

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

**Nachweis von Candida albicans und Bestimmung der Candida spezifischen
Immunglobuline IgA und IgG im Vaginalsekret bei Frauen mit Verdacht auf
chronisch rezidivierende Vulvovaginalcandidose**

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
An der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Christina Ertl
aus
München

2008

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Rüssmann

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2008

Meiner Mutter Ingrid S. Ertl

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	7
1. Einleitung und Fragestellung	9
1.1. Einleitung	9
1.2. Problemstellung	16
2. Material und Methode	17
2.1. Material	17
2.2. Patientinnen	17
2.2.1. Studiengruppe	17
2.2.2. Vaginalabstriche	19
2.3. Kulturen	20
2.3.1. Material	20
2.3.2. Anlegen von Pilzkulturen	20
2.4. DNA-Freisetzung	22
2.4.1. Material	22
2.4.2. DNA-Extraktion	23

2.5.	Candida PCR	24
2.5.1.	Material	24
2.5.2.	Candida-Primer	25
2.5.3.	Durchführung der PCR	25
2.5.4.	Enzymatisches Schneiden der DNA	26
2.5.4.1.	Material	26
2.5.4.2.	Durchführung	27
2.6.	Gelelektrophorese	27
2.6.1.	Material	27
2.6.2.	Durchführung	28
3.	Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)	29
3.1.	Material	29
3.2.	Bestimmung der candidaspezifischen ClgA und ClgG	29
3.2.1.	Reagenzien zur Bestimmung der Konzentration von candidaspezifischen ClgA und ClgG im Vaginalabstrich	29
3.2.2.	Gepufferte Waschlösung	30
3.2.3.	Durchführung	30
3.2.4.	Auswertung	33
4.	Ergebnisse	35

4.1.	Candidanachweis	35
4.1.1.	Kultur	35
4.1.2.	PCR	37
4.1.3.	Vergleich Kultur/PCR	40
4.2.	Auswertung des ELISA	42
4.2.1.	Ergebnisse der Bestimmung von candidaspezifischen ClgA und ClgG	42
4.2.2.	PCR und ELISA – Ergebnisse im Vergleich	43
5.	Diskussion	48
6.	Zusammenfassung	61
7.	Literaturverzeichnis	64
8.	Anhang	85
8.1.	Geräte	85
8.2.	Datentabelle	86
8.3.	Nukleotiden - Sequenzen	91
	Danksagung	93
	Lebenslauf	94

Abkürzungen

APC	Antigenrepäsentierende Zellen
Aqua a. i.	Aqua ad injectabilia
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CIgA	candidaspezifisches Immunglobulin A
CIgG	candidaspezifisches Immunglobulin G
CRVVC	chronisch rezidivierende Vulvovaginal-Candidose
CMI	zellvermittelte Immunität
Elisa	Enzyme-linken-immuno-sorbent-assay
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G

IgM	Immunglobulin M
KDa	kilo Dalton
mM	milli Mol
NaCl	Natrium-Chlorid, Kochsalz
NID-Puffer	Nonionic Detergent Puffer
NK	Natürliche Killerzellen
NTP (ATP, CTP, GTP, TTP)	Nukeotidtriphosphate (Adenosin-, Cytidin-, Guanosin-, Thymidintriphosphat)
PBS-Puffer	Phosphat-Borat-Saline-Puffer
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-R.)
rpm	rounds per minute
S.D.	Standard Deviation
VVC	Vulvovaginale Candidose

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Einleitung

Patientinnen mit rezidivierenden Beschwerden einer vulvovaginalen Candidose und damit verbundenem hohen Leidensdruck stellen nach wie vor eine große Anforderung an den Arzt.

Etwa drei Viertel aller Frauen haben mindestens einmal in ihrem Leben eine Episode einer Candidainfektion [88,83,116], wobei bis zur Mitte des zwanzigsten Lebensjahres etwa die Hälfte aller Frauen einmal an einer vulvovaginalen Candidose erkrankt waren [89]. Bei insgesamt 5-10% kommt es zu einer rezidivierenden Erkrankung [5,11,83,89,116]. Die Diagnose einer chronisch rezidivierenden vulvovaginalen Candidose (CRVVC) wird bei Patientinnen gestellt, wenn mindestens 4 Episoden einer Candidainfektion auftreten [83,89]. Von Krankheitsbild der vulvovaginalen Candidose spricht man, wenn es durch die Sprosspilzbesiedlung zu Symptomen wie Juckreiz, Ausfluss, Brennen und schmerzhaften Geschlechtsverkehr kommt [96,99,112,153].

Für die Entstehung einer Candidose können verschiedene prädisponierende Faktoren als Ursache des Pilzwachstums festgestellt werden. Es gibt sowohl endogene, hier sind hohe Östrogen-Spiegel bei hormonellen Schwankungen oder unter oraler Antikonzeption zu nennen – wobei dies fraglich ist, da dies eher vom Hormongehalt abhängig ist, wie andere Studien berichten- [5,29,45,112], als auch exogene Faktoren welche den Krankheitsverlauf als auch die Symptomatik triggern können.

Als wichtigste exogene Faktoren sind Antibiotika-Therapie [45,112,153,159] und immunsuppressive Substanzen zu nennen, wobei die Antibiotika-Einnahme als Risikofaktor bezeichnet werden kann. Für das Auftreten einer Candidose können auch Diabetes mellitus und/oder Schwangerschaft ursächlich sein [5,23,34,35,36,40,77,80,116,150]. Bei Patientinnen mit CRVVC sind aber im Gegensatz zur akuten vulvovaginalen Candidiasis diese prädisponierenden Faktoren nur selten vorhanden oder fehlen gänzlich [5].

Eine vulvovaginale Candidose wird in mehr als 85% der Fälle durch eine Infektion mit *Candida albicans*, gefolgt von *Candida glabrata* in 4-5%, verursacht. Seltener sind Infektionen mit *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* [45,77,80,116,130].

Der Abwehrmechanismus gegen eine vaginale Candidainfektion ist bis heute nur ungenügend geklärt. *Candida albicans* ist ein dimorpher Mikroorganismus. Neben der Hefenform, welche in erster Linie bei oberflächlichen Infektionen auftritt, sind die Mycelform (echte oder sog. Pseudomyzelien) eine weitere Erscheinungsform der Sprosspilze. Die Ausbildung vom Keimschläuchen tritt überwiegend bei invasiven Mykosen auf. *Candida*-Sprosspilze produzieren und sezernieren eine Vielzahl von Enzymen, die dem fakultativ pathogenen Mikroorganismus die Penetration von Blutgefäßen und Schleimhautbarrieren ermöglichen. Bei Störungen der fungistatischen Eigenschaften der Hautoberfläche, z. B. den leicht sauren pH, können oberflächliche Candidosen entstehen. Invasiven Mykosen geht meist eine Besiedlung der Haut voraus [146].

Beide Formen können mit einer klinischen Infektion assoziiert sein, wobei die Mycelform besonders pathogen ist, denn bei der Umwandlung der Sprosszelle zur Mycelform erlangt *Candida albicans* die Fähigkeit zur Invasion, d.h. sie penetrieren das Gewebe, so dass die Voraussetzungen für die Entstehung einer Endomykose gegeben sind [19,113,146].

Die CRVVC ist eine Erkrankung, die nach wie vor schwierig zu behandeln ist, vor allem da die Diagnose von vielen Frauen, die an einer chronisch-rezidivierenden Pilzinfektion leiden, als Selbstdiagnose gestellt wird und ohne Erregernachweis aufgrund der ihnen bekannten Symptome, wie Juckreiz, Brennen und Fluor, in der Apotheke rezeptfreie Antimykotika erworben werden [41,84,130]. Auch Gynäkologen stellen oft zu schnell ohne mikroskopische Untersuchung oder kulturellen Nachweis, teilweise sogar telefonisch, aufgrund des genannten Symptomkomplexes die Diagnose der chronisch rezidivierenden vulvovaginalen Candidose. Folge ist eine oft unvollständige und nicht indizierte Einnahme. Dadurch wird eine Zunahme der Imidazol-resistenten Stämme befürchtet [2,22,79,106,111,120,126,130]. Es kann dadurch zur Elimination der

sensitiven *Candida albicans* Stämme kommen, so dass sich eine Selektion der azolresistenten Stämme bildet. Häufig ist hierbei *Candida glabrata* zu finden.

Die nicht indizierte, übertriebene Anwendung von Antimykotika kann außerdem zur Entwicklung einer Kontaktdermatitis führen. Hier zeigen sich, ähnlich wie bei der *Candida*-Infektion, Symptome wie Pruritus, Erythem und/oder Fluor, wodurch eine erneute Anwendung von Antimykotika zu einem Circulus vitiosus führen kann [96,123,129,134].

Da aber bei nur ca. einem Drittel aller Frauen mit Verdacht auf chronisch rezidivierende vulvovaginale Candidose wirklich eine Pilzinfektion mittels Kultur oder PCR bestätigt werden konnte, was das schlechte Ansprechen der Therapie bei vielen Patientinnen erklärt, müssen andere Mechanismen für die Symptome verantwortlich sein.

Deshalb untersuchte Professor Weissenbacher bei Patientinnen, die an jahrelang rezidivierenden Beschwerden ohne wesentlichen therapeutischen Erfolg leiden, ob ein allergisches Geschehen Ursache der Beschwerden sein könnte. Bereits in früheren Studien konnte das Vorkommen allergischer Reaktionen auf *Candida* im Sinne einer lokalen vaginalen hypersensitiven Immunantwort gezeigt werden [56,67,112,115,138].

Bei der Bekämpfung von vulvovaginalen Candidose ist die zelluläre Immunität der Vagina entscheidend [1,20,25,44,47,54,58,63,68,86,87,105,117,135,136,152,154,157]. Aber auch die humorale Immunantwort kommt über eine Antikörperproduktion zum tragen. Hier wird dem candidaspezifischen Immunglobulin A (CIgA) eine protektive Rolle zugesprochen. Da die Sekretion der Antikörper Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin M (IgM) und auch Immunglobulin A (IgA) im vaginalen Sekret nicht ausreicht, um einen natürlichen Schutz gegen eine Candidainfektion zu gewährleisten [13], spielt die humorale Antwort bisher nur eine untergeordnete Rolle; vor allem da sie nur während einer kurzen Phase der Kolonisation wirksam ist [89].

Der Isotyp Immunglobulin G kommt vor allem im Blut, der Lymphe und der Peritonealflüssigkeit vor und hat eine lange Halbwertszeit von 3 Wochen im Serum.

Eine wichtige Komponente der „first-line“ - Verteidigung beim Schutz vor Organismen ist Immunglobulin A, der Isotyp, der vor allem in den Schleimhautsekreten vorkommt.

Prinzipiell kann man den Mechanismus der humoralen Immunantwort erklären: Die humorale Immunität wird von Proteinen vermittelt, diese sogenannten Antikörper machen Toxine und Mikroorganismen unschädlich, und entfernen somit Antigene (fremde Substanzen) aus den Körperflüssigkeiten, indem sie Phagozytose oder Lyse verstärken [64]. Die spezifische Immunabwehr mit T-Killerzellen und Immunglobulinen (zuerst IgM, dann IgG) tritt nur langsam in Aktion, schafft es aber doch den Erreger unschädlich zu machen. Bei einer Zweitinfektion setzt die Antikörperproduktion schlagartig ein, und eliminiert die Antigene gleich anfangs. Phagozytose und lysosomale Verdauung werden verstärkt, wenn die Antigenoberfläche mit IgM, IgG oder der Komplementkomponente C3b „gespickt“ ist, der sogenannten Opsonisierung.

Die Phagozyten besitzen Rezeptoren für den antigenunabhängigen Fc-Teil der Immunglobuline und für C3b, über die sie an das opsonierte Antigen andocken können. Damit wird die an sich unspezifische Phagozytose in die spezifische Immunabwehr einbezogen. Darüber hinaus scheint ein Protein, das an Mannan-Gruppen auf der Oberfläche von Bakterien, Pilzen und manchen Viren bindet, opsonisierend zu wirken [4,21,76,162,163].

Die spezifische humorale Immunantwort nimmt ihren Ausgang von B-Lymphozyten. Auf deren Oberfläche sind IgD und Monomere des IgM verankert, von denen mehrere an das zugehörige Antigen binden. Die dadurch ausgelöste Antikörpervernetzung löst in der B-Zelle die Initialisierung und Aufarbeitung des Antigen-Antikörper-Komplexes aus. Zur anschließenden Aktivierung der B-Zelle ist aber noch ein zweites Signal notwendig. Das kann bei sogenannten thymusunabhängigen oder TI-Antigenen vom Antigen selbst herrühren, bei der thymusabhängigen oder TD-Antigenen stammt es von TH2-Zellen, denen die B-Zellen das MHC-II-assoziierte TD-Antigen präsentieren. Erkennt der T-Zell-Rezeptor der TH2-Zelle das Antigen, so exprimiert diese auf der Oberfläche den CD40-Liganden (der an das CD40-Protein der B-Zelle bindet) und sezerniert außerdem IL-4.

CD40-Ligand und IL-4 (später auch IL-5 und IL-6) lösen die klonale Selektion der B-Zelle aus, die Sekretion von monospezifischen IgM sowie die Differenzierung zu Plasmazellen. Diese produzieren, je nach Umcodierung für die Fc-Region nun IgA, IgG oder IgE, wobei alle Ig, die von einem B-Zell-Klon stammen, für das gleiche Antigen spezifisch sind [64,70,73,76,119,155,161].

Im unserem Fall also candidaspezifische Immunglobuline der Gruppe IgA und IgG, im folgenden als ClgA und ClgG bezeichnet [117,119].

Es kann trotz der protektiven Rolle durch TH1-Typ zellvermittelten Immunität zu einer Infektion kommen, da eine mangelhafte Umwandlung in lokale T-Zellen während einer Candidainfektion vorkommen kann und diese auch begünstigen, wie Studien ergaben [44,45,101,136]. Für die Entstehung einer rezidivierenden Vulvovaginalcandidose ist eine vorübergehende und lokale Hemmung der zellvermittelten Immunität verantwortlich.

Eine Übersicht über die humorale und zellvermittelte Immunität, sowie die Entstehung der B-Zelle zeigen Abbildung 1 und 2 im folgendem:

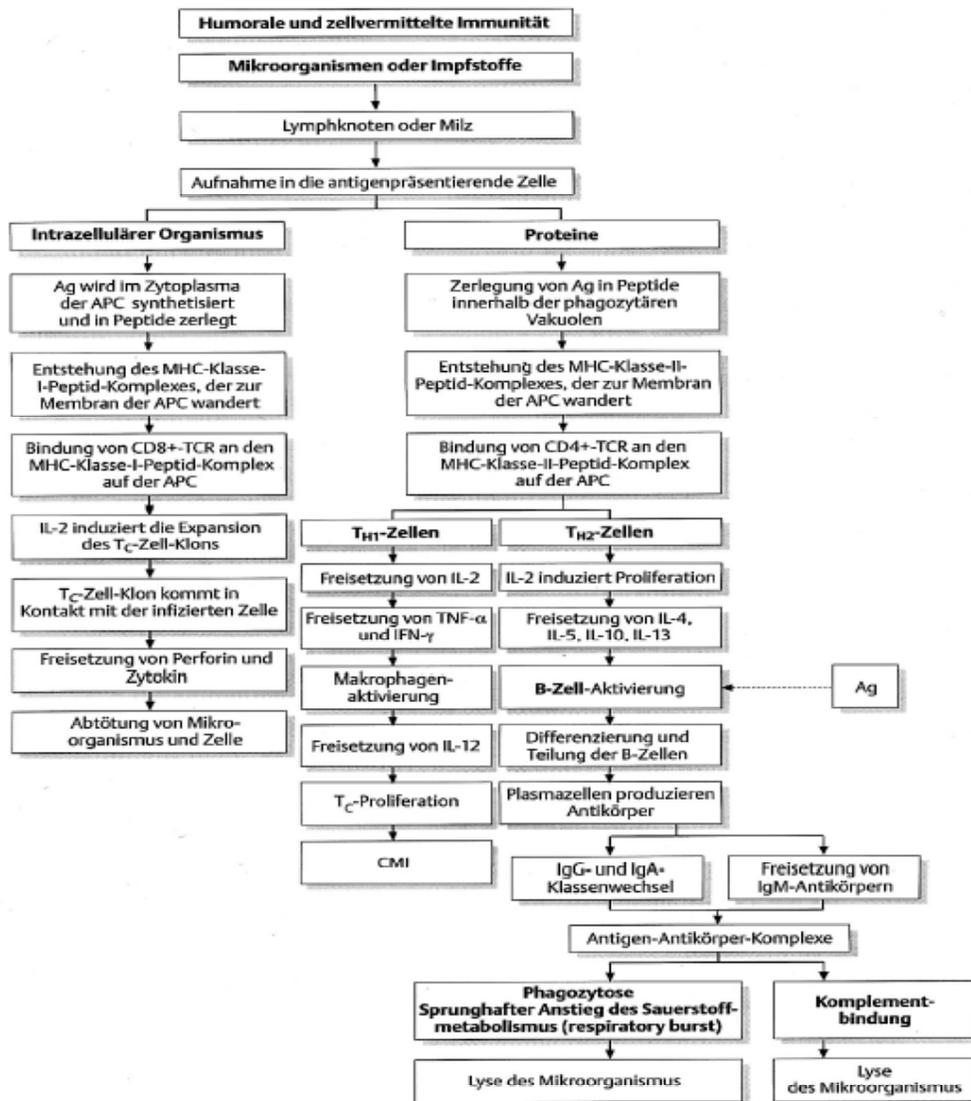


Abb. 1: Humorale und zellvermittelte Immunität [aus Johnson]

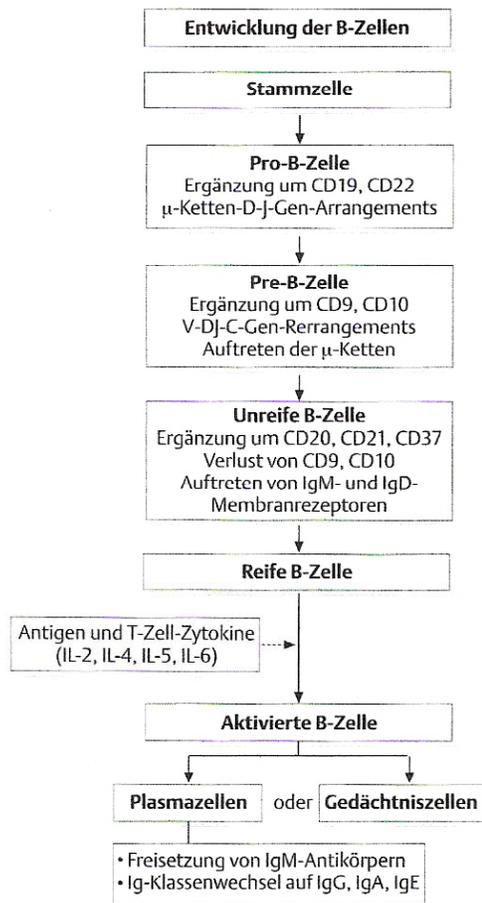


Abb. 2: Entwicklung der B-Zellen [aus Johnson]

1.2. Problemstellung

Untersucht wurden Patientinnen mit Verdacht auf eine chronisch rezidivierende vulvovaginale Candidose (CRVVC) sowie asymptotische Frauen (Kontrollgruppe) auf candidaspezifisches IgA (CIgA), CIgG und Candida im Vaginalsekret. Hierzu erfolgte der Nachweis von Candida im Scheidensekret durch Kultur und PCR, sowie die Bestimmung der candidaspezifischen Immunglobuline CIgA und CIgG im Vaginalsekret durch ELISA.

Das Ziel der Untersuchung war mehr über die lokale Immunreaktion in der Scheide herauszufinden, um somit eine effektive und gezielte Behandlung der Patientinnen zu erlangen.

Behandlungsmöglichkeiten sowie neue Therapieansätze werden in Kapitel 5 diskutiert.

2. Material und Methode

2.1. Material

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

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

Den ELISA-Testansatz zur Bestimmung des candidaspezifischen CIGA und CIGG von der Firma Virion/ Serion GmbH Würzburg/ Deutschland.

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

2.2 Patientinnen

2.2.1 Studiengruppe

In der mikrobiologischen Sprechstunde, eine Spezialsprechstunde für Infektionen, des Klinikums Großhadern wurden 184 Patientinnen mit mindestens vier pro Jahr auftretenden Episoden einer Candidasymptomatik und somit chronisch rezidivierender Candidosen untersucht. Charakteristisch waren Angaben wie Brennen, Juckreiz, Ausfluss und Erytheme. Sowohl klinisch als auch anamnestisch wurden andere Erkrankungen infektiologischer Genese wie z.b. Herpesvirus- und humane Papillomavirus-Infektionen oder bakterielle Vaginose, aber auch Schwangerschaft, Menopause und Postmenopause ausgeschlossen.

Als Kontrollgruppe dienten 46 asymptomatische Patientinnen ohne Vulvovaginitis, oder anderen gynäkologischen Infektionen, die meist zur jährlichen Routineuntersuchung in

die allgemeine Sprechstunde kamen. Das Durchschnittsalter der Candidosepatientinnen lag bei 37,3 Jahren, das der Patientinnen der Kontrollgruppe bei 35,5 Jahren.

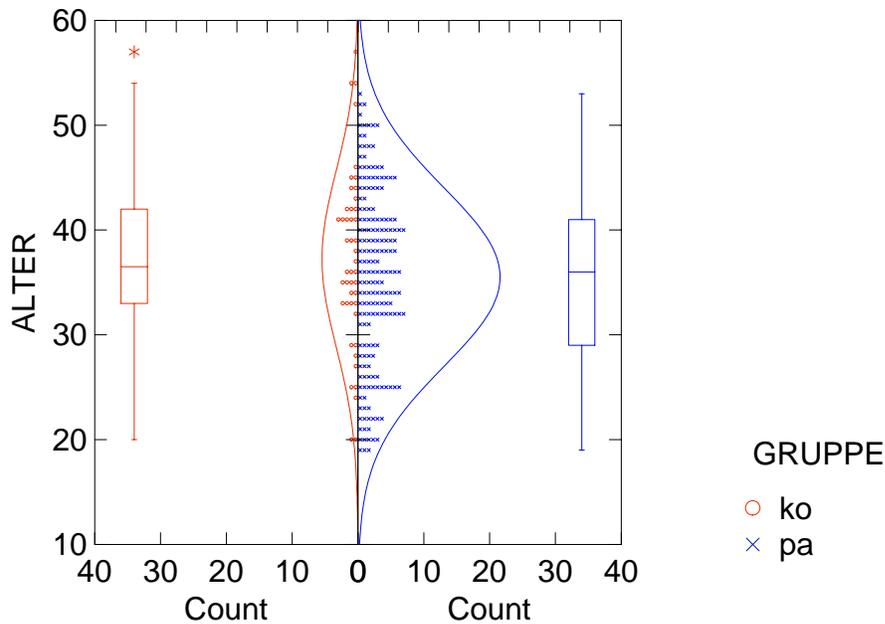


Abb. 3: Altersverteilung in Kontrollgruppe (ko) und Patientengruppe (pa)

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

2.2.2. Vaginalabstriche

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

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

Im weiteren wurden 2ml 0,9 prozentige physiologische Kochsalzlösung (NaCl) mittels einer 3ml Spritze in die Vagina eingebracht. Mit einem vierten Watteträger wurde die eingebrachte Kochsalzlösung mit dem Vaginalsekret im hinteren Scheidengewölbe kurz durchmengt, mit derselben Spritze wieder aufgenommen und noch am gleichen Tag wie folgt verarbeitet: Die Spritzen wurden kurz gevortext und das Material anschließend zu je 1ml auf zwei Eppendorfreaktionsgefäße verteilt, im folgenden nochmals kurz gevortext, anschließend bei 5000 rounds per minute (rpm) zwei Minuten lang zentrifugiert und schließlich der Überstand abpipettiert und in sterilen Eppendorfgläsern aliquotiert. Der so gewonnene Überstand wurde zum Nachweis von candidaspezifischem C1gA und C1gG verwendet.

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

2.3. Kulturen

2.3.1. Material

a) Sabouraud-Agarplatten

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

b) Chromagarplatten

Becton Dickinson, Sparks / USA , BBL ChromagarTM Candida.

2.3.2. Anlegen von Pilzkulturen

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

Die jeweiligen Farbreaktionen kommen durch Hydrolyse von chromogenen Substraten des CHROMagars zustande.

Die Candidaspezies wurde durch folgendes Farbschema identifiziert:

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

Tab. 2: Chromagar Zuordnung Species/Farbe

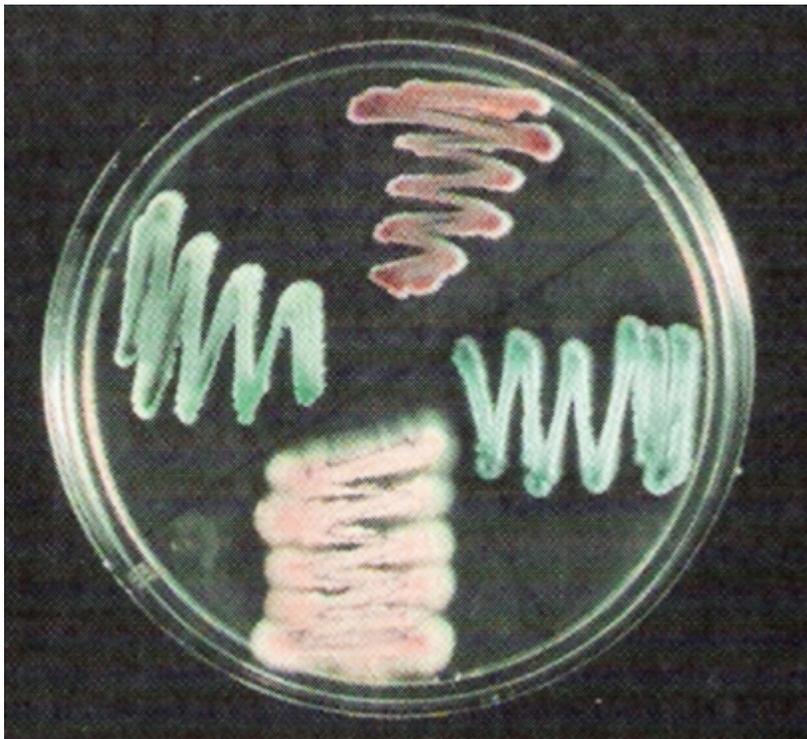


Abb. 4: Candidaspeziesdifferenzierung durch Farbreaktionen auf einer Chromagarplatte

(aus: Weissenbacher, Spitzbart: Fluorpraktikum II, S.30)

2.4. DNA-Freisetzung

2.4.1. Material

Aqua ad injectabilia

Zusammensetzung der Lytikaselösung

0,5 M EDTA Sigma, St.Louis,

Missouri / USA

PBS 1,6ml Life Technologies,

Paisley / Scotland

2 %-iges 2-Mercaptoethanol Sigma, St.Louis,

Missouri / USA

Lytikase 1mg Sigma, St.Louis,

Missouri / USA

Zusammensetzung des Nonionic Detergent Puffer (NID Puffer):

KCL 50 mM Sigma, St. Louis, Missouri / USA

Tris-HCL pH 8,3 10 mM Sigma, St. Louis, Missouri / USA

MgCL₂ 2,5 mM Sigma, St. Louis, Missouri / USA

Polyoxyethyl- 0,4g Carl Roth GmbH + Co,

enlaurylether Karlsruhe, Deutschland

Lysis Puffer Roche Dioagnostics, Branchburg, New Jersey / USA

Mineralöl Applied Biosystems

PBS Life Technologies, Paisley / Scotland

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

Aqua a.i.

2.4.2. DNA-Extraktion

Die Spritzen mit dem Probenmaterial wurden gevortext, anschließend wurden jeweils 1 ml auf zwei Eppendorfgefäße verteilt, abzentrifugiert (2 Minuten bei 5000 rpm) und der Überstand zur Immunglobulinbestimmung abpipettiert.

Zu dem Sediment des ersten Eppendorfgefäßes wurde PBS hinzugegeben, damit es zu einem späteren Zeitpunkt bearbeitet werden konnte, dem zweiten Gefäß steriles Wasser hinzugefügt und die Probe einmal gewaschen, indem sie gevortext, anschließend zentrifugiert und der Überstand abpipettiert wurde. Um die Zellwände der Pilzzellen aufzubrechen, erfolgte nach dem letzten Dekantieren eine Resuspension mit 100 µl Lytikase und eine Inkubation für 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad.

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

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

2.5. Candida PCR

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

2.5.1. Material

DNA-Polymerisationsmix: Perkin Elmer, Branchburg,
New Jersey / USA

MgCl₂ 25mM

Desoxynukleosid- 10mM

triphosphate (dNTP),
(dATP, aTTP, dGTP und dCTP)

PCR-Primer: Life Technologies,
Paisley, Scotland

10X PCR-Puffer (pH 8,3) : Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey/USA

KCl 500mM

Tris-HCl 100mM

MgCl 15mM

Gelatine 0,01% (w/v)

Taq-Polymerase: 5 U/μl Perkin Elmer, Branchburg,
New Jersey/USA

Zusammensetzung des dNTP-Mixes: Perkin Elmer, Branchburg,
New Jersey/USA
dATP, dCTP, dGTP und dTTP

2.5.2. Candida-Primer

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

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

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

Beide, in Pulverform gelieferte Primer, wurden vor Durchführung der PCR in sterilem Wasser aufgelöst und anschließend mit ebenfalls sterilem Wasser in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Die Nukleotid-Sequenzen des Genes ist im Anhang dargestellt.

2.5.3. Durchführung der PCR

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

Der verwendete Polymerisationsmix wurde nach folgendem Protokoll erstellt:

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

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

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

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

Tab. 3: PCR-Zyklus

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

2.5.4. Enzymatisches Schneiden der DNA

2.5.4.1 Material

Nsi I-Restriktionsendonuklease

New England Biolabs

Schwalbach/Taunus, Deutschland

2.5.4.2. Durchführung

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

2.6. Gelelektrophorese

2.6.1. Material

Agarose		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<u>10XTBE (Tris Boric EDTA)</u>	25ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Borat (pH 8,3)	1 M	
EDTA	20mM	
Deionisiertes Wasser		
<u>1XTE</u>		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	5ml	
EDTA	1ml	
Aqua a.i.	494 ml	
<u>DNA-Auftragspuffer</u>		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<u>Färbelösung</u>	Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH,

	(1%)	Karlsruhe, Deutschland
<u>DNA-Längenstandard</u>	Hae III Digest	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus, D

2.6.2. Durchführung

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

Zur Herstellung der Standardlösung wurden 9µl 1XTE-Puffer, 2µl DNA-Auftragspuffer und 0,2µl DNA-Längenstandard vermischt, wovon 9µl in die Vertiefungen des Gels pipettiert wurden. 2µl Bromphenolblaulösung wurden mit jeweils 9µl der Proben versehen und hiervon ebenfalls 9µl in die dafür vorgesehenen Vertiefungen gegeben.

Bei einer Stromstärke von 120 mA und einer Spannung von 300V liefen die Banden zwischen 15-20 Minuten, bis die Hälfte der Laufstrecke zurückgelegt war.

Der entstandene Ethidiumbromid-DNA-Komplex wurde unter UV-Licht bei 302nm visualisiert und mittels Polaroidkamera dokumentiert (siehe Abbildung 7, Kapitel 4.1.2 PCR).

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

Da sich die Testansätze zur Bestimmung der candidaspezifischen ClgA und ClgG nicht unterscheiden, werden Sie im Folgenden gemeinsam abgehandelt.

3.1. Material

- Serion Elisa classic Candida albicans IgA Kit (quantitativ): Institut Virion/Serion GmbH,
Würzburg, Deutschland
- Serion Elisa classic Candida albicans IgG Kit (quantitativ)
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit Filter, Wellenlänge 405nm
- Inkubator/ feuchte Kammer, 37°C
- Eppendorfpipette für 100µl mit sterilen Spitzen
- Aqua dest. Zum Herstellen der Waschlösung

3.2. Bestimmung des candidaspezifischen ClgA und ClgG

3.2.1. Reagenzien zur Bestimmung der Konzentration von candidaspezifischem ClgA/ ClgG im Vaginalabstrich

- Mikrotiterplatten, Ligand-beschichtet, bestehend aus je 8 Streifen zu 12 Bestimmungen
- Anti-human-IgA bzw. -IgG- Konjugat
- Substratlösung (Para-Nitrophenylphosphat)
- Standardserum
- Kontrollserum negativ
- Stopplösung (1,2N Natronlauge)
- Waschpufferlösungskonzentrat

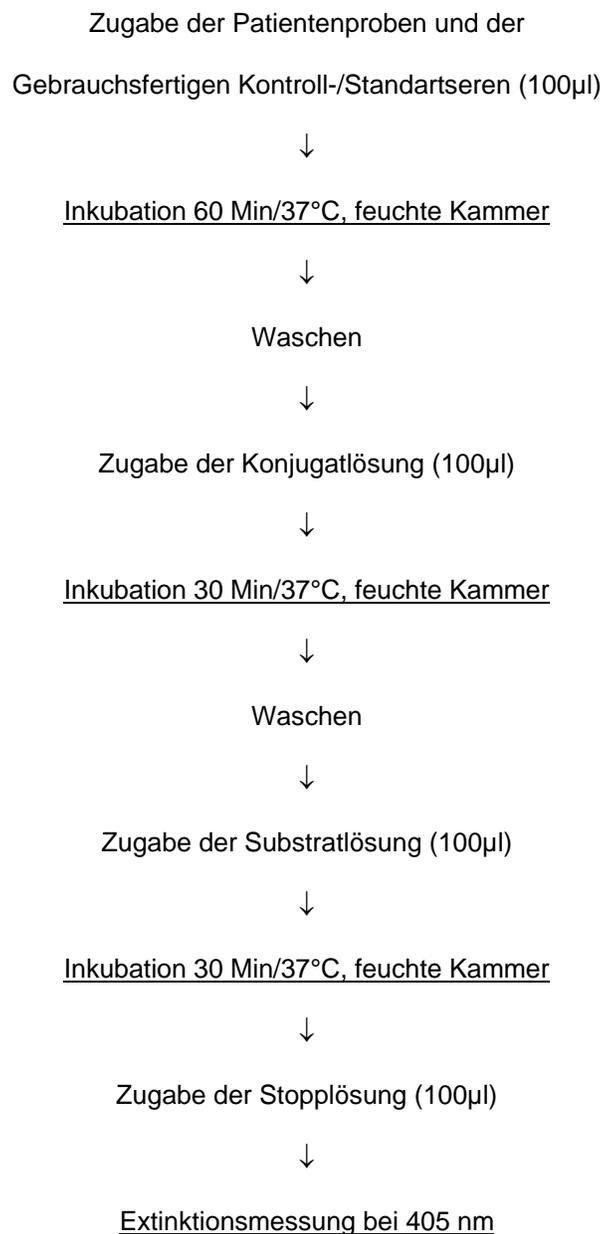
3.2.2. Gepufferte Waschlösung

Der Waschpuffer war bei Lieferung konzentriert und musste daher vor Gebrauch mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:30 verdünnt werden (d.h. 33,3ml Waschlösungskonzentrat auf ein Endvolumen von 1000ml verdünnen).

3.2.3. Durchführung

Vor Durchführung des Elisa mussten die Mikroküvetten viermal mit destilliertem Wasser gewaschen und nach dem Waschvorgang mit der Öffnung nach unten auf Fließpapier ausgeklopft werden, um mögliche Wasserreste vollständig zu entfernen. Da bei diesem Testansatz zur Bestimmung von candidaspezifischem ClgA bzw. ClgG nach der von der Firma Serion vorliegenden Standardkurve gearbeitet wurde, konnten im Anschluss ohne vorherige Erstellung einer Standardreihe 100 µl Patientenproben in die Mikroküvetten pipettiert und im weiteren für 60 Minuten bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert werden. Nach fünfmaligem, wie bereits beschriebenem Waschvorgang, wurden 100 µl von Konjugat hinzugegeben und für weitere 30 Minuten, ebenfalls bei 37°C in der feuchten Kammer, inkubiert. Nach einem weiteren fünfmaligen Waschgang konnten zum Erzielen einer Farbreaktion 100 µl von TMB/Peroxid-Substrat hinzugegeben werden. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten in der feuchten Kammer wurden 100 µl einer Stopplösung (1,2N Natronlauge) hinzupipettiert, zum Mischen leicht geschüttelt und schließlich die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 405nm photometrisch gemessen.

Übersicht Testablauf Elisa Candida albicans IgA/IgG quantitativ:



Tab. 4: Übersicht Testablauf Elisa Candida albicans CIgA/CIgG quantitativ

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgt anhand der Standardkurven von Serion (je nach Kit –Nummer bzw. Art).

3.2.4. Auswertung

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte nach der stufenlosen Bestimmung der Antikörperaktivitäten mittels Standardkurven von Serion (je nach Kit-Nummer bzw. Art).

Hierzu wurden die Testschwankungen, die von Tag zu Tag sowie von Labor zu Labor auftreten (sog. Interassay-Varianz) durch Multiplikation des aktuellen Messwerts der Patientenprobe mit dem Korrekturfaktor F ausgeglichen. Dieses Verfahren ist notwendig, um das aktuelle Messniveau des Anwenders an die chargenspezifische Standardkurve anzugleichen bzw. zu normalisieren.

$$F = \text{OD-Sollwert (des Standardserums)} / \text{OD-Tageswert (des Standardserums)}$$

Tab. 5: Berechnung des Korrekturfaktors F

Im Vorfeld wurden in unserem Labor sowohl Serumproben als auch Vaginalsekret von Patientinnen bestimmt und verglichen. Dies war nötig, um eine Vergleichbarkeit der Daten bzw. die Verwendung der Standardkurve, welche für Serum/Plasma zugelassen sind, zu erlangen. In unseren OD-Werten von Serum vs. Vaginalsekret zeigten sich keine großen Abweichungen, so dass die Einteilung der Ergebnisse anhand der Standardkurve erfolgte und die Cut-off-Werte verwendet wurden.

Die weitere Auswertung umfasst noch folgende Schritte:

Aus den 2 Extinktionswerten des Standards wird ein Mittelwert gebildet und geprüft, ob der Wert im von der Firma Serion angegebenen Toleranzbereich (chargenspezifisch) liegt, dies war bei unseren Messungen immer der Fall. Danach werden alle Messwerte der Patientenproben mit dem Korrekturfaktor F multipliziert. Über die korrigierten Messwerte der optischen Dichte können nun anhand der Standardkurven die Antikörperaktivitäten in U/ml abgelesen werden.

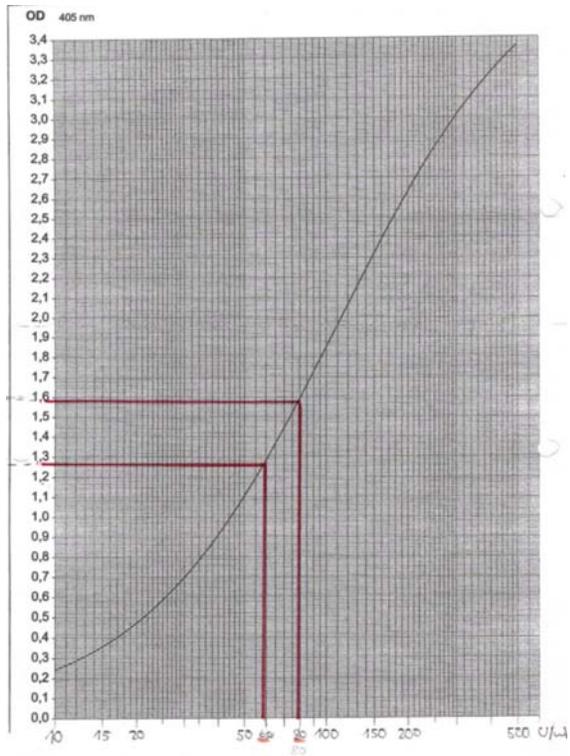


Abb. 5: Bild Standardkurve für Candida albicans ClgA

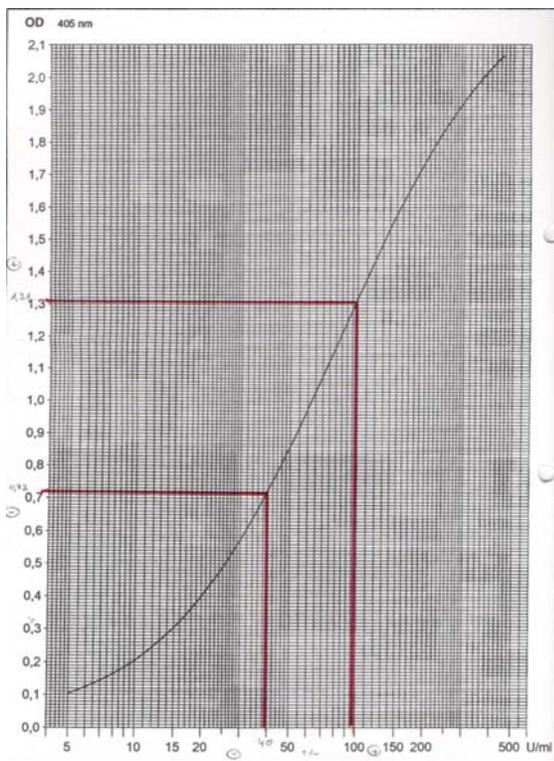


Abb. 6: Bild Standardkurve für Candida albicans ClgG

Die Ergebnisse wurden auf ein von der Firma Serion vorgegebenes Schema bezogen, welches je nach Antikörperaktivität wie folgt eingeteilt wurde:

Positive Testergebnisse	> 80 U/ml
Grenzwertige Testergebnisse	60 – 80 U/ml
Negative Testergebnisse	<60 U/ml

Tab. 6: Auswertung für Candida albicans CIGA

Positive Testergebnisse	>100 U/ml
Grenzwertige Testergebnisse	40 – 100 U/ml
Negative Testergebnisse	<40 U/ml

Tab. 7: Auswertung für Candida albicans CIGG

Der Standardkurve und diesem Schema entsprechend konnten die Proben anhand ihrer OD und ihrer dadurch zugeordneten Antikörperaktivität in positive, grenzwertige und negative Endergebnisse zugeordnet werden.

Der Grenzwert der Serion Elisa classic candidaspezifischen CIGG wurde so festgelegt, das ca. 90% der getesteten Seren eine negative bzw. grenzwertige Befundung erhalten. Positive CIGG-Befunde können somit als Hinweis auf eine aktive Infektion bewertet werden. Somit wurden unsere grenzwertigen CIGG-Testergebnisse zu den negativen Ergebnissen gezählt.

4. Ergebnisse

4.1. Candidanachweis

4.1.1. Kultur

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

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

Kultur	Kontrollgruppe	Patientengruppe
negativ	46 (100%)	153 (83%)
positiv	0 (0%)	31 (17%)
total	46 (100%)	184 (100%)

Tab. 8: Ergebnisse der Candidakultur Kontrollgruppe vs. Patientinnengruppe

In Tabelle 8 wird gezeigt, dass nur bei 31 (17%) der insgesamt 184 Patientinnen mit Symptomen eine CRVVC Candida letztendlich kulturell nachzuweisen war, wobei- wie Tabelle 9 zeigt- *Candida albicans* bei 21 und *Candida glabrata* bei 6, und *C. krusei* bei 4 Patientinnen gefunden wurde. Dies zeigt, dass die klinische Diagnose einer CRVVC bei der Mehrheit der Patientinnen retrospektiv als unzutreffend zu bezeichnen ist.

Zumindest war eine Infektion mit Candida zum Beschwerde- und Untersuchungszeitpunkt nicht alleinige Ursache für die Symptomatik der Patientinnen. Eine alleinige Behandlung dieser Patientinnen mit einer antimykotischen Medikation würde daher nicht den gewünschten Erfolg erzielen.

In der asymptomatischen Kontrollgruppe waren keine der Patientinnen Kultur-positiv.

Kultur	Candida positive (%)	Candida negative (%)
CRVVC-Patientinnen	31 (16,8%)	153 (83,2%)
n = 184		
C. albicans	21 (11,4%)	
C. glabrata	6 (3,3%)	
C. krusei	4 (2,2%)	
Kontrollgruppe	0 (0%)	46 (100%)
n = 46		
Candida albicans	0 (0%)	

Tab. 9: Kultureller Nachweis von Candida und Candida-Spezifizierung bei Patientinnen mit CRVVC und Kontrollgruppe

Tabelle 9 zeigt ebenfalls, dass in der Kontrollgruppe bei keiner der Patientinnen eine Pilzbesiedelung nachzuweisen war. Hätten wir hier einen Pilznachweis, welcher jedoch keine Beschwerden verursachte, läge in diesem Fall eine asymptomatische vaginale Candida-Kolonisation vor. Eine vaginale Pilzbesiedelung ohne Auftreten eines Beschwerdebildes wurde bereits in früheren Studien beobachtet und ist von daher als nicht ungewöhnlich zu betrachten.

4.1.2. PCR

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

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

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

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

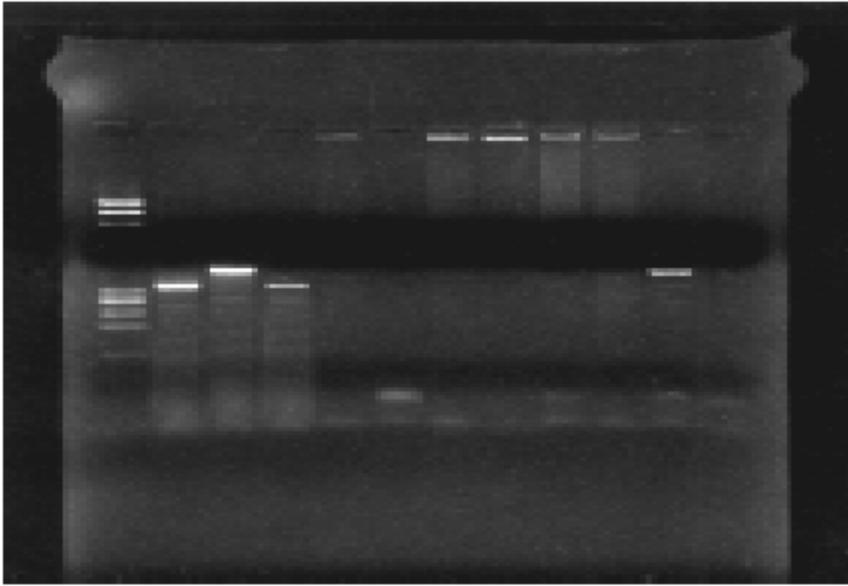


Abb. 7: Beispiel für ein PCR-Ergebnis mit einer *Candida albicans* und einer *Candida glabrata* positiven Patientenprobe. Die amplifizierten *Candida*DNA-Produkte sind 300- 350 bp.

Spur1:	DNA-Längenstandard
Spur 2:	Positive Kontrolle für <i>Candida albicans</i>
Spur 3:	Positive Kontrolle für <i>Candida glabrata</i>
Spur 4:	<i>Candida albicans</i> -positive Patientenprobe
Spuren 5-10:	negative Patientenproben
Spur 11:	<i>Candida glabrata</i> -positive Patientenprobe
Spur 12:	negative Kontrollprobe

In Tabelle 10 wird gezeigt, dass nur bei 51 (28%) der insgesamt 184 Patientinnen mit Symptomen eine CRVVC *Candida* letztendlich mittels PCR nachzuweisen war. Dies zeigt, dass die klinische Diagnose einer CRVVC bei der Mehrheit der Patientinnen retrospektiv als unzutreffend zu bezeichnen ist. Zumindest war eine Infektion mit *Candida* zum Beschwerde- und Untersuchungszeitpunkt nicht alleinige Ursache für die

Symptomatik der Patientinnen. Eine alleinige Behandlung dieser Patientinnen mit einer antimykotischen Medikation würde daher nicht den gewünschten Erfolg erzielen.

In der asymptomatischen Kontrollgruppe waren keine der Patientinnen PCR-positiv.

PCR	Kontrollgruppe	Patientengruppe
negativ	46 (100%)	133 (72%)
positiv	0 (0%)	51 (28%)
total	46 (100%)	184 (100%)

Tab. 10: Ergebnisse der PCR Kontrollgruppe vs. Patientinnengruppe

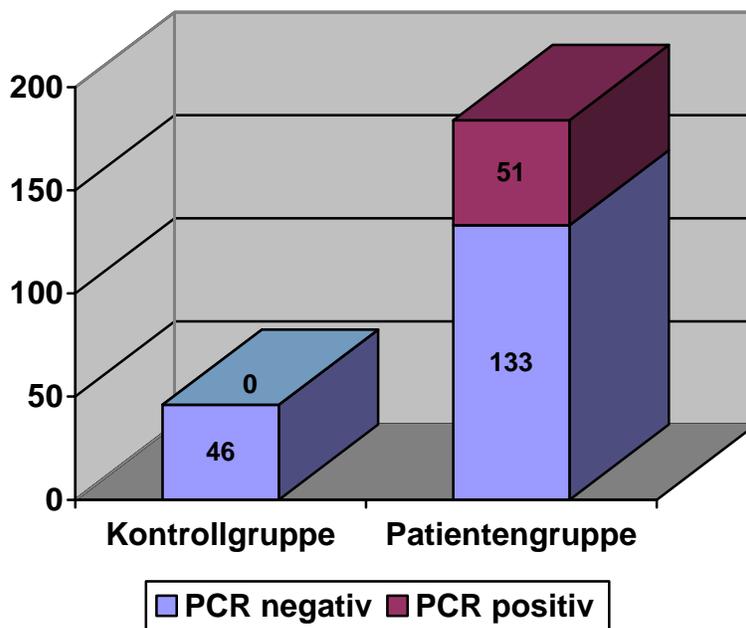


Abb. 8: Ergebnisse PCR Kontrollgruppe vs. Patientengruppe

4.1.3. Ergebnis Vergleich Kultur/PCR (Patientengruppe)

Kultur/PCR	PCR negativ	PCR positiv	total
Kultur negativ	124 (67,4%)	28 (15,2%)	152 (82,6%)
Kultur positiv	9 (4,9%)	23 (12,5%)	32 (17,4%)
total	133 (72,3%)	51 (27,7%)	184 (100%)

Tab. 11: Ergebnisse der Kultur vs. PCR in der Patientengruppe

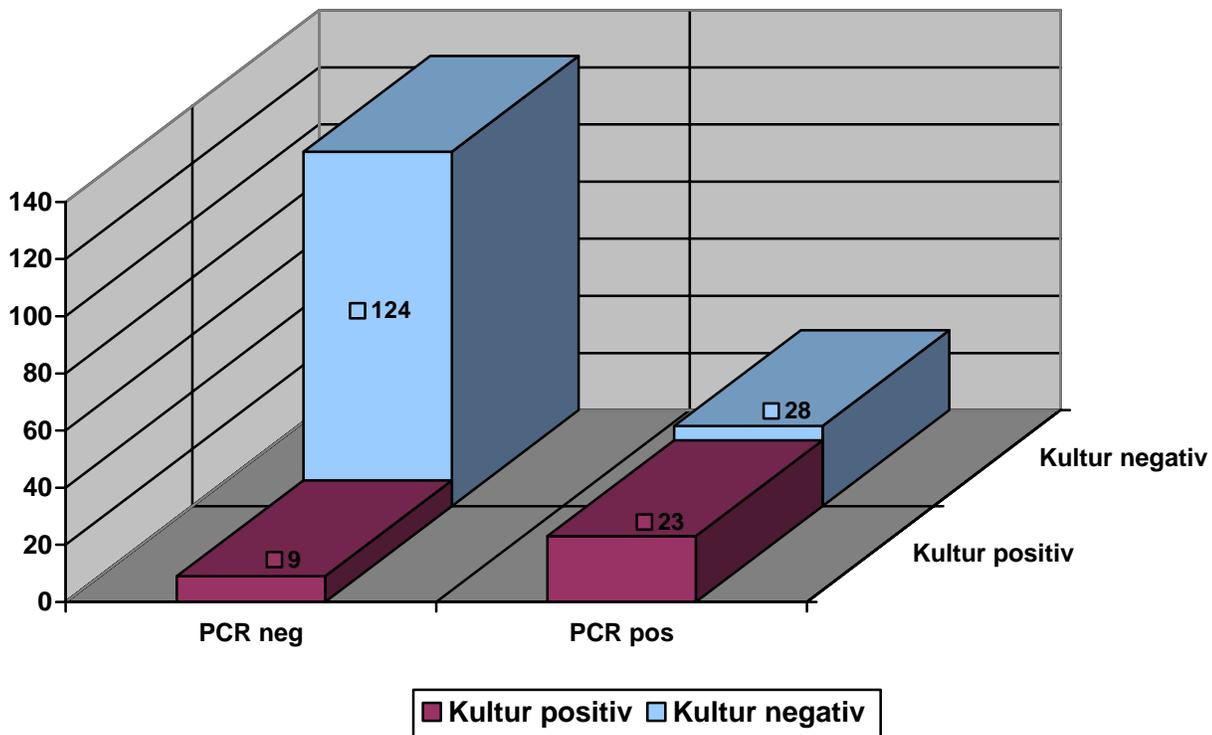


Abb. 9: Ergebnisse Vergleich PCR (positiv/negativ) zu Kultur (positiv/negativ)

Im Vergleich Kultur zu PCR ergibt sich bei der Patientengruppe in 67,4% eine Übereinstimmung von negativer PCR zu negativer Kultur. In 12,5% eine Übereinstimmung von positiver PCR zu positiver Kultur.

	Kontrollgruppe n=46	Patientengruppe n=184
PCR positiv	0 (0%)	51 (28%)
Kultur positiv	0 (0%)	31 (17%)
PCR <u>oder</u> Kultur (Candida) positiv	0 (0%)	60 (33%)

Tab. 12: Ergebnisse für Candida-Kultur und PCR in Kontrollgruppe und Patientengruppe

Man erhält insgesamt 60 PCR und/oder Kultur positive Ergebnisse, wenn man die Zahl der Kultur positiven (und PCR negativen) mit 9, der PCR positiven (und Kultur negativen) mit 28, sowie die Zahl der Kultur- und PCR- positiven mit 23 zusammen nimmt.

Wie Tabelle 12 zeigt, haben somit 60 von 184 (33%) der CRVVC-Patientinnen einen Nachweis einer Pilzbesiedelung. Nur 33%, also nur einen Drittel der Patientinnen mit Symptomen einer CRVVC hilft die antimykotische Therapie. Anders gesagt ist auch nur bei einem Drittel der Patientinnen die Verordnung von Antimykotika wirklich indiziert.

4.2. Auswertung ELISA

Die Proben konnten - anhand der von der Firma Serion erstellten chargenabhängigen Standardkurven und dem jeweiligen Schema der Antikörperaktivität entsprechend - anhand ihrer optischen Dichte und ihrer dadurch zugeordneten Antikörperaktivität in positive, grenzwertige und negative Endergebnisse zugeordnet werden.

Der Grenzwert der Serion Elisa classic candidaspezifischen ClgG wurde so festgelegt, das ca. 90% der getesteten Seren eine negative bzw. grenzwertige Befundung erhalten. Positive ClgG-Befunde können somit als Hinweis auf eine abgelaufene Infektion bewertet werden. Somit wurden unsere grenzwertigen ClgG-Testergebnisse zu den negativen Ergebnissen gezählt.

4.2.1. Ergebnisse der Bestimmung von Candidaspezifischen ClgA und ClgG

Wir konnten candidaspezifisches ClgA bei 4% der Kontrollgruppe und bei 24% der CRVVC- Patientinnen-Gruppe nachweisen.

Insgesamt konnten bei der Kontrollgruppe in 44 (96%) der Fälle eine negative ClgA und in 2 (4%) eine positive ClgA nachgewiesen werden.

In der Patientengruppe erhielten wir bei 139 (76%) Frauen negative bzw. 45 (24%) positive Ergebnisse für ClgA.

ClgA	negativ	positiv
Kontrollgruppe	44 (96%)	2 (4%)
Patientengruppe	139 (76%)	45 (24%)

Tab. 13: Ergebnisse Elisa candidaspezifisches ClgA

Wir konnten candidaspezifisches ClgG bei 15% der Kontrollgruppe und bei 50% der CRVVC- Patientinnen-Gruppe nachweisen. Insgesamt konnten bei der Kontrollgruppe in 39 (85%) der Fälle eine negative ClgG und in 7 (15%) eine positive ClgG nachgewiesen werden.

In der Patientengruppe erhielten wir jeweils bei 92 (50%) Frauen negative bzw. positive Ergebnisse für ClgG.

Die Titer bzw. Antikörperaktivität der ClgG sind bei den Patientinnen mit CRVVC deutlich höher, so dass ClgG als möglicher zusätzlicher Marker bei der Diagnose einer lokalen Candidainfektion eingesetzt werden könnte.

ClgG	negativ	positiv
Kontrollgruppe	39 (85%)	7 (15%)
Patientengruppe	92 (50%)	92 (50%)

Tab. 14: Ergebnisse Elisa candidaspezifisches ClgG

4.2.2. PCR und ELISA- Ergebnisse im Vergleich

Wie in Tabelle 15 und 16 ersichtlich, erhielten wir in der CRVVC-Patienten-Gruppe positive ClgG Ergebnisse bei 70% der PCR-positiven und bei 40% der PCR-negativen Patientinnen.

Für ClgA erhielten wir einen Nachweis bei 43 % der PCR-positiven und bei 15 % der PCR-negativen Patientinnen.

ClgA		negativ	positiv	ELISA
Kontrollgruppe n=46		44 (96%)	2 (4%)	
	Candida negative n=124	105 (85%)	19 (15%)	
				PCR
Patientengruppe n=184	Candida positive n=60	34 (57%)	26 (43%)	
	Total n=184	139 (76%)	45 (24%)	

Tab. 15: Ergebnisse Elisa/PCR ClgA; alle $p < 0,001$, statistisch signifikant

ClgG		negativ	positiv
Kontrollgruppe n=46		39 (85%)	7 (15%)
	Candida negative n=124	74 (60%)	50 (40%)
Patientengruppe n=184	Candida positive n=60	18 (30%)	42 (70%)
	Total n=184	92 (50%)	92 (50%)

Tab. 16: Ergebnisse Elisa/PCR ClgG; alle $p < 0,001$, statistisch signifikant

	ClgG UND ClgA negativ	nur ClgG positiv	nur ClgA positiv	ClgG UND ClgA positiv
Kontrollgruppe n=46	38 (82,6%)	6 (13,0%)	1 (2,2%)	1 (2,2%)
Patientengruppe				
Candida negative n=124	104 (83,9%)	7 (5,6%)	11 (8,9%)	2 (1,6%)
Candida positive n=60	15 (25,0%)	19 (31,7%)	3 (5,0%)	23 (38,3%)
Total n=184	119 (64,7%)	26 (14,1%)	14 (7,6%)	25 (13,6%)

Tab. 17: Ergebnisse Pat. Candida positive (PCR +/-Kultur) zu ELISA ClgG und ClgA

	ClgG UND ClgA negativ	nur ClgG positiv	nur ClgA positiv	ClgG UND ClgA positiv
Kontrollgruppe n=46	38 (82,6%)	6 (13,0%)	1 (2,2%)	1 (2,2%)
Patientengruppe				
nur Candida PCR negative n= 134	114 (85,1%)	7 (5,2%)	11 (8,2%)	2 (1,5%)
nur Candida PCR positive n= 50	6 (12,0%)	19 (38,0%)	3 (6,0%)	22 (44,0%)

Tab. 18: Ergebnisse Pat. nur Candida PCR-positive zu Ergebnissen ELISA ClgG und ClgA

Vergleicht man die Ergebnisse der 60 Candida positiven Patientinnen (PCR+/- Kultur positiv) mit den Ergebnissen des ELISA ClgG und ClgA, sieht man in 38,3% der Fälle ClgG und ClgA positiv, aber auch in 31,7% nur ClgG positiv, wie Tabelle 17 zeigt.

Wie Tabelle 18 zeigt, ist der Vergleich mit nur per PCR als Candida positiv nachgewiesen und den ELISA Ergebnissen für ClgG und ClgA positiv zumindest in 44,0% der Fälle übereinstimmend, wobei aber auch in 38,0% allein nur ClgG positiv ist.

Bei den 134 PCR Candida negativen Patientinnen sind 114 (85,1 %) auch ClgG und ClgA negativ, so dass ein negativer ELISA eher gegen eine Infektion spricht, und somit ebenfalls als ein diagnostisches Zusatzkriterium dienen könnte.

Die mangelnde Sensitivität der PCR in unseren Tests kann kontrovers diskutiert werden. Hierbei können verschiedene Faktoren eine Rolle spielen:

Einerseits wird angenommen, dass es Hemmstoffe in den Proben gibt (z. Bsp. Blut oder Proteine) welche die PCR hemmen, da die amplifizierten Candida DNA-Produkte von solchen Hemmstoffen verdaut werden. Des weiteren kann es sich auch um einen Fehler bei der Abnahme handeln. Da unterschiedliche Techniken in der Probenentnahme für Kultur und PCR bestehen, kann dies somit auch einen Einfluss auf die Probenqualität haben. Möglicherweise spricht eine Kombination aus diesen Einflussgrößen für die mangelnde Sensitivität der PCR in unserem Testansatz.

Bei den gesunden Frauen sind ClgA und ClgG weitgehend negativ.

Wie bereits oben erwähnt, sind die Titer bzw. Antikörperaktivität der ClgG bei den Patientinnen mit CRVVC deutlich höher, und 70% der Patientinnen mit positiven Candidanachweis sind ClgG positiv - im Vergleich von nur 43% positiven ClgA- so dass ClgG als möglicher zusätzlicher Marker bei der Diagnose einer lokalen Candidainfektion eingesetzt werden könnte.

In der Gruppe der CRVVC- Patientinnen mit einer nachgewiesenen Candidainfektion (PCR positiv) und negativen candidaspezifischen CIgA liegt gegebenenfalls ein Immundefekt bzw. eine Abwehrschwäche vor, so dass diese Patientinnen von einer Immuntherapie /-stimulation profitieren würden.

Es sollten aber noch weitere Studien folgen, da in unserem Fall der Zeitpunkt der Probenentnahme im Bezug auf die Infektion nicht definiert und rückblickend nicht festzulegen war.

Deshalb kann bei den Frauen mit positivem Candidanachweis (Kultur +/- PCR positiv) und weder Nachweis von CIgG noch von CIgA einfach „nur“ eine zu späte Durchführung des Testes zu diesem Ergebnis geführt haben.

Es wurden in unserer Studie nur Patientinnen mit chronisch rezidivierender Candidose untersucht, Immunglobulin A, somit auch candidaspezifisches IgA, ist aber eher in der akuten Phase einer Infektion nachweisbar. Auch CIgG ist ebenfalls nur über einen gewissen Zeitraum nachweisbar. Somit ist hier von einem zu späten Zeitpunkt der Bestimmung der spezifischen Immunglobuline auszugehen.

Ferner muss man bedenken, dass der Nachweis von CIgG nur eine Aussage darüber gibt, dass eine Infektion abgelaufen ist, und *nicht* wie lange diese Infektion zurückliegt.

5. Diskussion

In unserer Studie untersuchten wir insgesamt 184 Patientinnen mit dem klinischen Bild einer chronisch rezidivierenden vulvovaginalen Candidose. Die Patientinnen klagten über „typische“ Symptome, wie Juckreiz, Brennen, Fluor und Kohabitationsbeschwerden.

Da Stämme wie *Candida glabrata* und *Candida krusei* oft eine andere klinische Symptomatik verursachen, als dies durch Infektionen mit *Candida albicans* der Fall ist, ist eine Spezifizierung des Pilzes durch die unterschiedliche Farbreaktion der jeweiligen Candidagattung mittels Chromagar sinnvoll [59,97,98,133]. Infektionen mit *Candida glabrata* verlaufen nicht selten ausgesprochen symptomarm mit nur leichtem Jucken und Brennen, wobei es selten zu einer Candidose kommt. Therapeutisch gesehen erweisen sich jedoch *Candida glabrata* und *Candida krusei* oft als äußerst hartnäckig, da diese Stämme nicht selten Fluconazolresistenzen aufweisen und somit auf eine übliche antimykotische Therapie wenig ansprechen [2,22,79,106,111,116,120,126,130].

Zum Nachweis einer Candida-Infektion wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zusätzlich zu der kulturellen Anzucht angewandt.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass bei lediglich 17% der symptomatischen Patientinnen eine Candidainfektion kulturell nachzuweisen war. Mit Hilfe der PCR gelang jedoch in 28% der Fälle der Nachweis einer Candidainfektion. Ohne die Nachweismethode der PCR, welche sich als das deutlich sensitivere Verfahren zeigte, wäre damit bei insgesamt 28 Patientinnen eine Candidainfektion unentdeckt geblieben.

Giraldo et al [55] kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die PCR als sensitiveres Nachweisverfahren im Vergleich zur kulturellen Anzucht angesehen werden kann. Diesbezüglich gibt es jedoch kontroverse Meinungen und Studien. Mardh et al [82] veröffentlichten 2003 Ergebnisse, die der PCR, im Vergleich zum kulturellen Nachweis,

keinen Vorteil in bezug auf die Sensitivität zusprachen: Demnach waren 43,8% von 73 Frauen sowohl Kultur- als auch PCR-positiv, 17,8% waren nur PCR-positiv, 20,5% nur Kultur-positiv, in der PCR jedoch negativ.

Diese Ergebnisse können durch unsere Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden, zumal bei den untersuchten Proben, bei 28 Kultur negativen die PCR positiv war, d.h. ein Candidawachstum zeigten. Dies lässt sich auf eine „inaktive“ oder nicht mehr lebensfähige Formen der Candidapilze zurückführen, die in der Kultur nicht angezüchtet werden können, aber per PCR die DNA der Hefen nachgewiesen wird.

Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits erwähnt, zeigten unsere Ergebnisse bei lediglich 17% (Kultur) bzw. 28% (PCR) der symptomatischen Patientinnen eine Candida-Besiedelung; somit war in Hinblick auf die Diagnosestellung mittels PCR bei 72%, in bezug auf den kulturellen Nachweis sogar bei 83% der Patientinnen *keine* Infektion mit Candida nachzuweisen.

An dieser Stelle muss auch auf die möglichen Differentialdiagnosen, die neben einer Candidainfektion ebenfalls in Frage kommen, hingewiesen werden. Der bei der Candidose im Vordergrund stehende Juckreiz ist vor allem auch bei Erkrankungen wie Lichen simplex oder Lichen planus, Psoriasis, Ekzemen sowie einfach trockener Haut zu finden. Sogar parasitärer Befall wie bei Skabies oder Würmern kann ähnliche Beschwerden mit Juckreiz verursachen. Ein weißlicher Ausfluss, wie er auch bei der Candidose vorkommt, könnte außerdem für eine Aminvaginose, Trichomoniasis, A-Streptokokkenkolpitis oder einer Zervizitis bei Chlamydieninfektion sprechen. Eher brennende Schmerzen wie durch Herpes genitalis, Trichomonadeninfektion, Lichen planus erosivus oder irritativer Dermatitis können ähnliche Beschwerden verursachen [37,85,100,118,128,132,151] und müssen daher in Betracht gezogen oder selbst ausgeschlossen werden.

Bei diesen Patientinnen steht die Frage nach der Ursache für die Beschwerden und die daraus resultierende Wahl einer geeigneten Therapie im Vordergrund. Noch bedeutender als das Therapieren der Beschwerden scheint das Erkennen Ihrer Ursache. So dass mit einer am Ursprung der Erkrankung ansetzenden Therapie den Patienten geholfen werden kann, und nicht nur symptombezogen therapiert wird.

„Psychosomatische Vulvovaginitis“ lautete die Überschrift eines Artikels von Dodson et al [33] im Jahr 1978. Patientinnen, bei denen die vaginalen Beschwerden nicht mit den physisch zu erhebenden Befunden übereinstimmten, wurden demnach mit der Diagnose „Psychosomatische Vulvovaginitis“ abgetan. Diese Patientinnen suchten zahlreiche Ärzte auf, sprachen auf die meisten Medikamente nicht an und zeigten – so Dodson – eine emotionale Labilität. In vielen dieser Fälle wurde im Folgenden eine psychiatrische Therapie angesetzt.

Auch heutzutage, 2007, werden nicht selten Patientinnen, bei denen aufgrund fehlenden Keimnachweises die Diagnose der CRVVC nicht gestellt wird, an psychosomatische Abteilungen überwiesen.

Ziel unserer Studie war die weitere Erforschung möglicher ätiologischer Ursachen der Beschwerden. Dies ist unbedingt notwendig, um die angegebene Symptomatik verifizieren zu können. Vor allem da ein Pilznachweis, abhängig von der Nachweismethode, nur in etwa 1/3 der Fälle bei Patientinnen mit den Beschwerden einer chronisch-rezidivierenden vulvovaginalen Candidose gelingt. Diese Aussage wird durch vorangegangene Studien ebenfalls bestätigt [9,77,97,116,144,147].

Die CRVVC ist eine ätiologisch multifaktorielle Erkrankung. Die Beschwerden und der Krankheitsverlauf der Patienten können durch zahlreiche Faktoren, vor allem auf immunologische Veränderungen und Allergien beeinflusst werden [27,42,48,92, 93,141,153].

Es ist davon auszugehen, dass die Ursache der Beschwerden und im Speziellen des rezidivierenden Auftretens dieser Beschwerden unter anderem in einem erworbenen Defekt der lokalen Immunabwehr der Scheide zu finden ist. Wir untersuchten die Patientinnen der Kontrollgruppe, als auch die symptomatischen Frauen auf candidaspezifisches ClgA und candidaspezifisches ClgG im Vaginalsekret. Sowohl in bezug auf ClgA und auch ClgG konnten wir im Vergleich zur Kontrollgruppe *signifikante Unterschiede* feststellen. Bei gesunden Frauen waren sowohl ClgA als auch ClgG negativ. Bei dem Teil der Patientengruppe, welche einen positiven Candidanachweis hatten, wiesen wir in 70% positives ClgG nach. Somit kann ClgG als zusätzlicher Marker bei der Diagnosefindung dienen.

In verschiedenen früheren Studien wurde gezeigt, dass ein Anstieg von IgM-Antikörpern meist von einem Anstieg von IgG und IgA gefolgt wird [140,148]. Toubas et al [140] gibt bei systemischen Kandidosen eine Sensitivität und Spezifität von ELISA IgM und IgA mit 85,7% bzw. 81 % an. Es wurde auch meist das gleichzeitige Vorkommen der Isotypen festgestellt. Der IgG-Anstieg wurde auch hier später bzw. langsamer gemessen.

Diese Titer wurden im Serum festgestellt, in unserer Untersuchung wurden candidaspezifische Immunglobuline im Vaginalsekret bestimmt, somit sind die Untersuchungsergebnisse nicht vergleichbar.

Sistig et al [121] titulierte 2002 die Hypothese, dass die Höhe der Speichel-IgA und IgG (und deren Untergruppen) bei oralen Mykosen verantwortlich für die Pathogenese der Kandidose sei. Er konnte eine Variation der Untergruppen in Abhängigkeit von den verschiedenen Erkrankungstypen und -stadien nachweisen, so dass die Immunglobuline sicherlich eine Rolle bei oralen Mykosen /entzündlichen Erkrankungen oder Veränderung der Erkrankung zeigen.

Schon im Jahr 1987 veröffentlichten Quindos et al [108] seine Studie, in der IgG-Antikörper bei allen Patienten mit systemischen Candidose und bei 81,2% der Patienten mit Haut- /Schleimhaut-Mykosen nachgewiesen werden konnten. Klingspor et al [71] wies vor allem erhöhte IgA- und IgM-Titer bei Kindern mit akuter Candida-Infektion nach. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang von candidaspezifischen Immunglobulinen der Klassen IgM, IgG, und IgA im Serum und Candida-Nachweis im Urin wurde von Knoke et al [72] erbracht.

In einer vergleichenden Studie 2004 deuteten Knoke und Bernhardt [73] sowohl den Nachweis candidaspezifische Antikörper der Untergruppen c-IgM und c-IgG als auch Titererhöhungen beim Anti-Candida-Hämagglutinationstest als Eignung für einen Screeningtest.

Im Jahr 2006 wurden von Kavishwar et al [69] monoklonale Antikörper des IgA-Isotypen (MAb-G5) identifiziert, welche von Lymphozyten produziert werden und unter experimentelle Bedingungen eine Aktivität gegen *Candida albicans* zeigte. Somit könnte dies ein nützlicher Ansatz in der Behandlung als auch Prophylaxe von Candidainfektionen sein.

Enzyme-linked-immunosorbent-assy (ELISA) hatten schon Kostiala et al [74], Gough et al [57], Witkin et al [153], Torres-Rodriguez et al [139], und auch Werle et al [148] zum Nachweis spezifischer Immunglobuline etabliert. Die qualitative und quantitative Analyse von Antikörper-Isotypen mittels Mikrotiterplatten und deren automatische Auswertung wurde von Aubert et al [3] hervorgehoben. Vor allem die Standardisierung der Werte ist von einer verbesserten Diagnosemöglichkeit gefolgt.

Ebenfalls mittels ELISA wurde ein neuer Test zum Nachweis von Antikörpern für *Candida albicans* rekombinierter Enolase im Serum bei invasiver Candidose von Lain et al [75] evaluiert. Hier zeigte sich eine hohe Sensitivität, Spezifität, sowie hohe Werte für den positiven und den negativen Vorhersagewert.

Wie auch bei unserer Studie weist de Carvalho et al [26] candidaspezifisches ClgA und ClgG im Vaginalsekret nach. Im Unterschied zu unseren Tests werden auch die Serum-Immunglobuline verglichen, insgesamt aber mit einer deutlich kleineren Patientengruppe: Von 30 Frauen mit Symptomen ist in 15 Fällen die Kultur auf *Candida albicans* positiv, in 4 Fällen auf andere Candidaspezies, bei 11 ist die Kultur negativ.

Die Kontrollgruppe bestand aus 12 asymptomatischen Frauen.

Bei den Patientinnen mit positiver Kultur konnten im Vaginalsekret erhöhtes ClgA und im Serum erniedrigte ClgA nachgewiesen werden. Insgesamt wurde in beiden Gruppen erhöhte ClgG, bei den symptomatischen Patientinnen speziell der Untergruppen IgG₁/IgG₄, nachgewiesen.

Somit ist im Gegensatz zu unseren Ergebnissen bei de Carvalho et al in ca. 2/3 die Kultur positiv, wobei sich die Frage stellt, ob sich dies auf die geringe Fallzahl zurückführen lässt. Auch erhielten wir bei den *Candida*-positiven Patientinnen nur in 43% einen positiven ClgA-Nachweis. Im Vergleich dazu konnte bei 70% ClgG festgestellt werden. Wir postulieren somit candidaspezifisches Immunglobulin G als einen spezifischen Marker. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Burges et al [10] bereits 1986.

Auch Belazi et al. [7] hat sich mit dem Nachweis candidaspezifischer Antikörper ClgA und ClgG im Sekret und im Serum beschäftigt.

Im Vergleich zu unseren Untersuchungen zeigt die Gruppe um Persson et al [102] in Stockholm, dass eine lokale Immunantwort mit einer erhöhten Produktion von Antikörpern festgestellt wurden. In der Studie verglich die Gruppe um Persson Albumin, IgG, IgA und Sekret- IgA im Cervixsekret bei 16 Patientinnen mit Chlamydieninfektionen versus einer Kontrollgruppe mit 13 Patientinnen mit VVC. Hier wurden signifikant mehr spezifische Chlamydien-Antikörper der Gruppe IgG, IgA und Sekret-IgA bei den Patientinnen mit Chlamydieninfektion gefunden. Auch ein erhöhter Proteingehalt des

Cervikalsekretes wurde nur in dieser Gruppe nachgewiesen, obwohl in beiden Gruppen insgesamt eine erhöhte Transudation und lokale Produktion von Antikörpern in der entzündeten Zervix festgestellt wurde. Die Beurteilung der IgG/IgA- Ratio im Serum und im Sekret ergab Hinweise für ein lokales Geschehen, vor allem eine lokale Sekretion von spezifischen IgA-Antikörpern.

Auch Mendling et al [88] hat Sekret-IgA bei Frauen mit akuter VVC versus CRVVC nachgewiesen. Hier zeigte sich das Sekret-IgA bei akuter VVC nicht erhöht, jedoch bei Patientinnen mit chronischer Vulvovaginalcandidose leicht erniedrigt.

Keine Unterschiede von Sekret-IgA bei Asthmaticern mit oraler Candidose im Vergleich zu Candida negativen Patienten hat Fukushima et al [51] festgestellt: Es zeigten sich bei Gesunden und Candida negativen Patienten gleich hohe Titer von Gesamt IgA und CIgA, bei Candida positiven Patienten wurde ein erniedrigter GesamtIgA- Titer nachgewiesen. Keine Unterschiede wurden bei candidaspezifischen IgA im Vergleich von Candida positiven zu Candida negativen Patienten festgestellt.

Hierzu ist auch die Studie von Chipperfield et al [15] interessant: Effekte lokaler Infektionen und oraler Kontrazeption auf die Immunglobulin-Werte im Cervikalschleim wurden untersucht. Das Ergebnis war eine lokal vermehrte Produktion von IgA bei Patientinnen mit Gonorrhoe, Trichomoniasis, Herpes genitalis und unspezifischer Urethritis. Bei den Patientinnen mit Candidose zeigte sich nur einen geringeren Anstieg der lokalen IgA-Werte.

Zusätzlich konnten im Mittel signifikant erhöhte Werte von IgA und IgG bei den Patientinnen mit oraler Antikonzeption (Östrogen/Gestagen-Kombinationspräparate), auch bei keiner vorhandenen Infektion, festgestellt werden. Als Vergleichsgruppe dienten gesunde, asymptomatische Frauen mit einem natürlichen Menstruationszyklus.

Es ist zu überlegen, ob die Einnahme von Hormonen einen Schutz bieten oder ob das damit verbundene Sexualleben eine erhöhte lokale Abwehr auslöst.

Mit dem Thema „Östrogen, Glykogen und vaginale Candidiasis“ hat sich Dennerstein et al [29] beschäftigt. In der Studie wurde bei postmenopausalen Frauen ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen Östrogenanwendung und Vorkommen von *Candida albicans* Infektionen gezeigt. Glykogen, welches in den östrogenstimulierten Epithelzellen vermehrt produziert wird, ist ein hervorragender Nährboden für *Candida albicans*. Zum Unterschied kam es bei den Nicht-*Candida-albicans*- Stämme zu keiner Glykogen Aufnahme. Auch Clancy et al [17] fand eine erhöhte Rate an Pilzrezidiven im Zusammenhang mit hohen Östrogenspiegeln.

Dieses Jahr hat sich auch Ventolini et al [141] mit dem Thema „post-menopausal recurrent vaginal candidiasis“ beschäftigt. Ca. ein Drittel der postmenopausalen Patientinnen haben eine symptomatische VVC, eine Anfälligkeit für Pilzinfektionen wird dem Östrogenmangel zugeschrieben. Es zeigten sich statistische Unterschiede in der Kolonisierung bei den Patientinnen mit und ohne Hysterektomie. Vor allem zeigten sich auch aggressive und zunehmend resistenterer Pilzstämme wie *Candida glabrata* und *Candida stellioidea*.

Nachdem die meisten klinischen Infektionen in der späten Lutealphase auftreten, ist die Frage nach einer Zyklus- oder hormonabhängigen Erkrankung gegeben. Hier zeigt Corrigan et al [20] den Zusammenhang zur zellulären Immunität bei RVVC, da die IFN-gamma Produktion bei Patientinnen geringer ausfällt als bei Gesunden. Auch ist eine signifikante Abnahme der durch *Candida* stimulierten IFN-gamma Produktion bei Patientinnen in der folliculären Phase im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur lutealen Phase nachgewiesen worden. Dies wird als eine partielle T-Zell- Dysregulation bei Frauen mit RVVC, welche auf den Hormonschwankungen während der folliculären Phase basieren, mit einem dadurch erhöhten Risiko einer klinischen Infektion, interpretiert.

Aber es gibt auch Untersuchungen, die basierend auf Hormonschwankungen während des Menstruationszyklus einen Anstieg von Zytokinen und Prostaglandin im Vaginalsekret nachgewiesen haben, und dies nicht auf die Candidainfektion zurückführen [43].

In einer Studie von Nikitin et al. [95] wurde die adhäsive Aktivität von *Candida albicans* gegen vaginale Epithelzellen als hormonabhängig beschrieben, wobei zwei unterschiedliche *Candida-albicans*-Adhäsine entdeckt wurden, die zum einen polyphenyloxidase-sensitiv und zum anderen asparaginase-sensitiv waren.

Im Rahmen einer anderen Studie von Weissenbacher et al. [145] wurden gesunde Frauen ohne Anzeichen rezidivierender Beschwerden in ihrer Krankengeschichte mit einem Antigen eines *Candida*-Hauttests inokuliert; die Zytokinmessungen wurden vor- und nach Antigengabe durchgeführt. Es lies sich kein Anhalt für eine Immunstimulation oder ein allergisches Geschehen im Sinne von Veränderungen der gemessenen Zytokine, Prostaglandin, IgE und Histamin finden [145]. Dies kann als eine lokale allergische Immunantwort interpretiert werden und kann für eine hohe Re-Infektionsrate oder einer Verlängerung der Beschwerdesymptomatik führen.

Eine vaginale allergische Immunantwort kann für eine chronische Candidose prädisponierend sein, so Witkin et al [153] in einer Studie. Eine protektive Rolle kann einer candidaspezifischen angepassten Immunität, die viele klinisch gesunde und asymptomatische Frauen besitzen, zukommen.

Das Auftreten von Rezidiven kann verschiedene Ursachen haben, wobei die lokale vaginale Immunität sicher eine Schlüsselrolle spielt. Durch Studien [55,81] zur Kolonisierung der Scheide mit *Candida albicans* wird dies unterstrichen:

Eine extragenitale Pilzbesiedlung stellt ein Reservoir für Rekolonisierung des Genitale dar und kann somit zu Rezidiven führen. Dass bei Patientinnen mit einer Kolonisierung des Genitaltraktes signifikant häufiger zu extragenitaler Besiedelung kommt wurde von

Mardh et al [81] gezeigt. Auch zeigte diese Studie, dass extragenital häufiger *Non-albicans*-Stämme zu finden sind.

Wie oben schon angesprochen, auch allergische Geschehen spielen eine wichtige Rolle bei Patientinnen mit Verdacht auf eine chronisch rezidivierende Vulvovaginal-Candidose. So sprechen auch Rigg et al [112] von „recurrent allergic vaginitis“ und konnten in Ihrer Studie bei Frauen mit rezidivierender Candidose eine lokale vaginale hypersensitive Reaktion auf *Candida* nachweisen. Wobei bei diesen Patientinnen zunächst nicht die allergischen Symptome im Vordergrund standen. Auch Moraes et al [92,93] zeigt den Zusammenhang einer Hyperaktivität und einer allergischen Vulvovaginitis, und früher schon zwischen RVVC und allergischer Rhinitis.

In einer Vielzahl von Artikeln und Studien wird von dem klinischen Syndrom einer allergischen Vaginitis gesprochen. Nachdem Ricer et al [110] bei Patientinnen mit rezidivierenden Beschwerden ohne nachgewiesener Infektion eine erhöhte Anzahl eosinophiler Zellen fanden, vermuteten die Autoren auch eine lokale intravaginale allergische Reaktion.

Auch Witkin et al [155] konnten zeigen, dass allergische Reaktionen auf *Candida albicans* die Ursache von rezidivierenden Beschwerden sein können. Als verursachendes Allergen kommt neben Komponenten von *Candida albicans* auch der Samen des Partners in Frage [8,155]. Ito et al [62] identifizierten die *Candida albicans* Enolase als eines der wichtigsten Allergene, ebenso wie Ishiguro et al [61]. Diese Studien bezogen sich jedoch auf systemische Candidosen, so dass es fraglich scheint, daraus Rückschlüsse auf vaginale Candidosen zu ziehen. In weitere Studien hingegen wurden Mannane – Homoglykane, die in der Zellwand von Hefezellen vorkommen- als wichtigste Antigene zur Bindung candidaspezifischer Antikörper identifiziert [66,138].

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

Des Weiteren unterscheiden sich Candida-Stämme in Hinblick auf ihre Virulenz durch die Expression verschiedener Proteasen. So ist davon auszugehen, dass rezidivierende Infektionen durch höher-virulente Subtypen verursacht werden, als einmalige Infektionen [16,94]. So konnten auch Witkin et al [155] zeigen, dass nicht nur genetische Veranlagung sondern auch Art und Quantität einer Infektion, oder auch Co-Infektionen mit anderen Erregern als Candida, Hypersensitivitätsreaktionen verursachen oder beeinflussen können und daher für die Symptomatik der Patientinnen mitverantwortlich sind.

Eine lokale Hypersensitivität bzw. vaginale allergische Reaktion muss also bei Patientinnen mit rezidivierenden Beschwerden und Verdacht auf eine CRVVC sowohl diagnostisch als auch therapeutisch in Betracht gezogen werden. Es finden sich sogar Studien [52,93], die Zusammenhänge zwischen einer allergischen Rhinitis, verursacht durch Hausstaubmilben, und einer bestehenden Vulvovaginitis, sehen. Da es sich hierbei nur um eine Fallstudie handelt, kann dies vorübergehend als Einzelfall betrachtet werden, zumindest bis diese Zusammenhänge in größer angelegten Studien belegt werden können. Dieser Fall soll nur verdeutlichen, in welche Richtungen, speziell in Hinblick auf Allergie und rezidivierende Vulvovaginitis geforscht wird und eventuell geforscht werden muss.

Diese Ergebnisse zeigen neue Möglichkeiten in der Therapie der chronisch rezidivierenden vulvovaginalen Candidose auf. So könnte zum einen die Gabe von Immunstimulanzien bei Patientinnen mit lokaler Immunsuppression Vorteile zeigen. Zum anderen besteht bei Patientinnen, mit Verdacht auf eine allergische Antwort als Ursache der Beschwerden, die Möglichkeit mit Antihistaminika zu therapieren.

Diese neuen Therapieoptionen müssen jedoch erst durch Vergleiche verschiedener Therapieansätze untersucht werden.

Zahlreiche veröffentlichte Studien belegen, dass die Zukunft der Therapie der CRVVC nicht rein antimykotischer Natur sein wird, sondern dass ein Umdenken in Richtung Kombinationstherapie geht. Hierbei werden sowohl immunmodulatorische als auch antiallergische Therapieformen eine wichtige Rolle spielen [6,8,12,16,38,39,46,49, 53,91,106,112,114,115,127,142,149,155,156,158,160].

Es finden sich zahlreiche Ansätze zur Verbesserung der Therapie von Patientinnen mit CRVVC, welche auf übliche antimykotische Therapien kaum noch ansprechen. Auch die Resistenzbildung der verschiedenen Candidastämme dürfen bei der Wahl der Therapie und der Dosis nicht außer Acht gelassen werden [14,18,22,24,28,65,78,79,90,101,103, 104,109,111,122,124,125,126,130,137,140].

Eine Studiengruppe kommt sogar zu dem Ergebnis, dass Aspirin über die Hemmung der 3(R)-Hydroxyoxylipin-Formierung bei der Behandlung von Patientinnen mit CRVVC eine Verbesserung darstellt [30,31,32].

Laut Rocha et al [113] können auch die Adenylyl -Cyclase und andere Regulatoren der cAMP Signalübertragung einen Ansatzpunkt für eine antimykotisch wirkende Therapie darstellen, da die Adenylyl – Cyclase essentiell für das Hyphenwachstum von Candida ist.

Es bleibt abzuwarten, welche der Therapieoptionen in Zukunft eine gute Ergänzungstherapie, oder sogar Alternative - zu Antimykotika darstellen wird.

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

Unsere Untersuchungen zeigten nur zum Teil einen Nachweis von candidaspezifischen Immunglobulinen. ClgA und ClgG sind spezifisch für Candida. Ein Nachweis von ClgG kann nur eine Aussage darüber treffen, dass eine Infektion abgelaufen ist, und nicht *wann* diese stattgefunden hat. Wie lange diese Infektion zurückliegt, kann nicht bestimmt werden. Ferner kann bei einer zu lange zurückliegenden Infektion eventuell kein ClgG mehr nachgewiesen werden, so dass bei Patientinnen ohne Nachweis von ClgG überdies von einer zu späten Bestimmung ausgegangen werden muss. Davon abgesehen könnte man auch an eine fehlende Immunstimulation denken. Möglicherweise sind selbst allergische Reaktionen auf kleinste Mengen von Pilzantigenen für die lokale Erkrankung verantwortlich.

Nachdem ClgA vor allem in der akuten Phase einer Infektion vorkommt, ist bei Patientinnen mit chronisch rezidivierender Vulvovaginalcandidose sogar davon auszugehen, dass der Test negativ ausfällt.

Bei den Frauen, bei denen weder Pilze noch ClgG oder ClgA nachgewiesen wurden, sollte außerdem an eine Fehldiagnose gedacht und die Differentialdiagnosen erneut in Erwägung gezogen werden.

Zusammenfassend ist es wichtig und medizinisch notwendig, die Ursache der Erkrankung und nicht die Symptome zu behandeln. Auch gerade weil aufgrund gleicher oder ähnlicher Symptome davon ausgegangen wird, dass es sich wieder um eine Pilzinfektion handelt, sollte der mikrobiologische Nachweis nicht nur für die Praxis sondern auch für die Forschung gefordert werden.

6. Zusammenfassung

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

Wir untersuchten 184 Patientinnen, die klinisch Symptome wie Erythem, Pruritus und weißlichen Fluor aufwiesen und bei mindestens vier Episoden pro Jahr die Diagnose einer CRVVC gestellt wurde. Als Kontrollgruppe dienten 46 asymptomatische Patientinnen ohne anamnestische Pilzinfektion.

Zum Nachweis von Candida und der Spezifizierung des Pilzes aus gewonnenem Vaginalsekret verwendeten wir sowohl die Methode der kulturellen Anzucht als die der PCR. Des Weiteren bestimmten wir mittels Elisa das candidaspezifische ClgA und candidaspezifisches ClgG aus dem Vaginalsekret.

In der Gruppe der symptomatischen Patientinnen konnte bei nur 28% eine Pilzinfektion mittels PCR nachgewiesen werden, kulturell sogar nur bei 17% der Frauen, so dass bei 72% keine Pilzinfektion zum Zeitpunkt der Probenentnahme nachzuweisen war. Innerhalb der asymptomatischen und klinisch befundfreien Kontrollgruppe wurde keine Patientinnen mit Hilfe der PCR positiv auf Candida getestet.

Die Auswertung der Messergebnisse von candidaspezifischem ClgA und ClgG zeigte im Vergleich der symptomatischen Patientinnen mit der Kontrollgruppe deutliche Unterschiede.

In der Kontrollgruppe, also den gesunden Frauen, war ClgG und ClgA nahezu negativ (7%ClgG positiv, 2%ClgA positiv). Bei den Patientinnen mit positivem Candidanachweis war in 70% ClgG positiv, und nur in 43% ClgA positiv ($p < 0.001$). Bei den Candida-negativen Patientinnen wurde bei 85% ein negatives ClgA nachgewiesen ($p < 0.001$).

Bei den PCR Candida-negativen Patientinnen sind in 85,1% ClgG und ClgA negativ.

Vergleicht man die Ergebnisse der 60 Candida positiven Patientinnen (PCR+/- Kultur positiv) mit den Ergebnissen des ELISA ClgG und ClgA, sieht man in 38,3% der Fälle ClgG und ClgA positiv, aber auch in 31,7% nur ClgG positiv. Ist der Vergleich mit nur per PCR als Candida positiv nachgewiesen und den ELISA Ergebnissen für ClgG und ClgA positiv zumindest in 44,0% der Fälle übereinstimmend, wobei aber auch in 38,0% allein nur ClgG positiv ist.

Bei den 134 PCR Candida negativen Patientinnen sind 114 (85,1 %) auch ClgG und ClgA negativ, so dass ein negativer ELISA eher gegen eine Infektion spricht, und somit ebenfalls als ein diagnostisches Zusatzkriterium dienen könnte.

Es sollten aber noch weitere Studien folgen, da in unserem Fall der Zeitpunkt der Probenentnahme im Bezug auf die Infektion nicht definiert und rückblickend nicht festzulegen war.

Deshalb kann bei den Frauen mit positivem Candidanachweis (Kultur +/- PCR positiv) und weder Nachweis von ClgG noch von ClgA einfach „nur“ eine zu späte Durchführung des Testes zu diesem Ergebnis geführt haben.

Ein Nachweis von ClgG kann nur eine Aussage darüber treffen, dass eine Infektion abgelaufen ist, und nicht *wann* diese stattgefunden hat. Wie lange diese Infektion zurückliegt, kann nicht bestimmt werden. Ferner kann bei einer zu lange zurückliegenden Infektion eventuell kein ClgG mehr nachgewiesen werden, so dass bei Patientinnen ohne Nachweis von ClgG überdies von einer zu späten Bestimmung ausgegangen werden muss. Davon abgesehen könnte man auch an eine fehlende Immunstimulation denken.

Die Bestimmung von ClgG könnte somit, speziell bei symptomatischen Patientinnen ohne Pilznachweis, der Verifizierung der Beschwerden als auch der Anwendung neuer therapeutischer Möglichkeiten, wie Gabe von Immunstimulanzien, dienen.

Das diagnostische und therapeutische Ziel sollte eine genaue Keim-Identifikation und Feststellung des Immunstatus sein. Somit ist der Arzt in der Lage, die Unterschiede in der Empfänglichkeit eines jeden Patienten für eine Infektion einzuschätzen, und kann - abseits der üblichen Basistherapie - ein individuelles Therapieschema erstellen, speziell auf jede einzelne Patientin abgestimmt.

7. Literaturverzeichnis

1. **Altamura M, Casale D, Pepe M, Tafaro A:** Immune responses to fungal infections and therapeutic implications. *Curr Drug Immune Endocr Metabol Disord.* 1: 189-97, 2001
2. **Arenzi D, Del Poeta M, Simonetti O, Offidani Am, Lamura L, Balducci M, Cester N, Giacometti A, Scalise G.:** Prevalence and antifungal susceptibility of vaginal yeasts in outpatients attending a gynecological center in Ancona, Italy. *Eur J Epidemiol.;*13:447-50, 1997
3. **Aubert D, Foudrinier F, Kaltenbach ML, Gyyot-Walser D, Marx-Chemla C, Geers R, Lapan H, Pinon JM. :** Automated reading and processing of quantitative IgG, IgM, IgA and IgE isotypic agglutination results in microplates. Development and application in parasitology-mycology. *J Immunol Methods* 186: 323-8, 1995
4. **Babula O, Lazdane G, Kronica J, Ledger WJ, Witkin SS:** Relations between recurrent vulvovaginal candidiasis, vaginal concentrations of mannose-binding lectin, and mannose-binding lectin gene polymorphism in Latvian women. *Clin Infect Dis* 2003 Sep 1;37:733-7, 2003
5. **Barousse MM, Steele C, Dunlap K, Espinosa T, Boikov D, Dobel JD, Fidel PL Jr.:** Growth inhibition of *Candida albicans* by human vaginal epithelial cells. *J Infect Dis* 184 :1489-93, 2001

6. **Battaglia F, Mariani L, Anglana F, Milite V, Quattrini M, Plotti F, Tomao F, Plotti G:** Vulvovaginal candidiasis: a therapeutic approach. *Minerva Ginecol*; 57:131-9, 2005
7. **Belazi M, Fleva A, Drakoulakos D, Panayiotidou D.:** Salivary IgA and serum IgA and IgG antibodies to *Candida albicans* in HIV-infected subjects. *Int J STD AIDS* 13: 373-7, 2002
8. **Bernstein JA, Herd ZA, Bernstein DI, Korbee L, Bernstein IL:** Evaluation and treatment of localized vaginal immunoglobulin E-mediated hypersensitivity to human seminal plasma. *Obstet Gynecol* 82: 667-73, 1993
9. **Bradshaw CS, Morton An, Garland SM, Morris MB, Moss LM, Fairley CK:** Higher-risk behavioral practices associated with bacterial vaginosis compared with vaginal candidiasis. *Obstet Gynecol*; 106: 105-14, 2005
10. **Burges G, Holley HP Jr, Virella G:** Immunoglobulin class of anti-*Candida* antibodies in patients with vaginal candidiasis. *Diagn Immunol*; 4:43-6, 1986
11. **Calderone:** *Candida* and Candidiasis. American Society of Microbiology (ASM), 2001
12. **Cassone A, De Bernadis F, Torososantucci A:** An outline of the role of anti-*Candida* antibodies within the context of passive immunization and protection from candidiasis. *Curr Mol Med*; 5:377-82, 2005
13. **Cenci E, Mencacci A, Del Sero G, Bistoni F, Romani L:** Induction of protective Th 1 responses to *Candida albicans* by antifungal therapy alone or in combination with an interleukin-4 antagonist. *J Infect Dis* 176: 217-26, 1997
14. **Cha R, Sobel JD:** Fluconazol for the treatment of candidiasis: 15 years experience. *Expert Rev Anti Infect Ther*; 2: 357-66, 2004

15. **Chipperfield EJ, Evans BA:** Effect of local infections and oral cotraception on immunoglobulin level in cervical mucus. *Infect Immun* 11: 215-11, 1975
16. **Chong PP, Lee YL, Tan BC, Ng KP:** Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. *J Med Microbiol* 52: 657-66, 2003
17. **Clancy R, Corrigan E, Dunkley M, Eyers F, Beagley K:** Recurrent Vulvovaginal Candidiasis-Allergy or Immune Deficiency? *Int Arch Allergy Immunol* 118: 349-350, 1999
18. **Cohen J:** Review of the latest treatments of vulvovaginal mycoses : role of fenticonazole nitrate in their treatment. *Contracept Fertil Sex* 25:396-403, 1997
19. **Consolaro ME, Albertoni TA, Svidzinski AE, Peralta RM, Svidzinski TI:** Vulvovaginal candidiasis is assotiates with the production of germ tubes by *Candida albicans*. *Mycopathologia*; 159:501-7, 2005
20. **Corrigan EM, Clancy RL, Dunkley ML, Eyers FM, Beagley KW:** Cellular immunity in reccurent vulvovaginal candidiasis. *Clin Exp Immunol* 111: 574-8, 1998
21. **Coste A, Dubourdeau M, Linas MD, Cassaing S, Lepert JC, Balard P, Chalmeton S, Bernad J, Orfila C, Seguela JP, Pipy B:** PPARgamma promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13. *Immunity* 19: 329-39, 2003
22. **Czaika V, Tietz HJ, SchmalreckA, Sterry W, Schultze W:** Resistenzbestimmungen bei Erregern chronisch rezidivierender

- Vulvovaginalcandidosen als Voraussetzung für eine effektive Therapie. *Mycoses*; 43: 45-50, 2000
23. **Dan M, Kaneti N, Levin D, Poch F, Samara Z:** Vaginitis in a gynecologic practice in Israel: causes and risk factors. *Isr Med Assoc J* 5: 629-32, 2003
24. **Dan M:** Severe vulvovaginitis associated with intravaginal nystatin therapy. *Am J Obstet Gynecol.* 185: 254-5, 2001
25. **De Bernardis F, Santoni G, Boccanera M, Spreghini E, Adriani D, Morelli L, Cassone A:** Local anticandidal immune responses in a rat model of vaginal infection by and protection against *Candida albicans*. *Infect Immun* 68: 3297-304, 2000
26. **De Carvalho RJ, Cunha CM, Silva DA, Sopelete MC, Urzedo JE, Moreira TA, Moraes Pde S, Taketomi EA:** IgA, IgE and IgG subclasses to *Candida albicans* in serum and vaginal fluid from patients with vulvovaginal candidiasis. *Revista da Associacao Medica Brasileira*; 49:434-8, 2003
27. **De Leon EM, Jacober SJ, Sobel JD, Foxman B:** Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. *BMC Infect Dis* 2: 1, 2002
28. **del Palacio A, Sanz F, Sanchez-Alor G, Garau M, Calvo MT, Boncompte E, Alguero M, Pontes C, Gomez de la Camera A:** Double-blind randomized dose-finding study in acute vulvovaginal candidosis. Comparison of flutrimazole site-release cream (1, 2 and 4%) with placebo site-release vaginal cream. *Mycoses* 43: 355-65, 2000
29. **Dennerstein GJ, Ellis DH:** Oestrogen, glycogen and vaginal candidiasis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 41: 326-8, 2001

30. **Deva R, Ciccoli R, Kock L, Nigam S:** Onvolvement of aspitin-sensitive oxylipins in vulvovaginal candidiasis. *FEMS Microbiol Lett* 198: 37-43, 2001
31. **Deva R, Ciccoli R, Schewe T, mKock JL, Nigam S:** Arachidonic acid stimulates cell growth and forms a novel oxygenated metabolite in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 19; 1486:299-311, 2000
32. **Deva R, Shankaranarayanan P, Ciccoli R, Nigam S:** *Candida albicans* induces selectively transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in HeLa cells: pivotal roles of Toll-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase, and NF-kappa B. *J Immunol* 15; 171:3047-55, 2003
33. **Dodson MG, Friedrich EG Jr.:** Psychosomatic vulvovaginitis. *Obstet Gynecol* 51: 23-25, 1978
34. **Donders GG, Prenen H, Verbeke G, Reybrouck R:** Impaired tolerance for glucose in women with recurrent vaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol*; 187:989-93, 2002
35. **Donders GG:** Lower genital tract infections in diabetic women: *Curr Infect Dis Rep* 4: 536-539, 2002
36. **Duerr A, Heilig CM, Meikle SF, Cu-Uvin S, Klein RS, Rompalo A, Sobel JD:** Incident and persistent vulvovaginal candidiasis among human immunodeficiency virus-infected women: Risk factors and severity. *Obstet Gynecol*; 101:548-56, 2003
37. **Eckert LO, Hawes SE, Stevens CE, Koutsky LA, Eschenbach DA, Holmes KK:** Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm. *Obstet Gynecol* 92: 757-65, 1998

38. **Elahi S, Pang G, Clancy R, Ashman RB:** Cellular and cytokine correlates of mucosal protection in murine model of oral candidiasis. *Infect Immun* 68: 5771-7, 2000
39. **Faith A, Richards DF, Verhoef A, Lamb JR, Lee TH, Hawrylowicz CM:** Impaired secretion of interleukin-4 and interleukin-13 by allergen-specific T cells correlates with defective nuclear expression of NF-AT2 and jun B: relevance to immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 44: 1209-15, 2003
40. **Ferrer J:** Vaginal candidosis : epidemiological and etiological factors. *Int J Gynaecol Obstet.* 71 Suppl 1: S21-7, 2000
41. **Ferris DG, Nyirjesy P, Sobel JD, Soper D, Pavletic A, Litaker MS:** Over-the-counter antifungal drug misuse associated with patient-diagnosed vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol*; 99:419-25, 2002
42. **Fidel PL Jr, Barousse M, Espinosa T, Ficarra M, Sturtevant J, Martin Dh, Quayle AJ, Dunlap K:** An intravaginal live *Candida* challenge in humans leads to new hypotheses for the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *Infect Immun*; 75:2939-46, 2004
43. **Fidel PL Jr, Barousse M, Lounev V, Espinosa T, Chesson RR, Dunlap K:** Local immune responsiveness following intravaginal challenge with *Candida* antigen in adult women at different stages of the menstrual cycle. *Med Mycol* 41: 97-109, 2003
44. **Fidel PL Jr, Lynch ME, Redondo-Lopez V, Sobel JD, Robinson R:** Systemic cell-mediated immune reactivity in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis.* 168: 1458-65, 1993

45. **Fidel PL Jr, Lynch ME, Sobel JD:** Candida-specific cell-mediated immunity is demonstrable in mice with experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* 61:1990-5, 1993
46. **Fidel PL Jr:** Immunity to Candida. *Oral Dis* 8 Suppl 2:69-75, 2002
47. **Fidel PL Jr:** The protective immune response against vaginal candidiasis: lessons learned from clinical studies and animal models. *Int Rev Immunol* 21:515-48, 2002
48. **Fidel PL Jr:** Immunity in vaginal candidiasis. *Curr Opin Infect Dis*, 18: 107-11, 2005
49. **Fidel PL Jr:** Vaginal candidiasis: review and role of local mucosal immunity. *AIDS Patient Care STDS*; 12:359-66, 1998
50. **Friese K, Schäfer A, Hof H:** Infektionskrankheiten in Gynäkologie und Geburtshilfe. Springer Verlag: 519-532, 2002
51. **Fukushima C, Matsuse H, Saeki S, Kawano T, Machisa I, Kondo Y, Kohno S:** Salivary IgA and oral candidiasis in asthmatic patients treated with inhaled corticosteroid. *J Asthma* 42:601-04, 2005
52. **Garcia-Aviles C, Carvalho N, Fernandez-Benitez M:** Allergic vulvovaginitis in infancy: study of a case. *Allergol Immunopathol (Madr)* 29:137-40, 2001
53. **Genc MR, Onderdonk A, Witkin SS:** Innate Immune System Gene Polymorphisms in Women with Vulvovaginal Infections. *Curr Infect Dis Rep*; 6: 462-68, 2004

54. **Ghaleb M, Hamad M, Abu-Elteen KH:** Vaginal T lymphocyte population kinetics during experimental vaginal candidosis: evidence for a possible role of CD8+ T cells in protection against vaginal candidosis. *Clin Exp Immunol* 131:26-33, 2003
55. **Giraldo P, von Nowaskonski A, Gomes FA, Linhares I, Neves NA, Witkin SS:** Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol* 95:413-6, 2000
56. **Giraldo PC, Ribeirp-Filho AD, Simeos JA, Neuer A, Feitosa SB, Witkin SS:** Circulating heat shock proteins in women with a history of recurrent vulvovaginitis. *Infect Dis Obstet Gynocl*; 7: 128-32, 1999
57. **Gough PM, Warnock DW, Richardson MD, Mansell NJ, King JM:** IgA and IgG antibodies to *Candida albicans* in the genital tract secretions of women with or without vaginal candidosis. *Sabouraudia* 22:265-77, 1984
58. **Heidenreich S, Otte B, Lang D, Schmidt M:** Infection by *Candida albicans* inhibits apoptosis of human monocytes and monocytic U937 cells. *J Leukoc Biol* 60:737-43, 1996
59. **Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP:** Direct isolation of *Candida* spp. From blood cultures on chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol* 41:2629-32, 2003
60. **Ishiguro A, Homma M, Sukai T, Higashide K, Torii S, Tanaka K:** Immunoblotting analysis of sera from patients with candidal vaginitis and healthy females. *Journal of medical and veterinary mycology*; 30:281-92, 1992
61. **Ishiguro A, Homma M, Torii S, Tanaka K:** Identification of *Candida albicans* antigens reactive with immunoglobulin E antibody of human sera. *Infect Immun* 69:1550-7, 1992

62. **Ito K, Ishiguro A, Kanbe T, Tanaka K, Torii S:** Characterization of IgE-binding epitopes on *Candida albicans* enolase. *Clin Exp Allergy* 25: 529-35, 1995
63. **Izuhara K, Arima K, Yasunaga S:** IL-4 and IL-13: their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1:263-9, 2002
64. **Johnson AG:** Immunologie auf 70 Seiten. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001
65. **Kalo-Klein A, Witkin SS:** ProstaglandinE2 enhances and gamma interferon inhibits germ tube formation in *Candida albicans*. *Infect Immun* 58:260-2, 1990
66. **Kanbe T, Morishita M, Ito K, Tomita K, Utsunomiya K, Ishiguro A:** Evidence for the presence of immunoglobulin E antibodies specific to the cell wall phosphomannoproteins of *Candida albicans* in patients with allergies. *Clin Diagn Lab Immunol* 3:645-50, 1996
67. **Katou F, Montegi K, Tagami H, Shirai N, Echigo S, Nagura H:** Unique inflammatory features noted in intraorally transferred skin flaps: correlation with *Candida albicans* infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 87:676-84, 1999
68. **Katsifa H, Tsaparidou S, Diza E, Gil-Lamaignere C, Walsh TJ, Roilides E:** Effects of interleukin-13 on antifungal activity of human monocytes against *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 31:211-7, 2001
69. **Kavishwar A, Shukla PK:** Candidacidal activity of monoclonal antibody that binds with glycosyl moieties of proteins of *Candida albicans*. *Med Mycol* 44:159-67, 2006

70. **Kimura M, Tsuruta S, Yoshida T:** IFN-gamma plays a dominant role in upregulation of Candida-specific IgE synthesis in patients with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 122:195-9, 2000
71. **Klingspor L, Eberhard TH, Stintzing G, Tollemar J:** Antibody response to Candida and its use in clinical practice. *Mycoses* 37:199-204, 1994
72. **Knoke M, Bernhardt H, Schulz K, Schroder G, Zimmermann K:** Fungaria and Candida-specific immunoglobulins in patients with systemic candidosis. *Mycoses* 43:145-9, 2000
73. **Knoke M, Bernhardt H:** Candida- spezifische Antikörper bei Intensivtherapiepatienten und Nichtintensivtherapiepatienten. *Mycoses*; 47:19-22, 2004
74. **Kostiala AA, Kostiala I:** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgM, IgG and IgA class antibodies against *Candida albicans* antigens :development and comparison with other methods. *Sabouraudia* 19:123-4, 1981
75. **Lain A, Moragues MD, Garcia Ruiz JC, Mendoza J, Camacho A, Del Palacio A, Ponton J:** Evaluation of the Candida Enolasa ELISA IgG® test for the serodiagnosis of invasive candidiasis. *Clin Vaccine Immunol* 1:17, 2007
76. **Lilic D, Calvert JE, Cant AJ, Abinum M, Spickett GP:** Chronic mucocutaneous candidiasis. Class and subclass of specific antibody response in vivo and in vitro. *Clin Exp Immunol*;105:213-9, 1996
77. **Linhares LM, Witkin SS, Miranda SD, Fonseca AM, Pinotti JA, Ledger WJ:** Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for *Candida* species by culture. *Infect Dis Obstet Gynecol* 9:221-5, 2001

78. **Mac Neill C, Carey JC:** Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Cur Womens Health Rep.* 1:31-5, 2001
79. **Mac Neill C, Weisz J, Carey JC:** Clinical resistance of recurrent *Candida albicans* vulvovaginitis to fluconazole in the presence and absence of in vitro resistance. *J Reprod Med.* 48:63-8, 2003
80. **Maccato ML, Kaufman RH:** Fungal vulvovaginitis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 3:849-52, 1991
81. **Mardh PA, Novikova N, Stukalova E:** Colonisation of extragenital sites by *Candida* in women with recurrent vulvovaginal candidosis. *BJOG* 110:934-937, 2003
82. **Mardh PA, Novikova N, Witkin SS, Korneeva I, Rodrigues AR:** Detection of *Candida* by polymerase chain reaction vs microscopy and culture in women diagnosed as recurrent vulvovaginal cases. *Int J STD AIDS* 14:753-6, 2003
83. **Mardh PA, Rodrigues AG, Genc M, Novikova N, Martinez-de-Oliviera J, Guaschino S:** Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis—a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. *Int J STD AIDS* 13:522-39, 2002
84. **Mardh PA, Wagstrom J, Landgren M, Holmen J :** Usage of antifungal drugs for therapy of genital *Candida* infections, purchased as over-the-counter products or by prescription: Factors that may have influenced the marked changes in sales volumes during the 1990s. *Infect Dis Obstet Gynecol* ; 12:99-108, 2004
85. **Marrazzo J:** Vulvovaginal candidiasis. *BMJ* 326:993-994, 2003
86. **Mathur S, Koistinen GV, Horger EO 3rd, Mahvi TA, Fudenberg HH:** Humoral immunity in vaginal candidiasis. *Infect Immun* 15:287-94, 1997

87. **Mathur S, Koistinen J, Kyong CU, Horger EO 3rd, Virella G, Fudenberg HH:** Antibodies to *Candida albicans* in IgA-deficient humans. *J Infect Dis* 136:436-8, 1977
88. **Mendling W, Koldovsky U :** Immunological investigations in vaginal mycoses. *Mycoses* 39:177-83, 1996
89. **Metzner G, Weissenbacher ER:** Candidainfektionen des weiblichen Genitaltraktes. Medifact publishing, München, 1. Auflage 1999
90. **Moosa MY, Sobel JD, Elhalis H, Du W, Akins RA :** Fungicidal activity of fluconazole against *Candida albicans* in a synthetic vagina-simulative medium. *Antimicrob Agents Chemother*;48:161-7, 2004
91. **Moraes PS, de Lima Goiaba S, Taketomi EA:** *Candida albicans* allergen immunotherapy in recurrent vaginal candidiasis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 10:305-9, 2000
92. **Moraes PS, Taketomi EA:** Allergic vulvovaginitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 85:253-65; quiz265-7, 2000
93. **Moraes PS:** Recurrent vaginal candidiasis and allergic rhinitis: a common association. *Ann Allergy Asthma Immunol* 81:165-9, 1998
94. **Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D, Agabian N, Challacombe SJ:** Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis* 188:469-79, 2003

95. **Nikitin MV, Artemova LV, Kravtsov EG, Dalin MV, Radzinskii VE, Doyle RJ:** Study of *Candida albicans* Strains Isolated from Women with Various Forms of Vaginal Candidiasis. *Bull Exp Biol Med* 135:276-80, 2003
96. **Novikova N, Mardh PA:** Characterization of women with history of recurrent vulvovaginal candidosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 81:1047-52, 2002
97. **Novikova N, Rodrigues A, Mardh PA:** Can the diagnosis of recurrent vulvovaginal candidosis be improved by use of vaginal lavage and cultures on chromogenic agar? *Infect Dis Obstet Gynecol* 10:89-92, 2002
98. **Novikova N, Yassievich E, Mardh PA:** Microscopy of stained smears of vaginal secretion in the diagnosis of recurrent vulvovaginal candidosis. *Int J STD AIDS*; 13:318-22, 2002
99. **Nyirjesy P, Sobel JD:** Vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol Clin North Am*; 30:671-84, 2003
100. **Nyirjesy P:** Lichen sclerosus and other conditions mimicking vulvovaginal candidiasis. *Curr Infect Dis Rep* 4:520-524, 2002
101. **Patel DA, Gillespie B, Sobel JD, Leaman D, Nyirjesy P, Weitz MV, Foxman B:** Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*; 190:644-53, 2004
102. **Perrson E, Eneroth P, Grillner L.:** Immunoglobulin contents in cervical secretions of women with chlamydial cervicitis. *Gynecol Obstet Invest* 30:109-13, 1990

103. **Petersen EE, Weissenbacher ER, Hengst P, Spitzbart H, Weise W, Wolff F, Dreher E, Ernst U, Della Casa V, Pohlig G, Graf F, Kaiser RR:** Local treatment of vaginal infections of varying etiology with dequalinium chloride or povidone iodine. A randomised, double-blind, active-controlled, multicentric clinical study. *Arzneimittelforschung* 52:706-15, 2002
104. **Phillips AJ:** Treatment of non-albicans *Candida* vaginitis with amphotericin B vaginal suppositories. *Am J Obstet Gynecol*; 192:2009-12, 2005
105. **Piccinni MP, Vultaggio A, Scaletti C, Livi C, Gomez MJ, Giudizi MG, Biagiotti R, Cassone A, Romagnani S, Maggi E:** Type 1 T helper cells specific for *Candida albicans* antigens in peripheral blood and vaginal mucosa of women with recurrent vaginal candidiasis. *J Infect Dis* 186:87-93, 2002
106. **Pirotta MV, Gunn JM, Chondros P:** "Not thrush again!" Women`s experience of post-antibiotic vulvovaginitis. *Med J Aust* 179:43-6, 2003
107. **Pontón J, Bikandi J, Moragues MD, Arilla MC, Elósegui R, Quindós G, Fisicaro P, Conti S, Polonelli L:** Reactivity of *Candida albicans* germ tubes with salivary secretory IgA. *Journal of dental research*; 75:1979-85, 1996
108. **Quindos G, Ponton J, Cisterna R:** Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tube in the diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol* 6:142-6, 1987
109. **Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, Edwards JE:** Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*; 30:662-78, 2000
110. **Ricer RE, Guthrie RM:** Allergic vaginitis, a possibly new syndrome. A case report. *J Reprod Med* 33:781-3, 1988

111. **Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA** : Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *J Clin Microbiol*; 43:2155-62, 2005
112. **Rigg D, Miller MM, Metzger WJ**: Recurrent vulvovaginitis: treatment with *Candida albicans* allergen immunotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 162:332-6, 1990
113. **Rocha CR, Schroppel K, Harcus D, Marcil A, Dignard D, Taylor BN, Thomas DY, Whiteway M, Leberer E**: Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 12:3631-43, 2001
114. **Rodier MH, Imbert C, Kauffmann-Lacroix C, Daniault G, Jacquemin JL** : Immunglobulin G could prevent adherence of *Candida albicans* to polystyrene and extracellular matrix components. *J Med Microbiol* 52:373-7, 2003
115. **Rosedale N, Browne K**: Hyposensitisation in the management of recurring vaginal candidiasis. *Ann Allergy* 43:250-3, 1979
116. **Saporiti AM, Gomez D, Levalle S, Galeano M, Davel G, Vivot W, Rodero L**: Vaginal candidiasis: etiology and sensitivity profile to antifungal agents in clinical use. *Rev Argent Microbiol* 33:217-22, 2001
117. **Savolainen J, Lintu P, Kosonen J, Kortekangas-Savolainen O, Viander M, Pene J, Kalimo K, Terho EO, Bousquet J**: *Pityrosporum* and *Candida* specific and non-specific humoral, cellular and cytokine responses in atopic dermatitis patients. *Clin Exp Allergy* 31:125-34, 2001

118. **Sheary B, Daylan L:** Recurrent vulvovaginal candidiasis. Aust Fam Physician; 34:147-50, 2005
119. **Silbernagel S, Lang F:** Taschenatlas der Pathophysiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York:42-47,1998
120. **Singh S, Sobel JD, Bhargava P, Boikov D, Vazquez JA:** Vaginitis due to *Candida krusei*: epidemiology, clinical aspects and therapy. Clin Infect Dis 35:1066-70, 2002
121. **Sistig S, Vucicevic-Boras V, Lukac J, Kusic Z:** Salivary IgA and IgG subclasses in oral mucosal diseases. Oral Dis 8:282-62,2002
122. **Sobel JD, Chaim W, Nagappan V, Leaman D:** Treatment of vaginitis caused by *Candida glabrata*: use of topical boric acid and flucytosine. Am J Obstet Gynecol; 189:1297-300, 2003
123. **Sobel JD, Chaim W:** Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis. J Clin Microbiol; 34:2497-9, 1996
124. **Sobel JD, Kapernick PS, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, Nyirjesy P, Heine MW, Willems J, Panzer H, Wittes H:** Treatment of complicated *Candida* vaginitis: comparison of single and sequential doses of fluconazole. Am J Obstet Gynecol; 185:363-9
125. **Sobel JD, Wiesenfeld HC, Martens M, Danna P, Hooton TM, Rompalo A, Sperling M, Livengood C 3rd, Horowitz B, Von Thron J, Edwards L, Panzer H, Chu TC:** Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis. N Engl J Med, 351:876-83, 2004
126. **Sobel JD:** Antimicrobial Resistance in Vulvovaginitis. Curr Infect Dis Rep. 3:546-549, 2001

127. **Sobel JD:** Limitations of antifungal agents in the treatment of Candida vaginitis: future challenges. Drug Resist Update; 2:148-52, 1999
128. **Sobel JD:** Management of patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. Drugs 63:1059-66, 2003
129. **Sobel JD:** Pathogenesis of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. Curr Infect Dis Rep; 4:514-19, 2002
130. **Sobel JD:** Treatment of vaginal Candida infections. Expert Opin Pharmacother 3:1059-65, 2002
131. **Sobel JD:** Vulvovaginal candidiasis: a comparison of HIV-positive and – negative women. Int J STD AIDS 13:358-62, 2002
132. **Sobel JD:** Vulvovaginitis in healthy women. Compr Ther. 25:335-46, 1999
133. **Sojakova M, Liptajova D, Simoncicova M, Borovsky M, Subil J:** Vulvovaginal candidiasis and sensitivity of pathogens to antimycotics. Gynekologicko-porodnicka klinika LFUK a FN, Zochova 7, 81103 Bratislava.
134. **Spence D:** Candidiasis (vulvovaginal). Clin Evid; Dec:2493-511, 2004
135. **Szkaradkiewicz A, Szponar E, Krzeminska-Jakowiak E, Tulecka T:** Serum interferon-gamma (IFN-gamma) in chronic oral candidosis. Med Mycol 36:269-73, 1998
136. **Taylor BN, Saavedra M, Fidel PL Jr.:** Local Th1/Th2 cytokine production during experimental vaginal candidiasis: potential importance of transforming growth factor-beta. Med Mycol 38:419-31, 2000

137. **Thomason JL, Gelbart SM, Kellett AV, Scaglione NJ, Gotwalt KT, Broekhuizen FF:** Terconazole for the treatment of vulvovaginal candidiasis. *J Repro Med.* 35:992-4, 1990
138. **Tomsikova A, Sach J, Zavazal V, Masler L, Novackova D:** Immunodiagnosis of candida-infections. I. Sensitivity of the antigens. *Mycopathologia* 71:103-11, 1980
139. **Torres-Rodriguez JM, Madrenys-Brunet N, Nolla-Salas J, Carceller A, Tur C:** Candiduria in non-neutropenic critically-ill surgical patients. Detection of IgA, IgG and IgM antibodies to *Candida albicans* by germ tube immunofluorescence. *Mycoses* 40:439-44, 1997
140. **Toubas D, Aubert D, Marnef F, Villena I, Pignon B, Leon A, Foudrinier F:** Characterization of specific IgG, IgM, IgA and IgE isotypes in profound candidiasis. *Ann Biol Clin (Paris)* 56:329-36, 1998
141. **Ventolini G, Baggish MS:** Post-menopausal recurrent vaginal candidiasis: effect of hysterectomy on response to treatment, type of colonization and recurrence rates post-treatment. *Maturitas*; 51:294-8, 2005
142. **Vojdani A, Rahimian P, Kalhor H, Mordechai E:** Immunological cross reactivity between *Candida albicans* and human tissue. *J Clin Lab Immunol* 48:1-15, 1996
143. **Watson MC, Bond CM:** Evidence-based guidelines for non-prescription treatment of vulvovaginal candidiasis. *Pharmacy World and Science.* 25:129-134, 2003

144. **Weissenbacher ER, Weissenbacher S, Witkin S, Tolbert V, Ledger WJ:** Diagnostik und Therapie der chronisch rezidivierenden Vulvo-Vaginal-Candidose (CRVVC). Infektionen im neuen Millenium, 1. Auflage Medifact Publishing, München, 25-29, 2002
145. **Weissenbacher ER, Weissenbacher T, Spitzbart H:** The significance of interleukins and of Candida-IgE in Chronic recurrent vulvovaginal candidosis. Mycoses; 47 Suppl1:37-40, 2004
146. **Weissenbacher ER:** Fluorpraktikum, 4. Neuauflage Medifact Publishing, München, 77-97, 2001
147. **Weissenbacher S, Witkin SS, Tolbert V, Giraldo P, Linhares I, Haas A, Weissenbacher ER, Ledger WJ:** Value of Candida polymerase chain reaction and vaginal cytokine analysis for the differential diagnosis of women with recurrent vulvovaginitis. Infect Dis Obstet Gynecol. 8:244-7, 2000
148. **Werle E, Kappe R, Fiehn W, Sonntag HG:** Detection of anti-Candida antibodies of the classes IgM, IgG and IgA using enzyme immunoassay in sequential serum samples of hospitalized patients. Mycoses 37 Suppl 1:71-8, 1994
149. **Wilson C:** Recurrent vulvovaginitis candidiasis ; an overview of traditional and alternative therapies. Adv Nurse Pract; 13:24-9, 2005
150. **Wilton L, Kollarova M, Heeley E, Shakir S:** Relative risk of vaginal candidiasis after use of antibiotics compared with antidepressants in women: postmarketing surveillance data in England. Drug Saf 26:589-97, 2003
151. **Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ:** Differential characterization of women with vulvar vestibulitis syndrome. AM J Obstet Gynecol. 187:589-94, 2002

152. **Witkin SS, Hirsch J, Ledger WJ:** A macrophage defect in women with recurrent *Candida* vaginitis and its reversal in vitro by prostaglandin inhibitors. *Am J Obstet Gynecol* 155:790-5, 1986
153. **Witkin SS, Jeremias J, Ledger WJ:** A localized vaginal allergic response in women with recurrent vaginitis. *J Allergy Clin Immunol* 81:412-6, 1988
154. **Witkin SS, Kalo-Klein A, Galland L, Teich M, Ledger WJ:** Effect of *Candida albicans* plus histamine on prostaglandin E2 production by peripheral blood mononuclear cells from healthy women and women with recurrent candidal vaginitis. *J Infect Dis* 164:396-9, 1991
155. **Witkin SS, Linhares I, Giraldo P, Jeremias J, Ledger WJ:** Individual immunity and susceptibility to female genital tract infection. *Am J Obstet gynecol* 183:252-256, 2000
156. **Witkin SS:** Immunology of recurrent vaginitis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 15:34-7, 1987
157. **Wozniak KL, Wormley FL Jr, Fidel PL Jr.:** *Candida*-specific antibodies during experimental vaginal candidiasis in mice. *Infect Immun* 79:5790-9, 2002
158. **Wozniak KL, Leigh JE, Hager S, Swoboda RK, Fidel PL jr.:** A comprehensive study of *Candida*-specific antibodies in the saliva of human immunodeficiency virus-positive individuals with oro-pharyngeal candidiasis. *J Infect Dis* 185:1269-76, 2002
159. **Xu J, Sobel JD:** Antibiotic-Associated Vulvovaginal Candidiasis. *Curr Infect Dis Rep*; 5:481-87, 2003

160. **Yano J, Lilly EA, Steele C, Fortenberry D, Fidel PL Jr:** Oral and vaginal epithel cell anti-Candida activity is acid labile and does not require live epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol*; 20:199-205, 2005
161. **Zabeau L, Gevaert P, Bachert C, Tavernier J:** Interleukin-5, eosinophilic diseases and therapeutic intervention. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2:319-28, 2003
162. **Zhang MX, Kozel TR:** Mannan-specific immunoglobulin G antibodies in normal human serum accelerate binding of C3 to *Candida albicans* via the alternative complement pathway. *Infect Immun*; 66:4845-50, 1998
163. **Zhang MX, Bohlman MC, Itatani C, Burton DR, Parren PW, St Jeor SC, Kozel TR:** Human recombinant antimannan immunoglobulin G1 antibody confers resistance to hematogenously disseminated candidiasis in mice. *Infect Immun* 74:362-9, 2006

8. Anhang

8.1. Geräte

Gelelektrophoreseapparatur, Typ HE 33 Hoefer, San Francisco, CA /USA

Spannungsquelle, Typ EPS 500/400 Pharmacia LKB, San Francisco, CA / USA

Pipetten, Filter-Tips PE/PP Nerbe plus GmbH, Winsen / Luhe, Deutschland

Thermocycler, Typ 9600 Perkin Elmer Cooperation, Norwalk, Connecticut / USA

Tischzentrifuge, Typ Z 230 MR Hermle, Deutschland

Spektralphotometer, Typ Anthos Anthos Labtec Instruments, Österreich

Polaroidkamera, Typ GelCam UniEquip, München-Martinsried, Deutschland

UV-Leuchtkasten, Typ N 90 UniEquip, München-Martinsried, Deutschland

Vortexgerät, Typ VF 2 Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Deutschland

Wasserbad, Typ B3 Haake, Karlsruhe, Deutschland

Brutschrank, Typ 2770 Köttermann

Mikrowellengerät, Typ MC 653 Udo Classen GmbH, Kempen, Deutschland

8.2. Datentabelle

PAT-NR	PLATTE	ALTER	GRUPPE	OD IgA	CIgA	OD IgG	CIgG	KULTUR	PCR
508	I E1	44	pa	1,109	n	1,09	g	n	n
509	I F1	45	pa	3,11	p	2,16	p	p	p
510	I G1	48	pa	4,11	p	0,73	g	n	n
511	I H1	45	pa	1,83	p	0,935	g	p	n
512	I A2	45	pa	0,185	n	0,457	n	n	n
513	I B2	48	pa	0,3	n	1,815	p	n	p
514	I C2	47	pa	0,424	n	0,488	n	p	p
515	I D2	34	pa	0,699	n	0,926	g	p	p
516	I E2	32	pa	2,15	p	1,908	p	n	p
517	I F2	35	pa	3,12	p	1,708	g	n	n
518	I G2	39	pa	0,895	n	0,647	p	n	p
519	I H2	32	pa	0,864	n	1,68	p	n	p
520	I A3	39	pa	0,956	n	0,857	g	p	p
521	I B3	41	pa	0,285	n	0,342	n	p	p
522	I C3	39	pa	0,058	n	0,505	n	n	n
523	I D3	31	pa	0,97	n	0,491	n	n	n
524	I E3	37	pa	1,067	n	0,777	g	n	n
525	I F3	34	pa	0,861	n	0,229	n	n	p
526	I G3	32	pa	1,527	p	1,783	p	n	p
527	I H3	37	pa	1,476	p	1,355	p	n	p
528	I A4	37	pa	1,323	n	1,537	p	n	n
529	I B4	39	pa	0,367	n	0,509	n	n	n
530	I C4	52	pa	1,386	n	1,398	p	n	p
531	I D4	22	pa	1,032	n	0,733	g	p	p
532	I E4	39	pa	0,189	n	0,818	g	n	n
533	I F4	32	pa	0,807	n	0,438	n	n	n
534	I G4	36	pa	0,274	n	0,734	g	n	n
535	I H4	46	pa	0,612	n	0,112	n	n	n
536	I A5	33	pa	1,119	n	0,439	n	n	n
537	I B5	36	pa	0,439	n	1,478	p	n	n
538	I C5	51	pa	4,12	p	1,688	p	n	n
539	I D5	25	pa	0,417	n	0,258	n	n	p
540	I E5	27	pa	0,014	n	0,008	n	n	p
541	I F5	36	pa	0,302	n	1,075	g	n	p
542	I G5	40	pa	1,18	n	0,411	n	n	n
543	I H5	46	pa	1,241	g	0,88	g	n	n
544	I A6	34	pa	0,528	n	0,064	n	n	n
545	I B6	22	pa	1,293	g	1,605	p	n	p
546	I C6	45	pa	0,3	n	1,434	p	n	n
547	I D6	40	pa	1,159	n	0,597	n	p	p
548	I E6	41	pa	1,193	p	1,412	p	n	p
549	I F6	28	pa	0,64	n	0,386	n	n	n
550	I G6	48	pa	1,202	g	1,152	g	p	p
551	I H6	29	pa	3,13	p	0,963	g	n	p

552	IA7	31	pa	1,768	p	1,866	p	n	p
553	IB7	36	pa	0,259	n	0,117	n	n	n
554	IC7	35	pa	0,723	n	0,518	n	p	p
555	ID7	38	pa	1,026	n	0,739	g	n	n
556	IE7	38	pa	2,054	p	0,471	n	n	n
557	IF7	42	pa	0,187	n	0,123	n	p	n
558	IG7	29	pa	0,603	n	1,129	g	p	p
559	IH7	36	pa	0,131	n	0,055	n	n	n
560	IA8	42	pa	1,347	g	1,151	g	n	n
561	IB8	38	pa	1,192	g	1,34	g	n	n
562	IC8	40	pa	0,04	n	0,055	n	n	n
563	ID8	33	pa	0,047	n	0,229	n	n	n
564	IE8	34	pa	0,281	n	0,768	g	n	n
565	IF8	33	pa	0,546	n	1,064	g	p	p
566	IG8	28	pa	1,788	p	0,586	n	n	n
567	IH8	39	pa	0,683	n	0,502	n	n	n
568	IA9	48	pa	4,132	p	1,529	p	n	p
569	IB9	32	pa	1,938	p	1,77	p	n	n
570	IC9	41	pa	1,522	p	1,201	g	n	n
571	ID9	40	pa	0,148	n	0,166	n	n	n
572	IE9	33	pa	3,322	p	1,255	g	n	p
573	IF9	28	pa	1,137	n	0,782	p	p	n
574	IG9	45	pa	1,619	p	1,606	g	p	p
575	IH9	38	pa	0,219	n	0,655	g	n	n
577	IA10	19	pa	0,275	n	0,959	g	n	n
578	IB10	42	pa	0,029	n	0,002	n	n	n
579	IC10	22	pa	0,128	n	0,278	n	n	n
580	ID10	40	pa	0,713	n	0,412	n	n	n
581	IE10	40	pa	0,465	n	0,934	g	n	n
582	IF10	40	pa	0,27	n	2,001	p	n	p
583	IG10	38	pa	0,433	n	0,08	n	n	n
584	IH10	39	pa	0,808	n	1,617	p	n	n
585	IA11	23	pa	0,514	n	0,586	n	p	p
586	IB11	29	pa	0,347	n	0,691	g	n	n
587	IC11	24	pa	0,065	n	0,043	n	p	n
588	ID11	32	pa	0,086	n	0,106	n	n	n
589	IE11	40	pa	0,234	n	1,13	g	n	n
590	IF11	41	pa	0,298	n	0,273	n	n	n
591	IG11	39	pa	1,004	n	1,233	g	n	n
592	IH11	44	pa	0,562	n	0,495	n	n	n
593	IA12	25	pa	0,79	n	0,948	g	n	n
594	IB12	41	pa	0,107	n	0,368	n	n	n
595	IC12	44	pa	1,838	p	2,243	p	p	p
596	ID12	34	pa	0,691	n	1,947	p	n	n
597	IE12	36	pa	0,304	n	0,472	n	n	n
598	IF12	45	pa	3,543	p	1,697	p	n	p
599	IG12	32	pa	0,164	n	0,445	n	n	n
600	IH12	40	pa	0,163	n	0,211	n	p	n

601	II E1	28	pa	1,247	g	1,241	g	n	n
602	II F1	41	pa	0,062	n	0,534	n	n	n
603	II G1	21	pa	0,46	n	0,735	g	n	n
604	II H1	49	pa	0,55	n	0,603	n	n	n
624	II A2	34	pa	0,48	n	0,567	n	n	n
625	II B2	26	pa	0,485	n	0,381	n	n	n
626	II C2	43	pa	0,263	n	0,744	g	n	n
627	II D2	50	pa	0,217	n	0,252	n	n	n
628	II E2	26	pa	0,415	n	0,873	g	n	n
629	II F2	21	pa	1,093	n	1,227	g	n	n
630	II G2	43	pa	0,066	n	0,668	n	n	n
631	II H2	20	pa	0,105	n	0,594	n	n	n
632	II A3	24	pa	3,432	p	1,682	p	n	p
633	II B3	36	pa	0,247	n	0,075	n	n	n
634	II C3	46	pa	0,628	n	0,63	n	p	p
635	II D3	44	pa	1,078	n	1,218	g	n	n
636	II E3	40	pa	0,042	n	0,114	g	p	p
637	II F3	44	pa	4,322	p	1,393	p	n	p
638	II G3	53	pa	0,127	n	0,167	n	n	n
639	II H3	37	pa	0,371	n	1,255	g	n	n
640	II A4	52	pa	1,474	p	1,994	p	n	p
641	II B4	35	pa	1,546	p	1,078	g	n	n
642	II C4	34	pa	1,395	g	0,001	n	n	n
643	II D4	36	pa	0,122	n	0,239	n	n	n
644	II E4	50	pa	3,544	p	1,011	g	n	n
645	II F4	46	pa	0,024	n	0,174	n	n	n
646	II G4	20	pa	0,213	n	0,556	n	n	n
647	II H4	26	pa	0,907	n	0,388	n	n	n
648	II A5	21	pa	0,667	n	1,333	g	n	p
649	II B5	29	pa	0,861	n	1,243	g	n	n
650	II C5	45	pa	0,645	n	0,881	g	n	p
651	II D5	38	pa	1,299	g	0,565	n	p	p
652	II E5	47	pa	0,673	n	0,884	g	n	n
653	II F5	38	pa	0,578	n	1,134	g	n	n
654	II G5	35	pa	0,669	n	2,083	p	p	p
655	II H5	20	pa	3,564	p	1,044	g	n	p
656	II A6	34	pa	0,009	n	0,013	n	n	n
657	II B6	32	pa	0,402	n	0,375	n	n	n
658	II C6	35	pa	0,476	n	0,789	g	n	n
659	II D6	33	pa	0,125	n	0,105	n	n	n
660	II E6	25	pa	0,49	n	1,219	g	n	p
661	II F6	20	pa	0,866	n	1,287	g	n	n
662	II G6	50	pa	0,498	n	0,371	n	n	n
663	II H6	25	pa	0,045	n	0,361	n	p	n
664	II A7	33	pa	0,746	n	0,136	n	n	n
665	II B7	39	pa	0,516	n	1,12	g	n	n
666	II C7	33	pa	0,718	n	1,329	g	n	n
668	II D7	23	pa	0,319	n	0,031	n	n	n

669	II E7	34	pa	0,759	n	0,727	g	n	p
670	II F7	46	pa	3,648	p	0,415	n	n	n
693	II G7	41	pa	1,214	g	0,132	n	n	n
694	II H7	27	pa	0,054	n	0,073	n	n	n
696	II A8	35	pa	0,512	n	0,062	n	n	n
698	II B8	31	pa	4,12	p	0,984	g	p	p
699	II C8	25	pa	0,253	n	0,441	n	n	n
700	II D8	44	pa	0,851	n	0,413	n	n	n
702	II E8	50	pa	0,264	n	0,083	n	n	n
703	II F8	26	pa	0,001	n	0,06	n	n	n
704	II G8	36	pa	0,136	n	0,159	n	n	n
706	II H8	29	pa	0,104	n	0,194	n	n	n
707	II A9	25	pa	0,281	n	0,749	g	n	n
708	II B9	34	pa	0,247	n	0,624	n	p	n
709	II C9	19	pa	1,645	p	1,233	g	n	n
710	II D9	32	pa	0,169	n	0,317	n	p	n
711	II E9	45	pa	0,307	n	0,278	n	n	n
712	II F9	45	pa	0,582	n	1,008	g	p	n
714	II G9	25	pa	1,41	g	0,826	g	n	n
715	II H9	25	pa	0,695	n	1,001	g	n	n
716	II A10	50	pa	0,586	n	0,504	n	n	n
717	II B10	27	pa	0,093	n	0,063	n	n	n
718	II C10	33	pa	0,155	n	0,308	n	n	n
723	II D10	46	pa	3,745	p	0,153	n	n	n
724	II E10	40	pa	0,849	n	0,466	n	n	n
727	II F10	26	pa	0,413	n	0,43	n	n	n
728	II G10	22	pa	0,023	n	0,066	n	n	n
729	II H10	49	pa	0,073	n	0,063	n	n	n
730	II A11	25	pa	0,092	n	0,13	n	n	n
731	II B11	38	pa	0,295	n	0,102	n	n	n
732	II C11	32	pa	0,039	n	0,011	n	n	n
733	II D11	20	pa	0,243	n	0,314	n	n	n
773	II E11	25	pa	0,333	n	0,289	n	n	n
774	II F11	37	pa	1,988	p	0,285	n	n	p
775	II G11	19	pa	0,525	n	1,34	g	n	n
776	II H11	22	pa	2,342	p	0,668	g	p	p
777	II A12	41	pa	1,138	n	0,466	n	n	n
778	II B12	42	pa	0,456	n	0,506	n	n	n
779	II C12	38	pa	0,718	n	0,917	g	n	n
780	II D12	36	pa	1,227	g	0,493	n	p	p
781	II E12	23	pa	0,269	n	0,676	g	n	n
782	II F12	32	pa	3,013	p	1,506	p	p	p
783	II G12	22	pa	0,551	n	1,083	g	n	n
v762	II H12	41	pa	2,867	p	1,51	p	p	p
1836	E1	38	ko	0,229	n	0,154	n	n	n
1835	F1	41	ko	0,173	n	0,072	n	n	n
1834	G1	34	ko	0,281	n	0,42	n	n	n

1833	H1	28	ko	0,914	n	1,633	p	n	n
1832	A2	37	ko	0,895	n	1,233	n	n	n
1831	B2	27	ko	1,191	n	1,957	p	n	n
1828	C2	45	ko	1,24	n	0,466	n	n	n
1827	D2	54	ko	0,084	n	0,002	n	n	n
1824	E2	42	ko	1,578	p	0,478	n	n	n
1817	F2	20	ko	1,061	n	1,811	p	n	n
1816	G2	24	ko	0,425	n	1,281	n	n	n
1815	H2	43	ko	0,265	n	0,414	n	n	n
1812	A3	41	ko	0,14	n	0,06	n	n	n
1808	B3	57	ko	0,13	n	0,252	n	n	n
1802	C3	36	ko	0,543	n	0,583	n	n	n
1801	D3	54	ko	0,115	n	0,237	n	n	n
1800	E3	29	ko	0,428	n	0,924	n	n	n
1799	F3	35	ko	0,556	n	0,178	n	n	n
1798	G3	41	ko	0,108	n	0,133	n	n	n
1797	H3	20	ko	0,238	n	0,028	n	n	n
1796	A4	33	ko	0,665	n	0,416	n	n	n
1794	B4	45	ko	0,133	n	0,386	n	n	n
1793	C4	35	ko	0,42	n	0,363	n	n	n
1790	D4	44	ko	0,607	n	0,167	n	n	n
1785	E4	33	ko	0,304	n	0,894	n	n	n
1784	F4	39	ko	1,061	n	1,388	p	n	n
1778	G4	34	ko	0,088	n	0,091	n	n	n
1776	H4	33	ko	0,218	n	0,123	n	n	n
1761	A5	41	ko	0,196	n	0,068	n	n	n
1760	B5	42	ko	0,133	n	0,216	n	n	n
1759	C5	29	ko	0,065	n	0,824	n	n	n
1758	D5	36	ko	0,112	n	0,056	n	n	n
1755	E5	39	ko	0,195	n	0,742	n	n	n
1753	F5	44	ko	0,401	n	0,149	n	n	n
1741	G5	36	ko	0,43	n	0,213	n	n	n
1727	H5	35	ko	1,365	n	0,383	n	n	n
1720	A6	41	ko	0,176	n	0,175	n	n	n
1710	B6	42	ko	0,208	n	0,158	n	n	n
1706	C6	39	ko	0,424	n	0,108	n	n	n
1704	D6	33	ko	0,425	n	2,136	p	n	n
1702	E6	25	ko	0,47	n	0,414	n	n	n
1683	F6	52	ko	0,367	n	1,575	p	n	n
1679	G6	46	ko	1,737	p	1,364	p	n	n
1678	H6	32	ko	0,316	n	0,975	n	n	n
1658	A7	25	ko	0,054	n	0,178	n	n	n
1823	B7	35	ko	0,42	n	0,585	n	n	n

Anmerkung:

PAT-Nr: Patientennummer, Gruppe: Kontrollgruppe (ko), Patientengruppe (pa)

OD IgA/IgG: optische Dichte im Elisa für CIgA bzw. CIgG

n: negativ, p: positiv, g: grenzwertig (wird als negativ gewertet)

8.3. Nukleotiden - Sequenzen:

Candida albicans ERG16 Gene für Cytochrom p-450 L1A1:

Base count 590a 253 c 302 g 706 t

1 atcttacttc tttcttcaa tcttfaatcc atcaatfttt atatataaat agacaaagaa
61 agggaattca atcgttattc ttccatatt ttccatatt actgtcttc tttttattat atatataagt
121 tcttttcaagaagatcata actcaatag gctattgtg aaactgcat tgatggcatt
181 aattatfttt tgcoccttag tgttacacaa cagatcagta tattattagg ggtccatt
241 gttacaact tagtatggca atatttatat tcattaagaa aagatagagc tccattagt
301 ttttattgga ttccttggtt tggttctgca gcttcatatg gtcaacaacc ttatgaatt
361 ttcgaatcat gtcgtcaaaa gtatggtgat gtatfttcat ttatgttatt agggaaatt
421 atgacggftt atfttagtcc aaaggtcat gaattgttt tfaatgctaa attaactgat
481 gtttctgctg aagatgctta taaacattta actactccag ttttcggtaa aggggttatt
541 tatgattgc caaattccag atfaatggaa caaaaaaaaaa ttgctaaatt tgctttgact
601 actgattcat ttaaagata tgttctaag attagagaag aaatttgaa ttatttgtt
661 actgatgaaa gttcaaatt gaaagaaaaa actcatgggg tgccaatgt tatgaaaact
721 caaccagaaa ftactattt cactgcttca agatctttat ttggtgatga aatagaaga
781 atftttgacc gttcattgc tcaactatat tctgatttag ataaaggftt taccctatt
841 aaftttgtt tcctaattt acctftacct cattattgga gacgtgatgc tgctcaaaag
901 aaaatctctg ctacttatat gaaagaaatt aaactgagaa gagaacgtgg tgatattgat
961 ccaaactgag atftaattga ttccttattg atftcatcaa ctataaaga tgggtgaaa
1021 atgactgatc aagaaattgc taactfttta atftgtattc ttatgggtgg tcaacatact
1081 tctgcttcta ctctgctg gttctgtta catttaggtg aaaaacctca ttacaagat
1141 gttatttatc aagaagttgt tgaattattg aaagaaaaag gtggtgattt gaatgattg
1201 scftatgaag atftacaaaa atftaccatca gtcaataaca ctattaagga aactctcaga
1261 atgcatatgc cattacattc tftttftaga aaagftacta acctattaag aatccctgaa
1321 accaattata tftttccaaa aggtcattat gttttagtt ctccaggfta tgctcatact
1381 agtgaaagat atfttgataa ccctgaagat tftgatccaa ctagatggga tactgctgct

1441 gccaaagcta attctgttc attaactct tctgatgaag tfgattatgg gttgggaaa
1501 gtttctaaag gggtttctc accttatta ccattggtg gtggtagaca tagatgtatt
1561 gggaacaat ttgcttatgt tcaattagga accatttaa ctactttgt ttattaatta
1621 agatggacta ttgatggta taaagtcct gaccctgatt atagtcaat ggtggttta
1681 cctactgaac cagcagaaat cattgggaa aaaagagaaa ctgtatgtt ttaataaac
1741 ggcaacttc ttcgattca gtgtctgat tgtttcatt ttgtactta gttggattaa
1801 catatataca catatacata caaatatag atacatatag aatagaaatt a

publiziert in : Tolbert, V. B., Relationship between Candida Species and Cytokine Gene Polymorphisms in Women with Chronic Recurrent Vulvovaginitis, Clinical center in the department of Obstetrics & Gynecology, LMU Munich, 78, 2003

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. H. Spitzbart danke ich sowohl für die organisatorische und moralische Unterstützung, als auch für die wissenschaftliche und fachliche Beratung, vor allem im Gebiet der Mykologie.

Frau Dr. V. Tolbert gilt mein Dank für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen.

Frau Dr. G. Anton möchte ich auch für die fachliche Unterstützung und hilfreiche Zusammenarbeit danken.

Außerdem danke ich Herrn Dr. M. Wadepuhl für die Beratung in statistische Fragen.

Allen anderen, hier nicht namentlich genannten, hilfreichen, geduldigen Personen in meinem Umfeld, die mir bei mit Rat und Tat zur Seite standen, sage ich: DANKE!

Lebenslauf

Christina Ertl

Zur Aumühle 9m, 86153 Augsburg

Geburtsdatum: 28.Januar 1972

Nationalität: deutsch

Geburtsort: München

Familienstand: ledig

Schulbildung

9/1978 - 7/1982

Grundschule Weßling

7/ 1982 - 7/1991

Gymnasium Gilching (math.-nat. Zweig) mit Abschluss am

10.07.1991

allgemeine Hochschulreife/ Abitur

Studium

11/1991 -3/1999

Studium der Humanmedizin, LMU München

4/1999 - 3/2000

Praktisches Jahr: Gynäkologie (KKH Starnberg), Innere (KKH

Starnberg), Chirurgie (Klinikum Großhadern)

23.05.2000

Abschluss: 3. Staatsexamen in Humanmedizin

Famulatur

3/1995 - 4/1995

Allgemeinmedizin (Praxis Dr. Slavin, Weßling)

4/1997

Chirurgie u. Gynäkologie (Privatklinik Dr. Wolfart, Gräfelfing)

8/1997

Gynäkologie und Geburtshilfe (Privatklinik Dr. Wolfart, Gräfelfing)

Ärztin iP

8/2000 - 1/2002

Ärztin im Praktikum, Krankenhaus München-Harlaching

Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe

Ärztin iW

2/2002 –7/2003

Ärztin in Weiterbildung/Assistenzärztin

Seit 8/2003

Klinikum Landshut, Frauenklinik

12/2005

Josefinum Augsburg, Frauenklinik

Anerkennung als **Fachärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe**

Weiterbildung

ab 6/1994

Ausbildung in Traditioneller Chinesische Medizin

(Internat. Gesellschaft für chinesische Medizin, SMS München)

08/2000

Zertifikat Akupunktur (Prüfung, Nachweis min.140 Unterrichtsstunden)

10/2004

Zertifikat chinesische Arzneimittel-Therapie

11/2004

Abschlusszertifikat in Akupunktur/Traditioneller Chinesischer Medizin

(Prüfung, Nachweis von mindestens 350 Unterrichtsstunden)

1/2005

Anerkennung der Zusatzbezeichnung Akupunktur

Sonstiges:

Sprachen (Englisch, Latein, Neugriechisch), gängige PC-Kenntnisse,
Sport, Mitglied im BVF, DGGG, SMS, Marburger Bund