturergebnissen nur 297 exakt mit den PCR-Ergebnissen überein. Als Grund konnte seine Arbeitsgruppe durch eine Sequenzanalyse ermitteln, dass bei den 3 Proben die Kultur einen falschen Candida-Stamm ermittelt hatte (Xiang et al. 2007). In der Studie von Tabrizi et al. konnten bei allen untersuchten 90 Scheidenproben, die kulturell Candida spp. enthielten, auch in der PCR Candida nachgewiesen werden (Tabrizi et al. 2006). Analoge Ergebnisse wurden auch von Weissenbacher et al. in seiner Untersuchung von 104 Scheidenproben veröffentlicht, in der mittels Kultur bei 29,8% der Proben ein Candida-Nachweis gelang. Mittels PCR gelang dies bei 42,3%, wobei jede Kultur-positive Probe auch in der PCR einen positiven Candida-Nachweis erbrachte (Weissenbacher et al. 2008).

In unserer Studie hingegen gelang bei 14 Scheidenproben kein Nachweis mittels PCR, obwohl in der Kultur Candida angewachsen war. Auch in der Literatur gibt es bezüglich der Sensitivität der PCR kontroverse Meinungen. So zweifeln Mardh et al. die PCR als Goldstandard zum Candidanachweis in Scheidenproben an: demzufolge kämen im Vergleich zu Kultur und Mikroskopie sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse in der candidaspezifischen PCR vor, gleichgültig, ob die Proben aus dem hinteren Scheidengewölbe oder vom Introitus entnommen wurden (Mardh et al. 2002). In einer Studie mit 73 Frauen waren 43,8% sowohl in der PCR als auch der Kultur positiv, 17,8% waren nur in der PCR positiv, 20,5% nur Kultur-positiv, in der PCR jedoch negativ (Mardh et al. 2003). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit lässt hierüber keine eindeutige Aussage zu: so wurden 75,9% der untersuchten Proben übereinstimmend in Kultur und PCR positiv getestet. Nur in der PCR positiv waren 42,1% (32 von 76 Proben) und nur in der Kultur positiv waren 22,4% (13 von 58).

Die nicht erwartete, fehlende Produktbildung in der PCR bei den 14 Proben, die in der Kultur positiv waren, könnte durch die Thesen von Bangsow et al. erklärt werden: einerseits ist es möglich, dass es Hemmstoffe in den Proben gibt, z.B. Blut oder Proteine, welche die PCR hemmen, da die amplifizierten DNA-Produkte von solchen Hemmstoffen verdaut werden. Andererseits kann es sein, dass die Sequenz der Primer nicht exakt mit dem Template

(genomische Candida-DNA) übereinstimmt und es so zu Fehlpaarungen (mismatches) kommt (Bangsow et al. 2007).

Es ist zu betonen, dass der Nachweis von Candida spezie in der PCR nicht zwischen Kolonisation und Infektion unterscheiden kann (Giraldo et al. 2000). Die nachgewiesene DNA kann sowohl aus vitalen, wie auch aus toten oder aus bereits phagozytierten Zellen stammen (Ansorg 2008). Theoretisch reicht ein einziger DNA-Strang als Matrize für die Amplifikation in der PCR aus (Bangsow et al. 2007). So erklärt sich auch die allgemein anerkannte höhere Sensitivität der PCR im Vergleich zur Kultur (AWMFonline 08/2006). Dies mündet aber laut Sobel in einer Überdiagnostik, die eventuell eine nicht indizierte Therapie von asymptomatischen Candida-Trägerinnen nach sich zieht (Sobel 2007).

Welches der neueren diagnostischen Verfahren zum Nachweis von Candida spezie im Vaginalsekret sich neben PCR und Kultur durchsetzen kann, bleibt abzuwarten. Für die Arbeit in der klinischen Routine ist und bleibt jedoch ein verlässlicher Erregernachweis obligat, da dies die Grundlage für die evidenzbasierte Therapie einer Vulvovaginalcandidose bildet. Hierzu wird auch die für 12/2008 geplante Überarbeitung und Aktualisierung der Leitlinien zur Vulvovaginalcandidose der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft und der Arbeitsgemeinschaft für Infektionen und Infektionsimmunologie (AGII) der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe für Anfang 2009 erwartet.

## 6 Zusammenfassung

Wir untersuchten in unserer Studie insgesamt 147 Scheidenproben von Patientinnen mit dem klinischen Bild einer Vulvovaginalcandidose. Die prämenopausalen und nichtschwangeren Frauen wiesen akute oder chronische Beschwerden im Genitalbereich wie Brennen, Juckreiz oder Fluor vaginalis auf.

Ziel war es herauszufinden, ob sich der Candida-Elisa „SERION ELISA *antigen* Candida“ zum qualitativen Nachweis von Candida spezieis für die Untersuchung von Vaginalsekret eignet. Bei dem Test handelt sich um einen Enzym-linked-immuno-sorbent-assay zum Nachweis von candidaspezifischen Antigenen, der zur Bestimmung einer Candida-Fungämie im humanen Serum zugelassen ist. Eine Speziesdifferenzierung ist damit nicht möglich.

Wir verglichen den Test mit den etablierten diagnostischen Verfahren der kulturellen Anzuchtung und der PCR. Die kulturelle Anzuchtung wurde gewählt, weil sie in der klinischen Routine nach Anamnese, klinischem Befund und Mikroskopie die Methode der Wahl zum Candida-Nachweis ist. Die PCR führten wir durch, da der Nachweis von candidaspezifischer DNA die sensitivste Methode zum Candidanachweis im Vaginalsekret darstellt.

In der statistischen Auswertung konnte für den „SERION ELISA *antigen* Candida“ im Vergleich mit der PCR eine Sensitivität von 89,5% (95%-KI = [ 79,8% ; 95,0% ]) und eine Spezifität von 21,1% (95%-KI = [ 12,7% ; 32,7% ]) ermittelt werden. Die errechnete Wahrscheinlichkeit, dass ein positives Ergebnis im Elisa auch wirklich positiv ist (PPW), beträgt 54,8%. Umgekehrt beträgt der negative prädikative Wert (NPW) des Antigen-Elisa 65,2%.

Analoge Ergebnisse liefert auch der Vergleich des „SERION ELISA *antigen* Candida“ mit der kulturellen Anzuchtung. Hier beträgt die Sensitivität 94,8% (95%-KI = [ 84,7% ; 98,7% ]) und die Spezifität 22,5% (95%-KI = [ 14,6% ; 32,8% ]) mit einem PPW von 44,4% und einem NPW von 87,0%.

Da mittels des „SERION ELISA *antigen* Candida“ zwar ein ausreichend sensitiver, aber zu unspezifischer Nachweis von Candida im Vaginalsekret im Vergleich zu den etablierten Untersuchungsverfahren zu erbringen war, ist diese Methode nicht geeignet, um der bestehenden Über- und Unterdiagnostik des vulvovaginalen Candida-Befalles in der klinischen Routine abzuhelpfen.

Die wahrscheinlichsten Gründe dafür scheinen in der Beschaffenheit von Vaginalsekret zu liegen: es wird eine Kreuzreaktivität des Tests mit dem Glykogen bzw. den Hexosen im

Scheidensekret vermutet. Auch Kreuzreaktionen mit anderen häufig im Fluor genitalis vorkommenden fakultativen Pathogenen sind denkbar.

Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen müsste ein Test auf Candida-Antigene speziell für die Untersuchung von Scheidensekret entwickelt werden.

Da der spezifische Erregernachweis die Basis für eine sinnvolle Therapie ist, werden auch zukünftig immer wieder innovative Verfahren erprobt werden, um gleichzeitig valide wie auch kostengünstig *Candida* spp. im Vaginalsekret nachzuweisen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Allan, E. K., Jordanides, N. E., McLintock, L. A., Copland, M., Devaney, M., Stewart, K., Parker, A. N., Johnson, P. R., Holyoake, T. L. & Jones, B. L. (2005): "Poor performance of galactomannan and mannan sandwich enzyme-linked immunosorbent assays in the diagnosis of invasive fungal infection." *Br J Haematol* 128(4): 578-9.
- Anderson, M. R., Klink, K. & Cohrssen, A. (2004): "Evaluation of vaginal complaints." *JAMA* 291(11): 1368-79.
- Ansorg, R. (2008): *Endomykosen. Labor und Diagnose*. L. Thomas. Frankfurt/Main, TH-Books-Verlags-Gesellschaft. 7. Auflage: 1730-1742.
- AWMFOonline, L. (08/2006): *Leitlinien zur Vulvovaginalkandidose*, Deutsche Dermatologische Gesellschaft, Deutschsprachige Mykologische Gesellschaft und Arbeitsgemeinschaft für Infektionen und Infektionsimmunologie (AGII), Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe.
- Bangsow, T., Deutsch, U., Engel, H., Korfhage, C. & Löffert, D. (2007): *Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Gentechnische Methoden*. M. Jansohn. München, Elsevier GmbH. 4. Auflage: 153-187.
- BDDiagnosticSystems (2005): *BBL™ CHROMagar™ Candida*. Le Pont de Claix, Frankreich.
- Bruhns, C. & Alexander, A. (1928): *Dermatomykosen Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten Band XI*. J. Jadassohn. Berlin, Verlag von Julius Springer. Elfter Band: 82-117.
- Casanova, M. & Chaffin, W. L. (1991): "Cell wall glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods." *J Gen Microbiol* 137(5): 1045-51.
- Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. & Martinez, J. P. (1998): "Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression." *Microbiol Mol Biol Rev* 62(1): 130-80.
- Chibana, H., Oka, N., Nakayama, H., Aoyama, T., Magee, B. B., Magee, P. T. & Mikami, Y. (2005): "Sequence finishing and gene mapping for *Candida albicans* chromosome 7 and syntenic analysis against the *Saccharomyces cerevisiae* genome." *Genetics* 170(4): 1525-37.
- Clancy, R., Corrigan, E., Dunkley, M., Evers, F. & Beagley, K. (1999): "Recurrent vulvovaginal candidiasis - allergy or immune deficiency?" *Int Arch Allergy Immunol* 118(2-4): 349-50.
- Cutler, J. E. (1991): "Putative virulence factors of *Candida albicans*." *Annu Rev Microbiol* 45: 187-218.
- Dathe, O. & Grubert, T. (2005): *Gynäkologische Entzündungen und sexuell übertragbare Erkrankungen*. Gynäkologie und Geburtshilfe M. Stauber, Weyerstahl, Thomas. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG. 2. Auflage: 172-210.
- Dennerstein, G. J. & Ellis, D. H. (2001): "Oestrogen, glycogen and vaginal candidiasis." *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 41(3): 326-8.
- Ellepola, A. N. & Morrison, C. J. (2005): "Laboratory diagnosis of invasive candidiasis." *J Microbiol* 43 Spec No: 65-84.
- Elorza, M. V., Rico, H. & Sentandreu, R. (1983): "Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells." *J Gen Microbiol* 129(5): 1577-82.
- Engberts, M. K., Goedbloed, A. F., van Haften, M., Boon, M. E. & Heintz, P. M. (2007): "Microscopic diagnosis of vulvovaginal candidiasis in stained vaginal smears by Dutch general practitioners." *Acta Cytol* 51(6): 882-5.
- Evans, E. G. (1990): "Diagnostic laboratory techniques in vaginal candidosis." *Br J Clin Pract Suppl* 71: 70-2.
- Fukazawa, Y. (1989): "Antigenic structure of *Candida albicans*. Immunochemical basis of the serologic specificity of the mannans in yeasts." *Immunol Ser* 47: 37-62.

- Garaizar, J., Brena, S., Bikandi, J., Rementeria, A. & Ponton, J. (2006): "Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*." *FEMS Yeast Res* 6(7): 987-98.
- Gil, M. L., Casanova, M., Martinez, J. P. & Sentandreu, R. (1991): "Antigenic cell wall mannoproteins in *Candida albicans* isolates and in other *Candida* species." *J Gen Microbiol* 137(5): 1053-61.
- Giraldo, P., von Nowaskonski, A., Gomes, F. A., Linhares, I., Neves, N. A. & Witkin, S. S. (2000): "Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis." *Obstet Gynecol* 95(3): 413-6.
- Horvath, L. L., Hospenthal, D. R., Murray, C. K. & Dooley, D. P. (2003): "Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*." *J Clin Microbiol* 41(6): 2629-32.
- Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B. B., Newport, G., Thorstenson, Y. R., Agabian, N., Magee, P. T., Davis, R. W. & Scherer, S. (2004): "The diploid genome sequence of *Candida albicans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(19): 7329-34.
- Kobayashi, H., Giummelly, P., Takahashi, S., Ishida, M., Sato, J., Takaku, M., Nishidate, Y., Shibata, N., Okawa, Y. & Suzuki, S. (1991): "*Candida albicans* serotype A strains grow in yeast extract-added Sabouraud liquid medium at pH 2.0, elaborating mannans without beta-1,2 linkage and phosphate group." *Biochem Biophys Res Commun* 175(3): 1003-9.
- Kobayashi, H., Tanaka, S., Suzuki, J., Kiuchi, Y., Shibata, N., Suzuki, S. & Okawa, Y. (1997): "Amended structure of side chains in a cell wall mannan from *Candida albicans* serotype A strain grown in yeast extract-Sabouraud liquid medium under acidic conditions: detection of the branched side chains corresponding to antigenic factor 4." *FEMS Microbiol Lett* 152(2): 235-42.
- Kogan, G., Pavliak, V. & Masler, L. (1988): "Structural studies of mannans from the cell walls of the pathogenic yeasts *Candida albicans* serotypes A and B and *Candida parapsilosis*." *Carbohydr Res* 172(2): 243-53.
- Luo, G. & Mitchell, T. G. (2002): "Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR." *J Clin Microbiol* 40(8): 2860-5.
- Marcilla, A., Valentin, E. & Sentandreu, R. (1998): "The cell wall structure: developments in diagnosis and treatment of candidiasis." *Int Microbiol* 1(2): 107-16.
- Mardh, P. A., Novikova, N., Witkin, S. S., Korneeva, I. & Rodrigues, A. R. (2003): "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.
- Mardh, P. A., Rodrigues, A. G., Genc, M., Novikova, N., Martinez-de-Oliveira, J. & Guaschino, S. (2002): "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.
- Marrazzo, J. (2003): "Vulvovaginal candidiasis." *BMJ* 326(7397): 993-4.
- Martin, E. (1856): Ueber Entstehung und Verpflanzung des Aphytophyton. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und klinische Medicin*. R. Virchow. Berlin, Verlag von Georg Reimer. Neunter Band: 460-463.
- Meinhof, W. (1991): 150 Jahre medizinische Mykologie seit Johann Lucas Schönlein. *Fortschritte der Mykologie*. O. P. Hornstein and W. Meinhof. Erlangen, Perimed-Fachbuch-Verlags-Gesellschaft. Beiträge zur Dermatologie, Band 14: 21-33.
- Mending, W. (2001): Diagnostik bei Vulvovaginalmykosen. *Fluorpraktikum*. E. R. Weissenbacher. München, medifact-publishing: 77-98.
- Mending, W. (2002): "Neues aus der gynäkologischen Mykologie." *Frauenarzt, Der* 43: 412-416.

- Mendling, W. (2006): *Vaginose, Vaginitis, Zervizitis und Salpingitis*. Heidelberg, Springer Medizin Verlag: 69-132.
- Molano, J., Bowers, B. & Cabib, E. (1980): "Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study." *J Cell Biol* 85(2): 199-212.
- Mylonas, I. & Friese, K. (2007): "[Genital discharge in women]." *MMW Fortschr Med* 149(35-36): 42-6; quiz 47.
- Novikova, N., Rodrigues, A. & Mardh, P. A. (2002): "Can the diagnosis of recurrent vulvovaginal candidosis be improved by use of vaginal lavage samples and cultures on chromogenic agar?" *Infect Dis Obstet Gynecol* 10(2): 89-92.
- Nürnberger, L. (1930): *Die Pilzkrankungen der Scheide*. Handbuch der Gynäkologie, 5.Band/Hälfte2. W. Stoeckel. München, Bergmann, J.F.: 377-389.
- Odds, F. C. (1982): "Genital candidosis." *Clin Exp Dermatol* 7(4): 345-54.
- Odds, F. C., Arai, T., Disalvo, A. F., Evans, E. G., Hay, R. J., Randhawa, H. S., Rinaldi, M. G. & Walsh, T. J. (1992): "Nomenclature of fungal diseases: a report and recommendations from a Sub-Committee of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM)." *J Med Vet Mycol* 30(1): 1-10.
- Odds, F. C. & Bernaerts, R. (1994): "CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species." *J Clin Microbiol* 32(8): 1923-9.
- Oyamada, H., Ogawa, Y., Shibata, N., Okawa, Y., Suzuki, S. & Kobayashi, H. (2008): "Structural analysis of cell wall mannan of *Candida sojae*, a new yeast species isolated from defatted soybean flakes." *Arch Microbiol* 189(5): 483-90.
- Perry, J. L. & Miller, G. R. (1987): "Umbelliferyl-labeled galactosaminide as an aid in identification of *Candida albicans*." *J Clin Microbiol* 25(12): 2424-5.
- Podzorski, R. P., Gray, G. R. & Nelson, R. D. (1990): "Different effects of native *Candida albicans* mannan and mannan-derived oligosaccharides on antigen-stimulated lymphoproliferation in vitro." *J Immunol* 144(2): 707-16.
- Reiss, E., Tanaka, K., Bruker, G., Chazalet, V., Coleman, D., Debeaupuis, J. P., Hanazawa, R., Latge, J. P., Lortholary, J., Makimura, K., Morrison, C. J., Murayama, S. Y., Naoe, S., Paris, S., Sarfati, J., Shibuya, K., Sullivan, D., Uchida, K. & Yamaguchi, H. (1998): "Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections." *Med Mycol* 36 Suppl 1: 249-57.
- Rieth, H. (1973): "108. Folge: Aktuelle Fragen und immer wieder aktuell gewordene Probleme der medizinischen Mykologie: 8. Was ist Pilzdifferenzierung?" *Mykosen* 16(12): 409-410.
- Rimek, D., Redetzke, K., Singh, J., Heinrich, K. & Kappe, R. (2004): "[Performance of the *Candida* mannan antigen detection in patients with fungemia]." *Mycoses* 47 Suppl 1: 23-6.
- Roempp (2008): *Roempp online*, Thieme, Stuttgart.
- Sabouraud, R. (1910): *Les teignes*. Paris, Masson.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988): "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): 487-91.
- Scheininger, G. (2004): *Geschichte der Entdeckung und Therapie von Mykosen in der Gynäkologie und Geburtshilfe*. Medizinische Fakultät. München, LMU.
- Schonian, G., Tietz, H. J., Thanos, M. & Graser, Y. (1996): "[Application of molecular biological methods for diagnosis and epidemiology of human fungal infections]." *Mycoses* 39 Suppl 1: 73-80.
- Schönlein, J. L. (1856): *Zur Pathogenie der Impetigines*. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin. R. Virchow. Berlin, Verlag von Georg Reimer. Neunter Band.

- Sendid, B., Tabouret, M., Poirot, J. L., Mathieu, D., Fruit, J. & Poulain, D. (1999): "New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis." *J Clin Microbiol* 37(5): 1510-7.
- Shibata, N., Fukasawa, S., Kobayashi, H., Tojo, M., Yonezu, T., Ambo, A., Ohkubo, Y. & Suzuki, S. (1989): "Structural analysis of phospho-D-mannan-protein complexes isolated from yeast and mold form cells of *Candida albicans* NIH A-207 serotype A strain." *Carbohydr Res* 187(2): 239-53.
- Shibata, N., Kobayashi, H., Tojo, M. & Suzuki, S. (1986): "Characterization of phosphomannan-protein complexes isolated from viable cells of yeast and mycelial forms of *Candida albicans* NIH B-792 strain by the action of Zymolyase-100T." *Arch Biochem Biophys* 251(2): 697-708.
- Shibata, N., Suzuki, A., Kobayashi, H. & Okawa, Y. (2007): "Chemical structure of the cell-wall mannan of *Candida albicans* serotype A and its difference in yeast and hyphal forms." *Biochem J* 404(3): 365-72.
- Shin, J. H., Nolte, F. S. & Morrison, C. J. (1997): "Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method." *J Clin Microbiol* 35(6): 1454-9.
- Singh, S., Sobel, J. D., Bhargava, P., Boikov, D. & Vazquez, J. A. (2002): "Vaginitis due to *Candida krusei*: epidemiology, clinical aspects, and therapy." *Clin Infect Dis* 35(9): 1066-70.
- Sobel, J. D. (2007): "Vulvovaginal candidosis." *Lancet* 369(9577): 1961-71.
- Stauber, M., Weyerstahl, Thomas (2005): *Gynäkologie und Geburtshilfe*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- Strockbine, N. A., Largen, M. T. & Buckley, H. R. (1984): "Production and characterization of three monoclonal antibodies to *Candida albicans* proteins." *Infect Immun* 43(3): 1012-8.
- Suzuki, S. (1997): "Immunochemical study on mannans of genus *Candida*. I. Structural investigation of antigenic factors 1, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 13b and 34." *Curr Top Med Mycol* 8(1-2): 57-70.
- Tabrizi, S. N., Pirotta, M. V., Rudland, E. & Garland, S. M. (2006): "Detection of *Candida* species by PCR in self-collected vaginal swabs of women after taking antibiotics." *Mycoses* 49(6): 523-4.
- Taschdjian, C. L., Reiss, F. & Kozinn, P. J. (1960): "Experimental vaginal candidiasis in mice; its implications for superficial candidiasis in humans." *J Invest Dermatol* 34: 89-94.
- Trama, J. P., Adelson, M. E., Raphaelli, I., Stemmer, S. M. & Mordechai, E. (2005): "Detection of *Candida* species in vaginal samples in a clinical laboratory setting." *Infect Dis Obstet Gynecol* 13(2): 63-7.
- Vasquez, A., Jakobsson, T., Ahrne, S., Forsum, U. & Molin, G. (2002): "Vaginal lactobacillus flora of healthy Swedish women." *J Clin Microbiol* 40(8): 2746-9.
- Virion\Serion, I. (2005): *SERION ELISA antigen Candida*. I. V. S. GmbH.
- von Herff, O. (1895): *Über Scheidenmykosen. Sammlung klinischer Vorträge*. W. E. Ernst von Bergmann, Franz von Winckel. Leipzig, Verlag von Breitkopf und Härtel. 137: 493-514.
- Weissenbacher, E. R. & Spitzbart, H. (2001): *Mykosen in der Frauenheilkunde Diagnostik und Therapie*. München, medifact-publishing KG.
- Weissenbacher, T., Witkin, S. S., Ledger, W. J., Tolbert, V., Gingelmaier, A., Scholz, C., Weissenbacher, E. R., Friese, K. & Mylonas, I. (2008): "Relationship between clinical diagnosis of recurrent vulvovaginal candidiasis and detection of *Candida* species by culture and polymerase chain reaction." *Arch Gynecol Obstet*.
- Wilkinson, S. (1849): "Some remarks upon the development of epiphytes with the description of a new vegetable formation found in connexion with the human uterus." *The Lancet* 2: 448-451.

- Xiang, H., Xiong, L., Liu, X. & Tu, Z. (2007): "Rapid simultaneous detection and identification of six species *Candida* using polymerase chain reaction and reverse line hybridization assay." *J Microbiol Methods* 69(2): 282-7.
- Zdolsek, B., Hellberg, D., Froman, G., Nilsson, S. & Mardh, P. A. (1995): "Culture and wet smear microscopy in the diagnosis of low-symptomatic vulvovaginal candidosis." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 58(1): 47-51.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

Aqua a. i.	Aqua ad injectabilia
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
Candida spp.	Candida spezies
°C	Grad Celsius
Elisa	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
h	Stunden
Mb	Millionen Basen
min	Minute
NaCl	0,9%ige physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymersae-Ketten-Reaktion
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
rpm	rounds per minute
SAB-Agar	Sabouraud Nährmedium
sec	Sekunde
TMB	Tetramethylbenzidin

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung des PURGENE DNA Purification Kit .....	9
Tab. 2: Komponenten und Zusammensetzung der Testpackung .....	11
Tab. 3: Farbschema zur Identifizierung der Candidasubspezies.....	14
Tab. 4: Mastermix für eine Probe mit Polymerase der Firma Promega.....	18
Tab. 5: Mastermix für eine Probe mit Polymerase der Firma Genaxxon.....	18
Tab. 6: PCR – Zyklus im Thermocycler .....	19
Tab. 7: Antigen-Faktoren der medizinisch relevanten Candida-Stämme .....	23
Tab. 8: Protokollblatt zu den Verdünnungsreihen.....	27
Tab. 9: Ergebnisblatt der Extinktionsmessung.....	35
Tab. 10: Auswertung des Ergebnisses der Verdünnungsreihen.....	36
Tab. 11: Vierfeldertafel PCR - Elisa .....	38
Tab. 12: Vierfeldertafel Kultur - Elisa .....	39

## 8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ausstrich auf der BBL CHROMagar Candida-Platte (BDDiagnosticSystems) .....	14
Abb. 2: Kultureller Nachweis von Candida spp. mittels SAB-Agar und Chromagar .....	28
Abb. 3: Beispiel für ein fotografisch dokumentiertes PCR-Ergebnis.....	29
Abb. 4: Ergebnisse der PCR-Untersuchung; n=147 .....	30
Abb. 5: Candidanachweis mittels Elisa; n=147 .....	31
Abb. 6: Ergebnisse von PCR, Kultur und Elisa im Vergleich, n=147.....	32
Abb. 7: Hierarchische Darstellung der Ergebnisse von PCR, Kultur und Elisa, n=147.....	33

## 8.4 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Abzug Uniflow	BectonDickinson, New York, USA
Brutschrank, Typ 2770	Köttermann, Deutschland
Filterspitzen	SLG, Deutschland
	Eppendorf, Deutschland
Gelelektrophoreseapparatur, Typ HE 33	Hofer, San Francisco, CA/USA
Magnetrührgerät MR 2002	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Deutschland
Mikroskop Dialux	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mikrowellengerät, Typ MC 653	Udo Classen GmbH, Kempen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
	Gilson, Frankreich
Polaroidkamera, Typ GelCam	UniEquip, München-Martinsried, Deutschland
Spannungsquelle, Typ EPS500/400	Pharmacia LKB, San Francisco, CA/USA
Spektralphotometer Typ Anthos	Anthos Labtec Instruments, Österreich
UV-Leuchtkasten, Typ N 90	UniEquip, München-Martinsried, Deutschland
Vortexgerät, Typ VF 2	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Deutschland
Wasserbad, Typ B 3	Haake, Karlsruhe, Deutschland

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. E. R. Weissenbacher für die Überlassung des Themas, die wertvolle Unterstützung und die 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.

Für die konstruktive und anspornende Kritik in der Endphase meiner Arbeit gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. med. T. Weissenbacher.

Außerdem danke ich Frau G. Hölscher vom IBE (Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie) in Großhadern für ihre Hilfe und kompetente Unterstützung bei statistischen Fragen.

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

## Lebenslauf

**Name** Maria Brigitte Margit Kollmer  
**Adresse** Wolfratshauser Straße 94c, 81379 München  
**eMail** margitkollmer@web.de  
**Geburt** 18.06.1978 in Deggendorf  
**Familienstand** ledig, 2 Söhne (6,5 und 5 Jahre)

### Schulbildung

06/1997 Abitur am Gymnasium in Bad Kötzing

### Ausbildung

09/1997-03/1998 Krankenpflegepraktikum

04/1998-03/2001 Ausbildung zur staatlich examinierten Krankenschwester am Klinikum Deggendorf

### Studium

04/2001-04/2008 Studium der Humanmedizin an der LMU

Abschluss 04/2008

### Klinische Erfahrung

Famulaturen:

03/2004-04/2004 Innere Medizin, Klinikum Großhadern

09/2004-10/2004 Chirurgische Ambulanz, KKH Viechtach

08/2005-09/2005 Chirurgie, Schwerpunkt Viszeral- und Gefäßchirurgie, Kreiskrankenhaus Viechtach

04/2006-05/2006 Allgemeinmedizin, Praxis Dr. Schiechtl, Arnbruck

**Praktisches Jahr:**

08/2006-12/2006	Palliativmedizin, Klinikum Großhadern
12/2006-03/2007	Innere Medizin, Klinik Augustinum
04/2007-07/2007	Chirurgie, Klinikum Großhadern

**Nebentätigkeiten**

04/2001-08/2004	studentische Hilfskraft am Institut für Tropenmedizin
11/2007-01/2008	Teilzeit-Beschäftigung in der ambulanten Pflege bei Pro Sen, Ottobrunn
08/2007-09/2008	geringfügige Beschäftigung als Krankenschwester bei der Zeitarbeitsfirma Personal Power, München

**Weiterbildung**

10/2008-04/2009	Assistenzärztin in der Privatklinik Josephinum, Gastroenterologie
seit 05/2009	Assistenzärztin in der Internistischen Klinik Dr. Müller