

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

Vorstand: Prof. Dr. K. Friese

**Pilz- und Zytokinnachweis bei Frauen mit Candidose vor
und während der Therapie**

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

Vorgelegt von

Martina Melzer
aus
Groß-Gerau

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Dr. G. Rieder

Mitbetreuung durch die
Promovierten Mitarbeiter: Dr. G. Anton

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 25. November 2008

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.....	5
1.1	Einleitung.....	5
1.2	Fragestellung.....	14
2	MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1	Material.....	15
2.1.1.	Allgemein.....	15
2.1.2.	Candida-Kultur.....	15
2.1.3.	DNA-Extraktion.....	16
2.1.4.	Candida-PCR.....	16
2.1.5.	Gelelektrophorese.....	17
2.1.6.	ELISA(Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay).....	17
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Bestimmung des Reinheitsgrades.....	19
2.2.2	Candida-Kultur.....	20
2.2.3	DNA-Extraktion.....	23
2.2.4	Candida-PCR.....	24
2.2.5	Gelelektrophorese.....	27
2.2.6	ELISA(Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay).....	29
3	ERGEBNISSE.....	39
3.1	Statistische Berechnungen.....	39
3.2	Auswahlkriterien und Datenerfassung der Probandinnen.....	40
3.3	Reinheitsgrad.....	42
3.4	Candida-Kultur.....	45
3.5	Candida-PCR.....	49
3.6	Gesamt-IgE.....	55
3.7	Candida-IgE.....	58
3.8	IL-4.....	61
3.9	IL-10.....	64
3.10	IL-12.....	67
3.11	Cys-Leukotriene.....	70
3.12	PGE ₂	74
4	DISKUSSION.....	77
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	98

6	ANHANG	100
6.1	Geräteliste	100
6.1.1	Allgemein	100
6.1.2	Candida – Kultur	100
6.1.3	DNA-Extraktion	101
6.1.4	Candida – PCR.....	101
6.1.5	Gelelektrophorese.....	101
6.1.6	ELISA	102
6.2	Auswertungstabellen Patientinnen und	102
	Kontrollen	102
6.3	Literaturverzeichnis.....	105
6.4	Abkürzungen	117
6.5	Danksagung	119

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

Die ersten Angaben zur vaginalen Flora beruhten auf mikroskopischen Untersuchungen und dann auf kulturellen Anzuchtungen.

Dass die bakterielle Flora Ursache vaginaler Infekte sein kann, wurde erstmals von Albert Döderlein 1892 in seiner Dissertation mit dem Titel „Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber“ beschrieben. In Nativpräparaten ohne zusätzliche Färbung oder Fixierung war es ihm möglich Laktobazillen im Scheidensekret gesunder Frauen sowie die Laktobazillen-arme Flora bei Frauen mit postpartaler Endometritis aufzuzeigen (Donders, 2004). Sein Nachfolger K. Schröder begann damit, die ersten Laktobazillus-Grade zu definieren: Grad I entspricht dem einer gesunden Frau mit überlegenen Laktobazillen-Morphotypen. Grad II steht für eine Mischflora, in der die Laktobazillen teils durch andere Bakterien ersetzt sind. Beim Grad III kommen keine Laktobazillen vor, nur andere Bakterien (Donders, 2004).

Durch die mikroskopischen und kulturellen Methoden wurde als dominierende Spezies der Vaginalflora *Lactobacillus acidophilus* identifiziert. Neuere gentechnologische Methoden führten jedoch zu weiteren häufig vorkommenden Laktobazillen-Spezies, sowie anderen in der Vaginalflora vorkommenden Bakterien (Witkin, 2007; Hill, 1984).

Die Vaginalflora einer gesunden Frau im gebärfähigen Alter besteht demnach vorwiegend aus den Laktobazillen-Spezies *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* und *L. gasseri* (Witkin, 2007; Forsum, 2005; Falagas, 2006). Abweichend davon beschrieben andere Autoren als häufigste Laktobazillen *L. acidophilus* und *L. fermentum*. *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. jensenii*, *L. casei*, *L. delbrueckii* und *L. salivarius* kommen laut ihnen weniger häufig vor (Pascual, 2006; Larsen und Monif, 2001).

Das Zusammenspiel des von den Milchsäurebakterien produzierten sauren pH-Werts (4 - 4,5), der von Bakterien erzeugten antimikrobiellen Produkte und die lokale Aktivität des humoralen und zellulären Immunsystems ermöglichen eine Abwehr gegen pathogene Mikroben (Witkin, 2007; Larsen, 1993). Das lokale Immunsystem wird durch die vaginalen Epithelzellen aktiviert (Fidel, 2004; Witkin, 2007).

Die Produktion von Milchsäure und die von H_2O_2 gelten dabei als wichtigster Schutz vor vaginalen Infektionen (Pascual, 2006; Larsen und Monif, 2001; Eschenbach, 1989).

Fakultativ pathogene Bakterien wie *Gardnerella vaginalis*, B-Streptokokken und *E. coli*, die zur vaginalen Flora dazugehören, werden bei einer intakten Scheidenflora durch die Lactobazillen in ihrem Wachstum gehemmt und verursachen keine Infektionen (Larsen und Monif, 2001).

Candida albicans scheint bei bis zu 30% aller Frauen im gebärfähigen Alter ebenfalls Teil der Vaginalflora zu sein (Babula, 2005) und ist tolerant gegenüber dem dort herrschenden sauren pH-Wert. Es kann daher mit den Lactobazillen koexistieren (Larsen und Monif, 2001; Falagas, 2006; Witkin, 2007; Hill, 1986). Eine Kolonisation mit *Candida albicans* ist asymptomatisch (Larsen und Monif, 2001).

Vulvovaginalcandidosen (VVC) stellen nach wie vor ein signifikantes Problem bei Frauen im gebärfähigen Alter dar (Fidel, 1996).

Candida-Spezies verursachen in 20 bis 25% der Fälle eine Candidose, übertroffen nur von Bakterien in 40 bis 50% aller Fälle (Trama, 2005).

Vor der Pubertät ist eine VVC selten, aber mit einem Alter von 25 Jahren haben circa 50% aller Frauen mindestens eine klinisch diagnostizierte Candidose der Scheide gehabt (Trama, 2005; Marrazzo, 2003).

Schätzungsweise 75% aller Frauen haben mindestens einmal in ihrem Leben mit einer solchen Candidose zu tun gehabt (Trama, 2005; Fidel, 2004).

Die symptomatische VVC präsentiert sich mit Symptomen wie Jucken, Brennen, Wundsein, abnormalen Ausfluss und Rötung (Fidel, 2004).

Etwa 5% der Frauen erleiden mindestens einen Rückfall, die rezidivierende Vulvovaginalcandidose. Treten die Rezidive vier- oder mehrmals jährlich auf, spricht man von der chronisch rezidivierenden Vulvovaginalcandidose (CRVVC) (Weissenbacher, 2001).

Eine Besiedelung der Scheide mit *Candida*-Spezies verläuft in 15 bis 25% der Fälle asymptomatisch (Fidel, 1996). Bei dieser Form werden nur geringe Mengen gefunden, die vorwiegend als Blastosporen vorliegen, im Gegensatz zur pathogeneren Hyphenform bei der symptomatischen Form der Candidose (Fidel, 2004; Witkin, 2007).

Von den verschiedenen *Candida* Spezies ist *Candida albicans* der hauptsächliche Verursacher einer VVC. Zwischen 80 und 92% aller VVC weltweit werden durch diese Art verursacht (Trama, 2005). Danach folgt *Candida glabrata* mit 4,5 %, *Candida parapsilosis* mit 3,9% und *Candida tropicalis* mit 2,9% (Linhares, 2001).

Als prädisponierende Faktoren für das Auftreten einer vaginalen Candidose gilt ein erhöhter Östrogenspiegel auf Grund einer Schwangerschaft (Fidel, 1996; Fidel, 2004; Linhares, 2001; Xu, 2004; Cheng, 2006), Einnahme von oralen Kontrazeptiva sowie Hormonersatztherapie (Fidel, 1996; Linhares, 2001; Cheng, 2006; Fosch, 2006). Jedoch enthalten neuere orale Kontrazeptiva niedrigere Östrogenmengen und verursachen daher seltener Candidosen. Weitere Faktoren sind die Einnahme von Antibiotika (Fidel, 1996; Fidel, 2004; Linhares, 2001; Cheng, 2006; Fosch, 2006), Diabetes mellitus, die Einnahme von Immunsuppressiva (Fidel, 1996; Fidel, 2004; Linhares, 2001; Cheng, 2006) und Stress (Meyer, 2006).

Die meisten Frauen mit einer persistierenden Candidose haben jedoch keine der prädisponierenden Faktoren, dies wird als primäre CRVVC

beschrieben (Fidel, 1996; Fidel, 2004). Eine andere Gruppe kann diese Faktoren nicht vermeiden, dies wird als sekundäre CRVVC beschrieben (Fidel, 2004). Die RVVC wird auch einer lokalen Immundefizienz zugeschrieben (Fidel, 1996).

Überblick prädisponierende Faktoren für eine VVC
Erhöhter Östrogenspiegel durch: Schwangerschaft Kontrazeptiva / Hormonersatztherapie
Antibiotika
Diabetes mellitus
Immunsuppressiva
Stress

Tabelle 1: Überblick über prädisponierende Faktoren für das Auftreten einer VVC

Das menschliche Immunsystem besteht aus einem angeborenen unspezifischen Anteil und einem erworbenen spezifischen Anteil, jeweils mit humoralen und zellulären Komponenten.

Zu dem angeborenen humoralen Teil gehören das Komplementsystem und Interferone, zum zellulären Teil neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen und Makrophagen (Oethinger, 2000; Thews, Mutschler, 1999).

Zu dem erworbenen humoralen Teil gehören die Immunglobuline, zum zellulären Teil die T-Lymphozyten und B-Lymphozyten (Oethinger, 2000; Thews, Mutschler, 1999).

Die T-Lymphozyten unterscheidet man in die Typen CD8 (T-Killerzellen) und CD4 (T-Helferzellen), diese noch mal in TH1- und TH2-Zellen.

Zytokine werden von T-Helferzellen und Makrophagen gebildet und sezerniert und gehören damit zur angeborenen und erworbenen Immunabwehr (Oethinger, 2000; Thews, Mutschler, 1999).

Die zellvermittelte Immunität (CMI) gilt als Hauptabwehrmechanismus gegen die meisten mukösen Candida-Infektionen (Wozniak, 2005) und tritt bei Patienten mit Immunsuppression verstärkt auf. Daher wurde postuliert, dass eine verminderte CMI eine wichtige Rolle bei einer RVVC spielt (Fidel, 2004; Weissenbacher, 2005; Kosonen, 2006).

Obwohl eine humorale Beteiligung durch Nachweis von IgA und IgG im Vaginalsekret, sowie das Auftreten von polymorphonukleären Neutrophilen (PMNs) auch auf eine Beteiligung des angeborenen Immunsystems hinweist, scheint die CMI mit CD4-T-Zellbeteiligung der Hauptabwehrmechanismus zu sein (Fidel, 2004).

Man vermutet, dass bei einer asymptomatischen Besiedelung mit Candida vorwiegend TH1-Zellen durch Makrophagen und PMNs stimuliert werden. Diese schütten dann IL-2 und Interferon- γ aus. IL-12 aus Makrophagen stimuliert die TH1-Zellen (Fidel, 2004; Kosonen, 2006). Durch diese Mechanismen soll das Candida-Wachstum limitiert werden (Fidel, 2004; Weissenbacher, 2000).

Durch exogene oder endogene Faktoren soll es bei der RVVC zu einer verstärkten Stimulation von TH2-Zellen kommen, die IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 ausschütten. Dadurch wird die TH1-Zellaktivität gedrosselt und Candida wechselt in die pathogene Hyphenform. Das führt wiederum zu oben genannten Symptomen (Fidel, 2004; Kosonen, 2006).

Ferner wurden Prostaglandin E₂ und Candida-IgE Antikörper im Vaginalsekret gefunden (Fidel, 2004; Weissenbacher, 2004). Das Vorliegen von Candida-IgE Antikörpern spricht für ein allergisches Geschehen (Fidel, 2004; Fidel, 2007; Weissenbacher, 2000; Weissenbacher, 2005). So

wurden Candida-IgE Antikörper bei Patienten mit Allergien gefunden (Ishiguro, 1992).

PGE₂ und Cysteinyll-Leukotriene sind bedeutende Entzündungsmediatoren, die auch bei allergischen Reaktionen eine zentrale Rolle spielen. Sie wurden im Scheidensekret gefunden und verstärken die Stimulierung von TH2-Zellen (Weissenbacher, 2005; Noverr, 2002).

Prostaglandin E₂, ein Arachidonsäure-Metabolit, wird unter anderem in Makrophagen gebildet (Witkin, 1988; Bonney, 1984) und hat immunsuppressive Eigenschaften auf die CMI (Fidel, 2004; Kalo-Klein und Witkin, 1990). Es vermindert die Produktion von IL-2 in TH1-Lymphozyten und deren Proliferation (Fidel, 2004; Witkin, 1988; Noverr, 2002; Chouaib, 1984). PGE₂ wird verstärkt bei einer CRVVC produziert (Fidel, 2004; Weissenbacher, 2000; Weissenbacher, 2004), was u.a. durch Histamin bedingt sein könnte (Fidel, 2004). Gleichzeitig wurden auch vermehrt Candida-IgE-Antikörper gefunden (Witkin, 1988).

PGE₂ scheint sogar auch von *Candida albicans* selbst produziert zu werden (Noverr, 2002).

Cysteinyll-Leukotriene (LTC₄, LTD₄, LTE₄) sind Metaboliten der Arachidonsäure, welche mit Hilfe des Enzyms 5-Lipoxygenase aus LTA₄ entstehen. Sie sind für die Chemotaxis und damit die vermehrte Wanderung von Leukozyten zum Entzündungsort verantwortlich (Weissenbacher, 2005; Noverr, 2002). Sie stimulieren TH2-Zellen und Eosinophile. Sie können auch von *Candida albicans* selbst gebildet werden (Noverr, 2002). Ein Leukotrien-spaltendes Enzym, die LT-Hydrolase, wurde in *Candida albicans* gefunden (Cormack, 1994).

Anti-inflammatorische Zytokine sind IL-4 und IL-10 (Weissenbacher, 2005).

Pro-inflammatorisch wirken das Zytokin IL-12 und die Mediatoren PGE₂ und Cys-Leukotriene (Weissenbacher, 2005; Noverr, 2002; Cormack, 1994).

Interleukin-4 wird in TH2-Lymphozyten produziert (Fidel, 2004; Weissenbacher, 2005; Kosonen, 2006). Es stimuliert die Differenzierung von CD4-T-Zellen zu neuen TH2-Zellen, hemmt die Bildung von TH1-Zellen und führt zur verstärkten Produktion von IgE. Dieses ist wiederum für allergische Reaktionen verantwortlich (Fidel, 2004; Weissenbacher, 2005) und ist bei einigen Patientinnen mit CRVVC erhöht (Weissenbacher, 2004; Kosonen, 2006).

Interleukin-10 wird in TH2-Zellen produziert (Fidel, 2004; Weissenbacher, 2005; Kosonen, 2006). Es hemmt die Bildung von TH1-Lymphozyten und ist bei einigen Patientinnen mit CRVVC erhöht (Weissenbacher, 2000).

Es gibt jedoch auch Untersuchungen die zeigen, dass keine Unterschiede in der konstitutionellen sowie auch als Antwort auf Candida bedingten IL-10 Produktion bestehen und pro-inflammatorische Zytokine eine stärkere Rolle spielen (Steele und Fidel, 2002).

Interleukin-12 stimuliert die Differenzierung von CD4-Zellen zu TH1-Zellen und hemmt die Bildung von TH2-Zellen. Dies sieht man als protektiven Mechanismus gegen eine Candida-Infektion an (Weissenbacher, 2005; Romani, 1997; Rogge, 1997).

IL-12 ist bei einem Teil der Patientinnen mit CRVVC erhöht (Weissenbacher, 2000). Hier gibt es jedoch auch wieder Untersuchungen, die eine unveränderte oder verminderte Bildung von IL-12 während einer Candida-Infektion zeigen (Weissenbacher, 2000;

Kosonen, 2006; Steele und Fidel, 2002). Eine verminderte Produktion würde auf eine Suppression der CMI hindeuten (Weissenbacher, 2000).

Zytokin	Zusammenhang mit CRVVC
Candida-IgE	Deutet auf allergische Reaktion auf Candida hin
Gesamt-IgE	Deutet unspezifisch auf allergische Reaktionen hin
IL-4	TH2-Zellen↑, TH1-Zellen↓, IgE-Produktion↑
IL-10	TH1-Zellen↓
IL-12	TH2-Zellen↓, TH1-Zellen↑
PGE ₂	IL-2↓, TH1-Zellen↓ Mediator bei Entzündungen u. Allergien
Cys-Leukotriene	TH2-Zellen↑ Chemotaktische Faktoren bei Entzündungen u. Allergien

Tabelle 2: Untersuchte Zytokine und ihre Bedeutung bei CRVVC

Entgegen oben genannten Kenntnissen ergaben neuere Untersuchungen, dass bei Frauen mit einer CRVVC ungeklärter Ursache vermutlich keine verminderte CMI vorliegt. Stattdessen nimmt man eine starke pro-inflammatorische Immunantwort durch PMNs und damit eine vorrangige Rolle des angeborenen unspezifischen Immunsystems an (Fidel, 1996; Fidel, 2005; Wozniak, 2005; Fidel, 2007; Barousse, 2005).

Man vermutet, dass bei einer VVC vaginale Epithelzellen Candida-spezifische Antigene erkennen, pro-inflammatorische Zytokine freigesetzt werden, dadurch Leukozyten einwandern und zu den typischen Symptomen einer vaginalen Candidose führen.

Frauen mit einer asymptomatischen Besiedelung von Candida sollen Epithelzellen haben, die gegen kleine Mengen von Candida tolerant sind. Frauen mit CRVVC sollen dagegen sehr intolerante Epithelzellen gegen kleinste Mengen von Candida haben und damit sehr anfällig sein (Fidel, 2005; Fidel, 2007).

Frauen mit akuten Candidosen und einer rezidivierenden Candidose, bei der es nach ca. 4-12 Wochen zu einem Rückfall kommt, werden kurzzeitig mit Antimykotika behandelt. Frauen mit chronisch rezidivierenden Candidosen erhalten eine Langzeitbehandlung mit Antimykotika über mehrere Monate (Weissenbacher, 2001).

Die Behandlung mit Antimykotika ist während der Einnahmezeit sehr effektiv, aber nach Beendigung der Therapie haben etwa 50% aller Frauen einen erneuten Rückfall (Fidel, 2004).

Auch nach Langzeittherapie mit Fluconazol über 6 Monate blieben laut einer Studie nur 43% der Frauen innerhalb von 10 Monaten nach Beendigung der Therapie beschwerdefrei (Sobel, 2004).

Fluconazol ist ein Triazol, das die Ergosterol-Biosynthese von Hefepilzen hemmt und damit fungistatisch bis fungizid wirkt (Cha und Sobel, 2004).

Durch den weit verbreiteten Gebrauch von frei verkäuflichen Azolen und dem Verschreiben von diesen ohne eindeutige Diagnose, haben sich Resistenzen gebildet (Trama, 2005). Vor allem *Candida glabrata* ist gegen viele Azole, vor allem auch Fluconazol, resistent und daher schwer zu behandeln (Fidel, 1999).

1.2 Fragestellung

Im Rahmen dieser Studie wurden Frauen mit einer diagnostizierten CRVVC unter Langzeittherapie mit Fluconazol auf mögliche Veränderungen von Immunparametern während der Behandlung untersucht und ein Pilznachweis durchgeführt.

Veränderungen bestimmter Zytokine während der Therapie könnten Rückschlüsse auf mögliche allergische und/oder entzündliche Vorgänge bei einer CRVVC zulassen und dadurch zu einer optimierten Therapie verhelfen.

Eine Kolonisation mit Candida wurde mittels kultureller Anzucht, sowie PCR-Nachweis überprüft.

Mittels ELISA wurden die Mengen der Zytokine IL-4, IL-10, IL-12, PGE₂, Cys-Leukotrienen, Candida-IgE und Gesamt-IgE im Vaginalsekret bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Allgemein

Material

- Eppendorfgefäße (steril) 1,5 ml
Firma Eppendorf
- Pipettenspitzen steril
Firma Südlaborbedarf GmbH
- Filter - Pipettenspitzen steril
Firma Südlaborbedarf GmbH
- Pipettenspitzen (unsteril)
Firma Perke GmbH

2.1.2. Candida-Kultur

Material

- Sabouraud Flüssigagarmedium SAB B-T
Firma Biomerieux
- Chromagarplatten Candida
Firma BD Diagnostics
- Cryo – Röhrchen, 1,8ml
Firma Nunc

2.1.3. DNA-Extraktion

Material

- Lyticase 25000 U
Firma Sigma
- QIAmp DNA Mini Kit
Firma Qiagen
- PBS
Firma Life Technologies
- EDTA 0,5 M
Firma Sigma
- Mercaptoethanol 2%ige Lösung
Firma Sigma

2.1.4. Candida-PCR

Material

- Eppendorfgefäße (steril) 0,5 ml
Firma Eppendorf
- Primer ITS-3 (100 µM)
Firma Invitrogen
- Primer ITS-4 (100 µM)
Firma Invitrogen
- Taq-Polymerase Hot Start Taq Plus DNA Polymerase (250 U)
Firma Qiagen
- dNTP – Mix (dCTP, dGTP, dATP, dTTP) je 10mM
Firma Qiagen
- H₂O steril (Ampuwa)
Firma Fresenius Kabi

- Farbpuffer 10x Coral Load PCR Buffer
Firma Qiagen

2.1.5. Gelelektrophorese

Material

- TBE – Puffer Rotiphorese 10x
Firma Roth
- Agarose (for routine use)
Firma Sigma
- Ethidiumbromid 1%ige Lösung
Firma Genaxxon Bioscience
- Marker DNA Ladder N 3231 S (100bp)
500µg/ml
Firma New England BioLabs
- Farbpuffer 5x DNA Blue Run
Firma Hybaid
- Polaroidfilme Polaroid 667
ISO 3000/DIN 36

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

Material

- Cysteinyl Leukotriene Enzyme Immunoassay Kit
Firma Assay Designs Inc.
 - Goat anti-Mouse IgG Mikrotiterplatten
 - Cys-LT EIA Konjugat
 - Cys-LT EIA Antikörper
 - pNpp – Substrat (p-Nitrophenolphosphat)

- Assay - Puffer (Tris-gepufferte Salzlösung)
- Waschpuffer (Tris-gepufferte Salzlösung)
- Stopplösung (Phosphorsäurelösung)
- Cys-LT – Standard
- Prostaglandin E₂ Enzyme Immunoassay Kit
 - Firma Assay Designs Inc.
- Goat anti-Mouse IgG Mikrotiterplatten
 - Alkalische Phosphatase PGE₂ Konjugat
 - PGE₂ EIA Antikörper
 - pNpp – Substrat (p-Nitrophenolphosphat)
 - Assay - Puffer (Tris-gepufferte Salzlösung)
 - Waschpuffer (Tris-gepufferte Salzlösung)
 - Stopplösung (Phosphorsäurelösung)
 - PGE₂ – Standard
- Human IL-4 Immunoassay Kit
 - Firma Bioscience
 - Human IL-4 Standard
 - Standardverdünnungspuffer (8mM Azidlösung)
 - Human IL-4 beschichtete Mikrotiterplatten
 - Human IL-4 Biotin Konjugat
 - HRP + Verdünnungslösung
 - Waschpuffer (o.A.)
 - TMB (Tetramethylbenzidin) Chromogen
 - Stopplösung (o.A.)
- Human IL-10 Immunoassay Kit
 - Firma Biosource
 - Human IL-10 Standard
 - Human IL-10 beschichtete Mikrotiterplatten
 - Human IL-10 Biotin Konjugat

- Sonstiges s. IL-4
- Human IL-12 Immunoassay Kit
 - Firma Biosource
 - Human IL-12 Standard
 - Human IL-12 beschichtete Mikrotiterplatten
 - Human IL-12 Biotin Konjugat
 - Sonstiges s. IL-4
- Total Human IgE ELISA Assay Kit
 - Firma Alerchek Inc.
 - Anti-Human IgE beschichtete Mikrotiterplatten
 - HRP (Streptavidinperoxidase) konjugiertes mouse monoclonal anti-human IgE
 - TMB/Peroxid Chromogensubstrat I
 - IgE Verdünnungslösung Specimen Diluent green II
 - Stopplösung 0,5N Schwefelsäure
 - IgE – Standard
- Human Allergen Specific IgE ELISA Blood Assay Kit
 - Firma Alerchek Inc.
 - Allergen beschichtete Mikrotiterplatten
 - HRP konjugiertes goat monoclonal anti-human IgE
 - TMB/Peroxid Chromogensubstrat II
 - Stopplösung 0,5N Schwefelsäure

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung des Reinheitsgrades

Zunächst wurden die Vaginalabstriche in der gynäkologisch-mikrobiologischen Sprechstunde von Professor Weissenbacher, Frauenklinik, Klinikum Großhadern, vom jeweils untersuchenden Arzt abgenommen.

Danach wurde mit Hilfe eines Wattestäbchens etwas Scheidensekret auf einen Objektträger ausgestrichen, ein Tropfen 0,9%ige Kochsalzlösung dazugegeben und der Abstrich unter dem Mikroskop angesehen, um den Reinheitsgrad der Scheide zu bestimmen. Außerdem wurde auf Vorkommen und Anzahl von Laktobazillen, Epithelzellen, anderen Bakterien und Leukozyten untersucht.

2.2.2 Candida-Kultur

Vaginalabstriche

Mit Hilfe einer 2ml Spritze wurde eine 0,9%ige Kochsalzlösung in die Scheide eingebracht, mit einem Wattestäbchen die Kochsalzlösung mit dem Scheidensekret des hinteren Scheidengewölbes vermischt und anschließend mit der gleichen Spritze wieder aufgenommen.

Die Abstriche wurden nach Lagerung im Kühlschrank (7°C) am darauffolgenden Tag verarbeitet.

Aufbereitung der Vaginalabstriche für PCR und ELISA

Die 2ml Spritzen wurden kurz auf einem Schüttler durchgemischt und je 1ml des Materials in zwei Eppendorfgefäße überführt. Nach Abzentrifugieren (2min, 5000rpm) wurde der Überstand in ein Cryo - Röhrchen pipettiert und die Pellets in den Eppendorfgefäßen gelassen. Die so gewonnenen Proben wurden bei -75°C eingefroren.

Anlegen von Pilzkulturen

Jeweils drei bis vier Tropfen des Vaginalabstriches wurden in die Röhrcchen mit Flüssigagar überführt, kurz durchmischt und anschließend für 72h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach 72h wurden die Kulturen visuell und mikroskopisch untersucht. Visuell konnte bei Vorliegen einer positiven Probe eine deutliche Trübung des Flüssigagars und Gasentweichung beim Öffnen des Röhrcchens festgestellt werden. Diese Proben, sowie auch trübe Proben ohne Gasentweichung, wurden mikroskopisch untersucht.

Unter 400-facher Vergrößerung konnte unterschieden werden, ob die Trübung des Mediums durch Pilzkolonien oder Bakterienkolonien zustande kam.

Auf Grund der unterschiedlichen Morphologie der Hefepilzarten konnte eine Unterscheidung in unterschiedliche Spezies vorgenommen werden. Diese Nachweismethode ist wissenschaftlich jedoch nicht anerkannt.

Morphologische Merkmale

Spezies	Morphologie
Candida albicans	große, runde Sproßzellen
Candida glabrata	deutlich kleinere runde Sproßzellen
Candida krusei	ovale, längliche, große Sproßzellen
Candida parapsilosis	ovale, längliche, kleine Sproßzellen
Candida tropicalis	ovale, rundliche Sproßzellen
Saccharomyces cerevisiae	sehr kleine, rundliche Sproßzellen

Tabelle 3: Morphologische Merkmale der einzelnen Candida-Spezies

Um eine sichere Unterscheidung der einzelnen Spezies zu erreichen, wurden die Candida – positiven Proben auf Chromagarplatten ausgestrichen und 72h im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Die jeweiligen Candida-Arten ergaben unterschiedliche Farbreaktionen, die durch Hydrolyse von chromogenen Substanzen des Chromagars zustande kamen.

Chromagarfärbung

Spezies	Farbe
Candida albicans	Grün
Candida glabrata	Rosa
Candida krusei	Hellrosa
Candida tropicalis	Blau

Tabelle 4 :farbliche Identifizierung der Spezies mittels Chromagarfärbung

Candida parapsilosis und Saccharomyces cerevisiae konnten mittels Chromagar nicht identifiziert werden. Die Proben wurden zur Speziesbestimmung in das mikrobiologische Labor der Klinik geschickt.



Abbildung 1: Beispiel für eine Chromagarplatte zur Differenzierung der Candida-Spezies, Quelle: Fluorpraktikum II, Weissenbacher, medifact publishing, 2. Auflage

2.2.3 DNA-Extraktion

Das nach Aufbereitung des Vaginalabstriches gewonnene Pellet wurde für die DNA - Extraktion verwendet.

Alle Schritte, außer dem Zentrifugieren, wurden unter der Laminar-flowbox durchgeführt.

Die Pellets wurden abzentrifugiert (1min, 10900rpm), der Überstand (PBS = Phosphate Borate Saline) abgenommen und die Pellets mit 100µl Lyticase resuspendiert. Zum Aufbrechen der Pilzzellwand wurden die Proben mit der Lyticase für 1h bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben abzentrifugiert (3min, 10900rpm), der Überstand abgenommen und die Pellets mit 180µl ATL-Puffer versetzt, auf einem Schüttler durchmischt, und noch 20µl Proteinase K dazugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation für 1h bei 56°C im Wasserbad um die Pilzzellen und andere Zellen zu lysieren sowie Proteine abzubauen.

Nachfolgend wurden die Proben abzentrifugiert (1min, 10900rpm) und 200µl AL-Puffer dazugegeben, auf einem Schüttler durchmischt und für weitere 10min bei 70°C im Wasserbad inkubiert um weitere Zellbestandteile zu lysieren.

Die Proben wurden erneut abzentrifugiert (1min, 10900rpm), 96%iger Ethanol dazugegeben und auf einem Schüttler durchmischt, um die DNA auszufällen.

Die anschließenden Schritte dienten der Aufreinigung der DNA.

Die Lösung wurde auf die QIAmp – Säule gegeben, abzentrifugiert (1min, 8000rpm), die Säule in ein 2ml Röhrchen überführt, und 500µl AW1-Puffer dazugegeben. Danach wurde wieder abzentrifugiert (1min, 8000rpm), die Säule in ein neues 2ml Röhrchen gegeben und 500µl AW2-Puffer dazugegeben. Nach einem weiteren Zentrifugierschritt (3min, 10900rpm), wurde die Säule in ein 1,5ml Eppendorfgefäß

überführt, 100µl AE-Puffer dazugegeben und 5min bei RT stehen gelassen. Dieser letzte Schritt wurde zweimal durchgeführt und diente der Elution der DNA.

Die aufgereinigten Proben mit der DNA wurden bei -20°C eingefroren. Alle Substanzen, außer der Lyticase entstammten dem Qiagen DNA Mini Kit.

Ansatz der Lyticase - Lösung 0,1%

Lyticase	8,6mg
PBS	6,7ml
0,5M EDTA	1,7ml
2% Mercaptoethanol	<u>0,168ml</u>
	8,6ml

Davon wurden 1ml Aliquots gemacht und bei -20°C ein gefroren.

2.2.4 Candida-PCR

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) dient der Vervielfältigung eines beliebigen Abschnitts in einem DNA – Molekül, der anschließend mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht wird. Mit Hilfe der PCR können sehr geringe DNA – Mengen nachgewiesen werden, die zum Beispiel in einem kulturellen Nachweis nicht zu sehen wären.

Alle Arbeiten, bis auf das Zentrifugieren, wurden unter der Laminar-flowbox durchgeführt.

Als Primer dienen:

- ITS-3

Basensequenz: 5' - GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC – 3'

- ITS-4

Basensequenz: 5' - TCC TCC GTC TAT TGA TAT GC – 3'

Jede PCR wurde mit einer Negativkontrolle und zwei Positivkontrollen durchgeführt. Erstere diente zur Überprüfung eventueller Verunreinigungen beim Ansetzen der Proben, letztere zur Bestimmung der Candidaspezies.

Kontrollen:

- Negativkontrolle: steriles H₂O
- Positivkontrolle 1: Lerch 1 (*Candida albicans*)
- Positivkontrolle 2: Lerch 2 (*Candida glabrata*)

Es wurde jeweils ein Probenmix angesetzt. Davon wurden je 49µl in die 0,5ml Eppendorfgefäße vorgelegt und anschließend je 1µl DNA dazupipettiert, die Proben auf einem Schüttler durchmischt, abzentrifugiert (1min, 10900rpm) und in den Thermocycler (PCR – Gerät) gestellt.

PCR – Mix pro Probe

Primer ITS-3 (20µM)	2,5µl
Primer ITS-4 (20µM)	2,5µl
Taq – Polymerase (2,5U)	0,5µl
PCR – Puffer (1x)	5,0µl
dNTP – Mix (10mM)	1,0µl
DNA	1,0µl
steriles H ₂ O	<u>37,5µl</u>
	50,0µl

Die Primer wurden 1:5 verdünnt.

Die Taq – Polymerase wurde 1:100 verdünnt.

Der PCR – Puffer wurde 1:10 verdünnt.

Im Thermocycler wurden insgesamt 40 Zyklen durchlaufen.

Ablauf eines Zyklus

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)
Vorstufe	95	05:00
Denaturierung	95	00:45
Hybridisierung	49	01:00
Verlängerung	72	01:30
Finaler Extensionsschritt	72	10:00

Tabelle 5: Reaktionsschritte bei der PCR

Während der Vorstufe wird die Denaturierung des DNA – Doppelstrangs eingeleitet und die Hot Start Taq-Polymerase aktiviert.

In der darauffolgenden Denaturierung wird dieser aufgelöst, so dass zwei Einzelstränge entstehen.

Während der Hybridisierung lagern sich die Primer an die Einzelstränge an.

Während der Verlängerung erfolgt die DNA – Synthese und damit die Vervielfältigung des gewünschten DNA – Abschnitts.

Der finale 10 min dauernde Schritt dient der Vervollständigung aller verlängerten DNA – Abschnitte, da nicht alle Bruchstücke während der Verlängerungsphase vollständig verlängert werden.

2.2.5 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese werden die bei der PCR entstandenen DNA – Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch Mitlaufenlassen eines Markers mit DNA - Fragmenten bekannter Größe kann das gesuchte Candida – DNA – Fragment abgelesen werden. Dies erfolgt unter UV – Licht, die DNA wird durch Zugabe von Ethidiumbromid zum Gel sichtbar gemacht.

Zunächst wurde der TBE – Puffer hergestellt, der als Laufpuffer und für die Zubereitung des Gels diente.

1x TBE – Puffer (Tris Boric EDTA)

10x TBE	100ml
Steriles H ₂ O	ad 1000ml

Herstellung des Gels

375mg Agarose wurden mit 25ml TBE in ein Becherglas gegeben, gemischt, dann gewogen und anschließend in der Mikrowelle erhitzt bis eine klare Lösung entstand. Das Becherglas wurde erneut gewogen und der Wasserverlust durch Verdampfung mit gereinigtem Wasser ausgeglichen.

Nach einer kurzen Abkühlphase wurden 2µl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung zur Agaroselösung dazupipettiert, untermischt und anschließend in eine Vorrichtung ausgegossen, die Gelkämme in die Vorrichtung gehängt und das Gel erhärten gelassen.

Elektrophorese

Die Gelkämme wurden aus dem Gel herausgezogen und das Gel in der Vorrichtung in die Gelkammer gestellt. Danach wurde soviel 1x TBE – Puffer in diese gegeben, bis das Gel vollständig bedeckt war.

Nun wurden 1µl Marker mit 0,5µl Farbpuffer versetzt und die Lösung in die erste Geltasche pipettiert. In die nächsten drei Taschen wurden je 8µl der Positiv- und Negativkontrollen pipettiert, in die anderen Taschen je 8µl der Proben.

Bei einer Stromstärke von 100mA und einer Spannung von 200V liefen die Banden etwa 15min, danach war etwa die halbe Laufstrecke erreicht.

Anschließend wurde das Gel aus der Gelkammer entnommen und die DNA – Fragmente unter UV – Licht (254 nm) sichtbar gemacht. Das Ergebnis wurde mittels einer Polaroidkamera fotografiert.

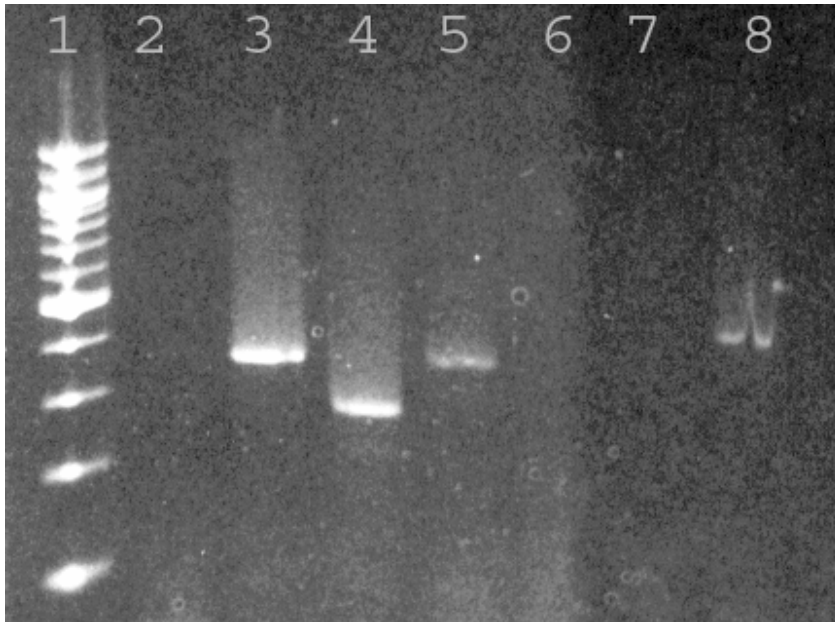


Abbildung 2: Beispiel für eine Polaroidaufnahme eines Gels mit unter UV-Licht sichtbaren Banden der Candida-Spezies

Spur 1: Marker

Spur 2: Negativkontrolle

Spur 3: Positivkontrolle Lerch 1 (Candida albicans) 330bp

Spur 4: Positivkontrolle Lerch 2 (Candida glabrata) 290bp

Spur 5-8: Proben

In diesem Bild sind die Proben der Spuren 5 und 8 auf Candida albicans positiv.

2.2.6 ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay)

Allgemein

Diese Methode dient der quantitativen Bestimmung von Antikörpern oder Antigenen. Man unterscheidet zwei Systeme, das Competitive-ELISA und das Sandwich-ELISA.

Bei Ersterem wird das für den Antikörper spezifische Antigen an die Mikrotiterplatte gebunden und der zu bestimmende Antikörper bindet daran. An den Antikörper bindet ein weiterer enzymgekoppelter

Antikörper (Konjugat). Durch Zugabe eines Chromogensubstrats erfolgt eine Farbreaktion mit dem Enzym (alkalische Phosphatase oder Streptavidinperoxidase), welche photometrisch ausgewertet werden kann.

Bei Letzterem wird der für das zu bestimmende Antigen spezifische Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden und das Antigen bindet daran. Der restliche Ablauf entspricht dem Competitive-ELISA.

Competitive-ELISA: Gesamt-IgE, Candida-IgE, Cys-LT, PGE₂

Sandwich-ELISA: IL-4, IL-10, IL-12

Zur Bestimmung der jeweiligen Zytokinkonzentration wurden die nach Aufbereitung gewonnen Überstände der Vaginalabstriche verwendet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
B	S2	S2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
C	S3	S3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
D	B	B	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
E			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
F			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
G			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
H			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Abb. 3: Beispiel für eine Mikrotiterplatte mit 96 Wells, S=Standard, x=Proben, B=Blank(Nullwert)

2.2.6.1 Gesamt-IgE und Candida-IgE

Protokoll Gesamt – IgE

Alle Reagenzien und Material, außer Wasser, Geräten und Pipetten, entstammten dem Kit.

Zunächst wurden alle Reagenzien auf RT gebracht und der 15x Waschpuffer 1:15 mit gereinigtem Wasser verdünnt.

Anschließend wurden die Standards und die Proben in die Mikrotiterplatten pipettiert.

In die ersten zwei Reihen der Mikrotiterplatte wurden nach Durchmischen auf dem Schüttler je 10µl der Standards gegeben. Die Standards mussten nicht verdünnt werden und hatten drei unterschiedliche Konzentrationen:

- High (400U/ml)
- Medium (200U/ml)
- Low (100U/ml)

In die restlichen 10 Reihen wurden nach Durchmischen auf dem Schüttler je 10µl der Proben pipettiert.

Mit Hilfe einer 8-fach Pipette wurden je 90µl der grünen Verdünnungslösung in die Wells pipettiert und die Mikrotiterplatte mit Mikrotiterstreifen abgedeckt.

Es erfolgte eine Inkubation bei RT für 2h.

Danach erfolgte ein viermaliger Waschschrift mit dem verdünnten Waschpuffer. Dazu wurden die Wells mit dem Waschpuffer gefüllt, ausgeschüttet und auf Zellstoff zum Abtrocknen ausgeklopft.

Nach Zugabe von je 100µl des Enzymkonjugats in alle Wells erfolgte eine weitere Inkubation für 2h bei RT.

Es erfolgte ein weiterer viermaliger Waschschrift.

Nun wurden je 100µl des Chromogensubstrats dazugegeben und weitere 30min bei RT inkubiert. Die Lösungen verfärbten sich unterschiedlich stark gelb.

Abschließend wurden je 100µl der Stopplösung dazupipettiert und die Proben photometrisch bei 450nm mit Referenzwellenlänge 492nm ausgewertet.

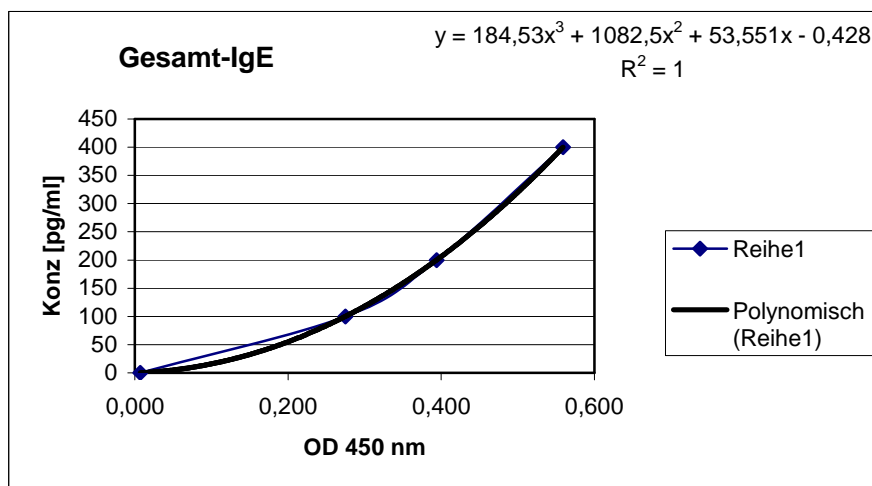


Abbildung 4: Beispiel für eine Standardkurve von Gesamt-IgE

Anhand der drei verwendeten Standardlösungen mit bekannter Konzentration, wurde mit Hilfe des Programms Excel eine Standardkurve angefertigt und anhand der daraus erhaltenen Regressionsgleichung die Probenkonzentration berechnet.

Abweichungen bei Candida – IgE

Dieses Kit enthielt keine Standards, sodass die photometrisch erhaltenen Ergebnisse direkt für die Auswertung verwendet wurden.

Es wurden je 100µl Probenlösung in die Wells pipettiert und ohne Zugabe einer Verdünnungslösung 2h inkubiert.

Die Waschschritte erfolgten je fünfmalig.

Bei diesem Assay wurden keine Standardlösungen mit bekannter Konzentration verwendet, die erhaltenen Werte werden daher als optische Dichte (OD) angezeigt und laute Assay-Protokoll in unterschiedliche Klassen eingeteilt:

OD	Klasse
0,000 – 0,250	Negativ
0,251 – 0,350	1
0,351 – 0,450	2
0,451 – 0,550	3
> 0,550	4

Tabelle 6: Einteilung der Messergebnisse bei Candida-IgE in Klassen

2.2.6.2 PGE₂ und Cys-LT

Protokoll PGE₂

Alle Reagenzien und Material, außer Wasser, Geräten und Pipetten, entstammten dem Kit.

Zunächst wurden alle Reagenzien auf RT gebracht, der Waschpuffer 1:20 mit gereinigtem Wasser verdünnt und der Assay – Puffer 1:10 mit gereinigtem Wasser verdünnt.

Anschließend wurde aus der Standardlösung (50.000pg/ml) eine Verdünnungsreihe hergestellt. In die sieben beschrifteten Eppendorfgefäße wurde der verdünnte Assay – Puffer vorgelegt, in das erste Gefäß wurden 1000µl pipettiert, in die anderen sechs Gefäße je 500µl. Aus dem ersten Gefäß wurden 50µl wieder entnommen und 50µl des Standards dazugegeben. Nach Durchmischen auf dem Schüttler wurden

500µl aus Gefäß 1 entnommen und in Gefäß 2 pipettiert, so wurde bis Gefäß 7 weiterverfahren.

Daraus entstanden folgende Standardkonzentrationen:

2500pg/ml, 1250pg/ml, 625pg/ml, 313pg/ml, 156pg/ml, 78,1pg/ml, 39,1pg/ml

Zusätzlich zu der Standardverdünnungsreihe gab es noch den B₀ – Wert mit 0pg/ml Standard (nur verdünnter Assay - Puffer) und einen Blank – Wert (Nullwert).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	S3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
B	Blank	S3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
C	Bo	S4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
D	Bo	S4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
E	S1	S5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
F	S1	S6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
G	S2	S7	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
H	S2	S7	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Abb. 5: Schema der Befüllung einer Mikrotiterplatte, S=Standard, x=Proben

In die Bo-, Standard- und Probenwells wurden je 100µl Lösung pipettiert. Dazu kamen je 50µl des blauen Konjugats und je 50µl des gelben Antikörpers, woraufhin die Lösungen grün wurden. Die Blank – Wells blieben leer.

Auf einem Plattenschüttler (500rpm) wurden die mit Klebestreifen abgedeckten Platten 2h bei RT inkubiert.

Es erfolgte ein dreimaliger Waschschrift.

In alle Wells wurden je 200µl des pNpp – Substrates pipettiert und weitere 45min bei RT inkubiert.

Anschließend wurden je 50µl der Stopplösung in alle Wells dazugegeben und die Proben photometrisch bei 405nm mit Referenzwellenlänge 562nm ausgewertet.

Es handelte sich hierbei um ein so genanntes Verdrängungsassay, d.h. je höher die photometrisch ausgelesenen OD-Werte waren, desto niedriger war die Konzentration an PGE₂. Außerdem wurden die OD-Werte in Prozent an gebundenem Antikörper umgerechnet, z.B. entsprechen 100% gebundener Antikörper 0% Zytokin.

Abweichungen bei Cys - Leukotrienen

Mit dem Kit werden LTC₄, LTD₄, LTE₄ bestimmt.

Die Standardkonzentration betrug 25.000pg/ml. Bei der Verdünnungsreihe wurden sechs Standardverdünnungen hergestellt. In das erste Eppendorfgefäß wurden 900µl Assay – Puffer vorgelegt und 100µl Standardkonzentrat dazupipettiert. Die restlichen Verdünnungsschritte entsprechen obigem Protokoll.

Standardkonzentrationen:

2500pg/ml, 1250pg/ml, 625pg/ml, 313pg/ml, 156pg/ml, 78,1pg/ml

Nach Zugabe des pNpp – Substrates wurde 2h bei 37°C auf dem Wasserbad liegend inkubiert.

2.2.6.3 IL-4, IL-10 und IL-12

Protokoll IL-4

Alle Reagenzien und Material, außer Wasser, Geräten und Pipetten, entstammten dem Kit.

Alle Reagenzien wurden auf RT gebracht, der 25x Waschpuffer 1:25 mit gereinigtem Wasser verdünnt und 120µl des 100x HRP – Konzentrats mit 12ml der HRP – Verdünnungslösung versetzt.

Der Standard (10000pg/ml) wurde mit Standardverdünnungslösung gelöst und 10min bei RT stehen gelassen. Dann wurden 50µl Standard und 950µl Verdünnungslösung in ein Eppendorfgefäß überführt, das führte zu einer Konzentration von 500pg/ml. In sieben weitere Gefäße wurden je 300µl dieser Lösung vorgelegt und aus Gefäß 1 300µl entnommen und in Gefäß 2 pipettiert. So wurde bis Gefäß 7 verfahren, das letzte Gefäß enthielt nur Verdünnungslösung.

Erhaltene Standardkonzentrationen:

500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,2pg/ml, 15,6pg/ml, 7,8pg/ml, 0pg/ml

Zusätzlich zur Standardverdünnungsreihe gab es noch einen Blank-Wert (Nullwert) und einen Chromogen-Blank-Wert.

Nun wurden die Wells der Mikrotiterplatte befüllt. In zwei Blank-Wells wurden je 100µl Standardverdünnungslösung pipettiert, dann je 100µl der verdünnten Standards und der Proben in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert.

In alle Wells, bis auf die Chromogen-Blanks, wurden noch je 50µl des Konjugats dazugegeben und für 2h bei RT inkubiert.

Es erfolgte ein viermaliger Waschschrift.

Danach wurden in alle Wells, außer den Chromogen-Blanks, je 100µl HRP-Lösung pipettiert und weitere 30min bei RT inkubiert.

Es erfolgte ein viermaliger Waschschrift.

Nun wurden je 100µl des Chromogens gegeben und für weitere 30min bei RT im Dunkeln (Schublade und Alufolie) inkubiert. Die Lösungen verfärbten sich unterschiedlich stark blau.

Nach Zugabe von je 100µl der Stopplösung konnten die Ergebnisse photometrisch bei 450nm mit Referenzwellenlänge 492nm ausgewertet werden. Anhand der verwendeten Standardlösungen mit bekannter Konzentration, wurde mit Hilfe des Programms Excel eine Standardkurve (s. Abbildung 4) angefertigt und anhand der daraus erhaltenen Regressionsgleichung die Probenkonzentration berechnet.

Diese Auswertung trifft auch auf IL-10 und IL-12 zu.

Abweichungen bei IL-10

Die Standardkonzentration betrug 5000pg/ml.

Es wurden 50µl Standard mit 450µl Standardverdünnungslösung versetzt. Die Verdünnungsschritte wurden mit je 200µl aus dem vorherigen Eppendorfgefäß und je 200µl Verdünnungslösung hergestellt.

Erhaltene Standardkonzentrationen:

500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,2pg/ml, 15,6pg/ml, 7,8pg/ml, 0pg/ml

In die Blank- und Standard-Wells wurden je 50µl Verdünnungslösung pipettiert. Danach wurden je 50µl der Standardverdünnungen dazugegeben. Die Proben-Wells wurden mit je 50µl Probenlösung und je 50µl Inkubierungspuffer versetzt.

Vor der Zugabe von je 100µl Konjugat wurde bereits 2h bei RT inkubiert und es erfolgte schon ein Waschschrift.

Abweichungen bei IL-12

Die Standardkonzentration betrug 5000pg/ml.

Es wurden 100µl Standard mit 900µl Standardverdünnungslösung versetzt.

Die Verdünnungsschritte entsprachen denen bei IL-10.

In die Blank-Wells wurden je 50µl Verdünnungslösung pipettiert, in die Standard- und Proben-Wells ebenfalls je 50µl.

Es wurden je 100µl des Konjugats dazugegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Statistische Berechnungen

Die Auswertung wurde mit den Programmen Excel und SPSS gemacht.

Die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde bei den Zytokinen je nach Gruppe mit den jeweils gültigen statistischen Tests durchgeführt:

- Vergleich Gruppe Diflucan Anfang/6 Wochen/3 Monate mit Kontrolle und Cipro/Nys mit Kontrolle
Mann-Whitney-U-Test
- Vergleich Gruppe Diflucan Anfang/ 6 Wochen/ 3 Monate
Kruskal-Wallis-Test
- Vergleich Probe1 und Probe 2 der gleichen Patientinnen in zeitlichem Abstand bei Diflucan-Einnahme
Wilcoxon-Test

Ein statistische Signifikanz besteht bei einem p -Wert $<0,05$.

Die Diagramme veranschaulichen bei Reinheitsgrad, Kultur und PCR die Häufigkeiten und bei den Zytokinen die Medianwerte der einzelnen Parameter.

3.2 Auswahlkriterien und Datenerfassung der Probandinnen

Alle Probandinnen wurden in der gynäkologisch-mikrobiologischen Sprechstunde von Professor Weissenbacher, Frauenklinik, Klinikum Großhadern, ausgewählt.

Auswahlkriterien waren die klinische Diagnose CRVVC und die Behandlung mit dem Antimykotikum Fluconazol (Diflucan®, 200mg, Firma Pfizer).

Die Probandinnen kamen entweder neu in Behandlung oder waren dies bereits.

Die Probandinnen der Kontrollgruppe wurden in der allgemeinen Sprechstunde von Professor Weissenbacher, Frauenklinik, Klinikum Großhadern, ausgewählt. Sie kamen zur Krebsvorsorge und hatten keine Beschwerden.

Als Daten wurden Alter, Krankheiten, die Einnahme von oralen Kontrazeptiva, Hormonersatztherapie, Allergien und Nikotinabusus erfasst. Ferner wurden die Patientinnen befragt, seit wann sie eine CRVVC hatten und welche therapeutischen Maßnahmen im Vorfeld ergriffen wurden.

Als mögliche prädisponierende Faktoren hatten nur 1% der Patientinnen Diabetes mellitus, 40% nahmen orale Kontrazeptiva und 4% nahmen Hormonersatzpräparate.

34% der Patientinnen hatten Allergien, vor allem Heuschnupfen und Kontaktallergien.

Die untersuchten Frauen gaben an, seit mindestens 1 Jahr und maximal 20 Jahren mit einer CRVVC zu tun zu haben. Alle gaben an, dass die Anwendung von lokal wirksamen Antimykotika sowie die kurzfristige Einnahme von Fluconazol keinen bleibenden Erfolg hatte.

Das durchschnittliche Alter in der CRVVC-Gruppe war 38 (17 bis 84 Jahre), in der Kontrollgruppe 46 (31 bis 79 Jahre) und in der Cipro/Nys-Gruppe 36 (24 bis 80 Jahre).

Ziel war es, von allen Patientinnen der CRVVC-Gruppe zwei Proben in zeitlichem Abstand zu nehmen, davon eine vor und eine während Behandlung. Da die Patientinnen jedoch zum Teil nur einmal während der Zeit der Probensammlung angetroffen wurden oder unterschiedliche Abstände zwischen den Terminen in der Sprechstunde lagen, wurde folgende Gruppeneinteilung vorgenommen:

Gruppe Diflucan Anfang (dif_anf = vor Fluconazol-Einnahme)	n = 74
Gruppe Diflucan 6 Wochen (dif_6wo = 6-wöchige Fluconazol-Einnahme)	n = 30
Gruppe Diflucan 3 Monate (dif_3mo = mind. 3-monatige Fluconazol-Einnahme)	n = 72
Gruppe Behandlungsverlauf (Probe1, Probe2 = zwei Proben der gleichen Patientinnen vor und während Fluconazol-Einnahme)	n = 50
Gruppe Cipro/Nys (Beginn der Anwendung von Ciprofloxacin/Nystatin-Ovula)	n = 12
Kontrollgruppe	n = 40

Tabelle 7: Gruppeneinteilung der Patientinnengruppen und Kontrollgruppe

Das Behandlungsschema laut Professor Weissenbacher war:

- 2x wöchentlich Diflucan® für 6 Wochen
- 1x wöchentlich Diflucan® für mindestens 3 weitere Monate

Zum Teil bekamen die CRVVC-Patientinnen auf Grund eines gleichzeitigen Bakterienbefalls der Scheide Ovula mit Ciprofloxacin/Nystatin statt Diflucan verordnet.

Zusammensetzung der Vaginalovula(14 Stück):

Ciprofloxacin 150mg

Nystatin 100.000 IE

3.3 Reinheitsgrad

Der Reinheitsgrad der Scheide wird nach Richter und Weissenbacher unterteilt in:

- RHG 0
Nur Epithelzellen, kaum Mikroorganismen
- RHG 1
Zahlreiche Döderleinstäbchen, keine Bakterien
- RHG 2
Wenig Döderleinstäbchen, überwiegend Bakterien, Leukozyten
- RHG 3
Keine Döderleinstäbchen, massenhaft Bakterien und Leukozyten

Hierbei steht ein RHG 1 für eine gesunde Vaginalflora und ein RHG 3 für eine abnormale Vaginalflora.

Gruppe	n	n _{fehlend}	Reinheitsgrad (%) (Anzahl n)			
			0	1	2	3
Diflucan Anfang	30	44	0	20,3(15)	12,2(9)	8,1(6)
Diflucan 6 Wochen	12	18	3,3(1)	26,7(8)	6,7(2)	3,3(1)
Diflucan 3 Monate	30	42	0	29,2(21)	6,9(5)	5,6(3)
Diflucan Probe 1	22	28	0	26,0(13)	10,0(5)	8,0(4)
Diflucan Probe 2	22	28	2,0(1)	34,0(17)	6,0(3)	2,0(1)
Cipro/Nystatin	7	5	0	33,3(4)	0	25,0(3)

Tabelle 8: Anzahl, Anzahl fehlend(n_{fehlend}) und Häufigkeit der Reinheitsgrade in den einzelnen Gruppen

Bei der Kontrollgruppe wurde kein RHG untersucht.

Pilze wurden mikroskopisch während der Sprechstunde bei keiner Patientin entdeckt.

Die folgenden Diagramme und deren Beschreibung dienen der Veranschaulichung der Ergebnisse aus Tabelle 8. Die prozentuale Verteilung der Reinheitsgrade in den einzelnen Gruppen sind in den Balkendiagrammen nochmals angegeben.

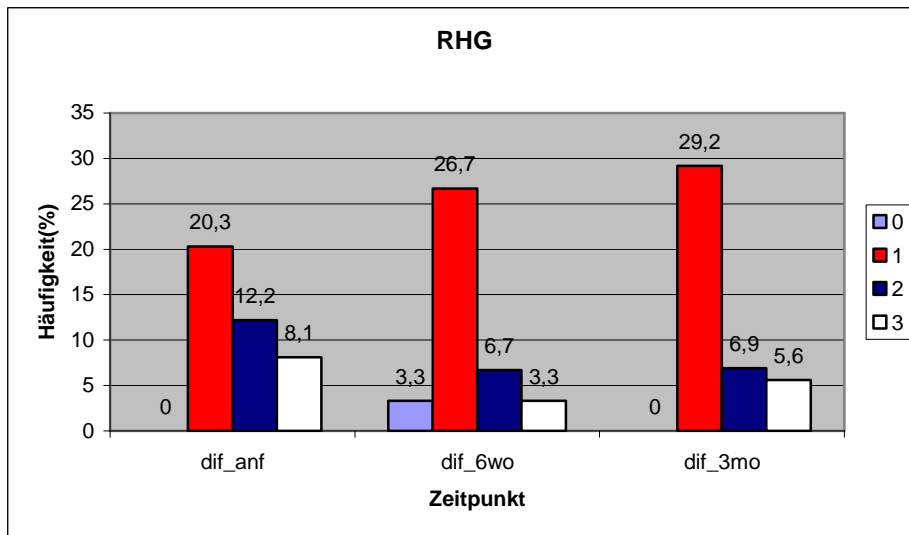


Abbildung 6: Häufigkeit der Reinheitsgrade bei Patientinnengruppen

Der RHG 1 tritt zu allen Behandlungszeitpunkten am häufigsten auf steigt mit zunehmender Behandlungsdauer an. Die RHG's 2 und 3 sind weniger häufig vertreten und sinken mit zunehmender Behandlungsdauer ab. In der Gruppe mit 6-wöchiger Behandlung tritt auch der RHG 0 auf.

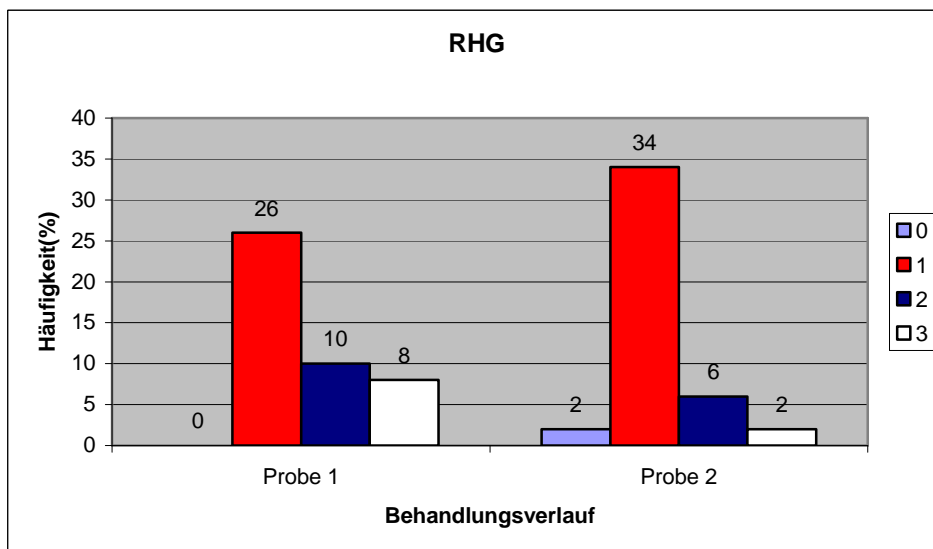


Abbildung 7: Häufigkeit der Reinheitsgrade beim Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen

Bei den Patientinnen, von denen zwei Proben vor und während der Therapie mit Fluconazol genommen wurden, überwiegt der RHG 1 deutlich, der RHG 2 und 3 sind leicht abnehmend, bei der zweiten Probe (während Behandlung) tritt auch der RHG 0 auf.

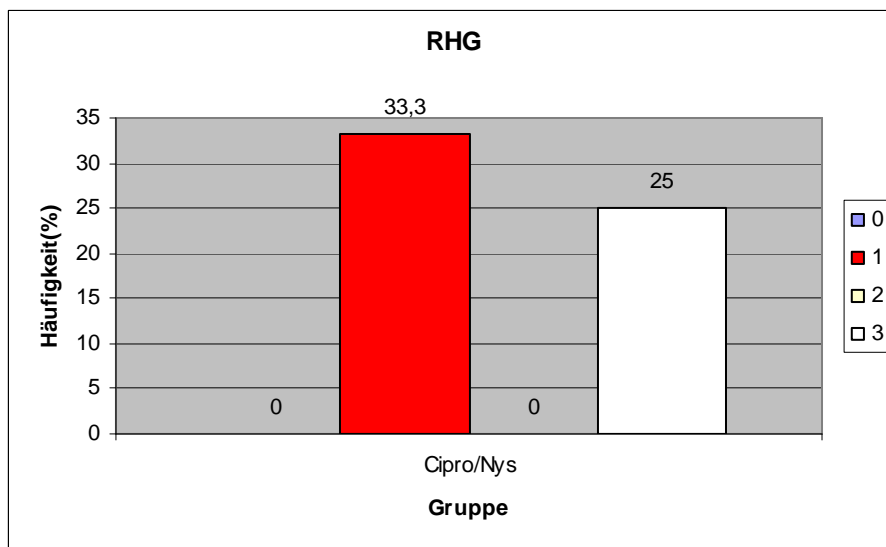


Abbildung 8: Häufigkeit der Reinheitsgrade bei Cipro/Nys-Gruppe

In der Ciprofloxacin/Nystatin-Gruppe treten nur die RHG´s 1 und 3 auf.

3.4 Candida-Kultur

Eine kulturelle Anzüchtung wurde mit allen Patientinnen- und der Kontrollgruppe vorgenommen.

Mit der Gruppe Dif_gesamt wurden die Gruppen Diflucan Anfang, -6 Wochen und -3 Monate zusammengefasst, um eine prozentuale Verteilung des Kulturnachweises bezogen auf alle Gruppen darzustellen und mit der PCR zu vergleichen.

Gruppe	n	n fehlend	Kultur(%) (Anzahl n)		Candida-Art(%)(Anzahl n)			
			Pos	Neg	C.alb.	C.glab.	S.cerev.	C.paraps.
Diflucan Anfang	49	25	20,3(15)	45,9(34)	17,6(13)	0	2,7(2)	0
Diflucan 6 Wochen	29	1	0	96,7(29)	0	0	0	0
Diflucan 3 Monate	72	0	2,8(2)	97,2(70)	0	1,4(1)	1,4(1)	0
Dif_ges (obige drei Gruppen)	150	26	11,3(17)	88,6(133)	76,2	6,1	17,8	0
Diflucan Probe 1	25	25	14,0(7)	36(18)	14,0(7)	0	0	0
Diflucan Probe 2	50	0	0	100(50)	0	0	0	0
Cipro/Nys	12	0	33,3(4)	66,7(8)	25,0(3)	0	0	8,3(1)
Kontrolle	40	0	0	100(40)	0	0	0	0

Tabelle 9: Anzahl(n), Anzahl fehlend(n_{fehlend}) und Häufigkeit der Pos/Neg-Kulturnachweise und Candida-Art in den einzelnen Gruppen

Die folgenden Diagramme und deren Beschreibung dienen der Veranschaulichung der Ergebnisse aus Tabelle 9. Die Prozentangaben der Kulturergebnisse bzw. der Candida-Spezies in den einzelnen Gruppen sind in den Balkendiagrammen nochmals angegeben.

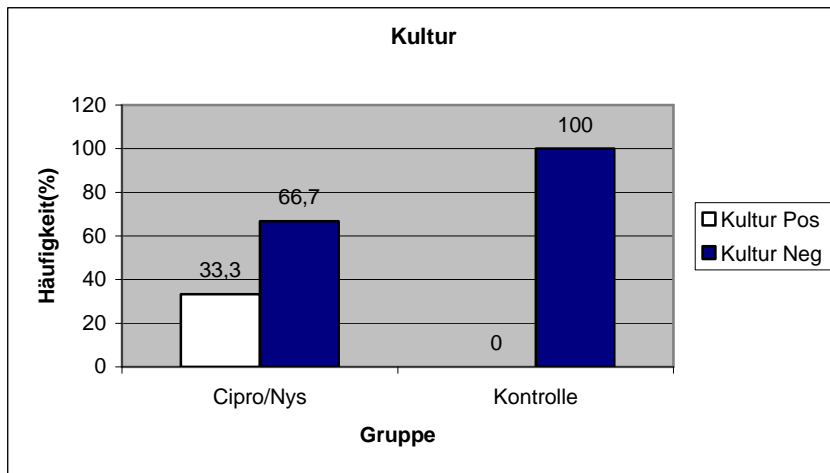


Abbildung 9: Häufigkeit der Pos/Neg-Kulturen bei der Cipro/Nys-Gruppe

Die Kontrollgruppe war zu 100% negativ. In der Ciprofloxacin/Nystatin-Gruppe waren 2/3 der Patientinnen in der Kultur negativ und 1/3 positiv.

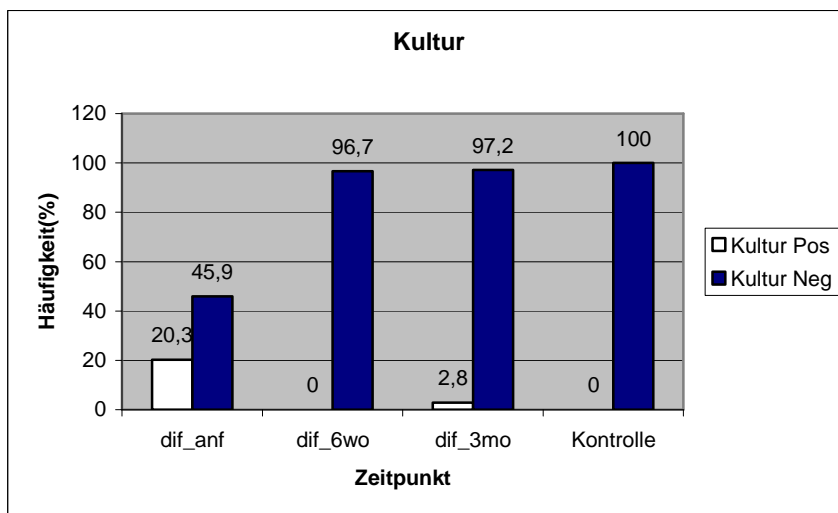


Abbildung 10: Häufigkeit der Pos/Neg-Kulturen bei den Patientinnengruppen

Die Zahl der Kultur-positiven nahm bei der Gruppe mit 6 Wochen-Behandlung bis fast auf Null ab, während die Zahl der Kultur-negativen dort deutlich zunahm und auch in der Gruppe mit 3-monatiger Behandlung bei fast 100% negativ blieb.

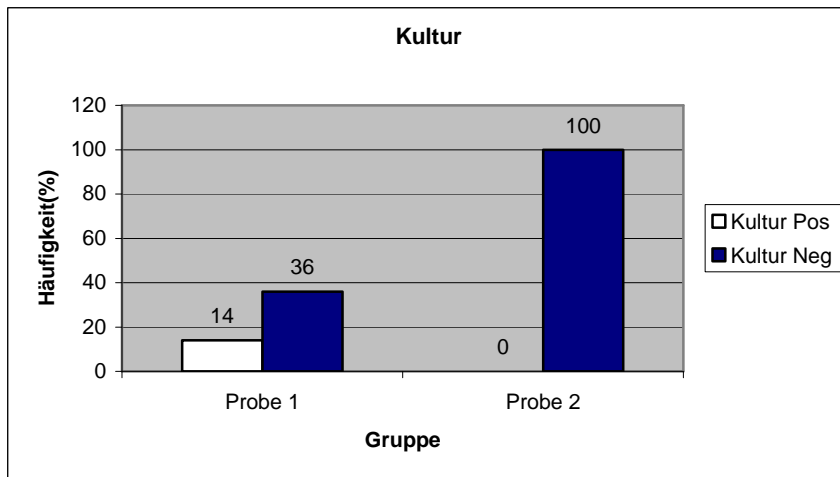


Abbildung 11: Häufigkeit der Pos/Neg-Kulturen beim Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen

In obigem Diagramm wurde der Behandlungsverlauf bei den gleichen Patientinnen dargestellt. Vor der Behandlung mit Fluconazol (Probe 1) waren 14% der Patientinnen Kultur-positiv und 36% Kultur-negativ, während der Behandlung mit Fluconazol (Probe 2) waren 100% der Patientinnen Kultur-negativ.

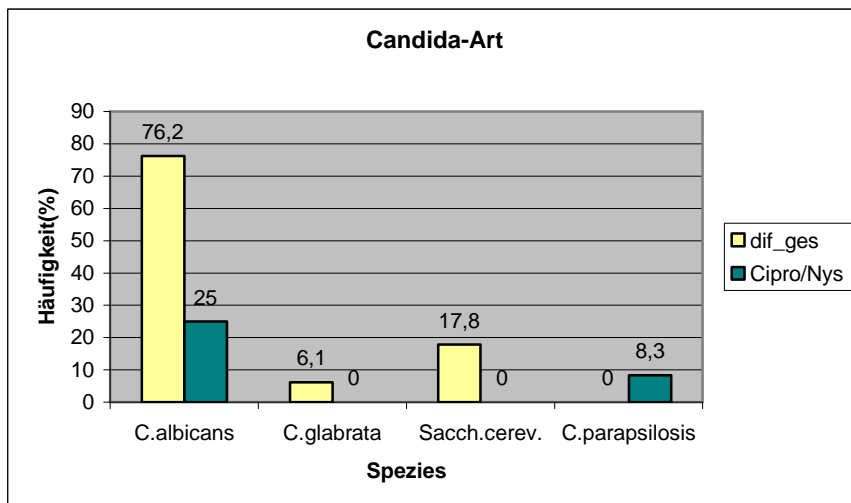


Abbildung 12: Häufigkeit der einzelnen Candida-Spezies

Candida albicans ist die mit 76,2% am häufigsten vorkommende Spezies, die eine Pilzinfektion der Vagina verursacht, nur zu 6,1% ist Candida glabrata der Verursacher.

In 17,8% der Fälle wurde *Saccharomyces cerevisiae* in der Kultur nachgewiesen. Der Nachweis von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte durch Einsenden einer Probe an das mikrobiologische Labor der Klinik und wurde dort mittels kultureller Anzucht nachgewiesen.

Eine Besiedelung der Vagina mit *S.cerevisiae* ist saprophytär und meist apathogen, jedoch kann es auch zu den Symptomen einer Pilzinfektion kommen.

In der Ciprofloxacin/Nystatin-Gruppe war auch *Candida albicans* (25%) neben *Candida parapsilosis* (8,3%) der Hauptverursacher.

3.5 Candida-PCR

Um zu überprüfen, ob eine Kolonisation mit *Candida* in Mengen vorliegt, die für eine kulturelle Anzucht zu niedrig sind, wurden alle Patientinnen- und die Kontrollgruppe mittels PCR untersucht.

Mit der Gruppe Dif_gesamt wurden die Gruppen Diflucan Anfang, 6 Wochen- und 3 Monate Behandlung zusammengefasst, um eine prozentuale Verteilung des PCR-Nachweises bezogen auf alle Gruppen darzustellen und mit dem Kulturnachweis zu vergleichen.

Gruppe	n	n fehlend	PCR(%)(Anzahl n)		Candida-Art(%)(Anzahl n)	
			Pos	Neg	C.albicans	C.alb+C.glab
Diflucan Anfang	72	2	36,5(27)	60,8(45)	36,5(27)	0
Diflucan 6 Wochen	30	0	36,7(11)	63,3(19)	33,3(10)	3,3(1)
Diflucan 3 Monate	72	0	26,4(19)	72,2(52)	23,6(17)	2,8(2)
Dif_gesamt (obige drei Gruppen)	174	2	32,8(57)	66,7(116)	31,0	1,7
Diflucan Probe 1	50	0	34,0(17)	66,0(33)	34,0(17)	0
Diflucan Probe 2	50	0	30,0(15)	70,0(35)	30,0(15)	0
Cipro/Nystatin	11	1	41,7(5)	50(6)	41,7(5)	0
Kontrolle	40	0	0	100(40)	0	0

Tabelle 10: Anzahl, Anzahl fehlend(n_{fehlend}) und Häufigkeit der PCR-Nachweise und Candida-Art in den einzelnen Gruppen

Die folgenden Diagramme und deren Beschreibung dienen der Veranschaulichung der Ergebnisse aus Tabelle 10. Die Prozentangaben der PCR-Ergebnisse in den einzelnen Gruppen sind in den Balkendiagrammen nochmals angegeben.

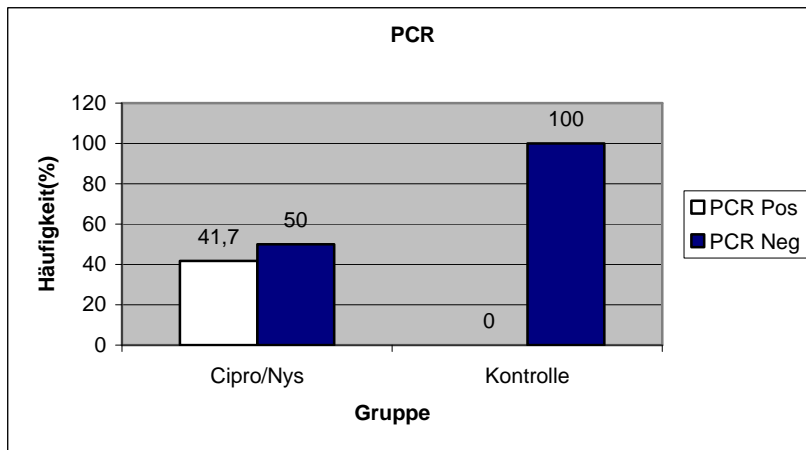


Abbildung 13: Häufigkeit der PCR-Positiven/Negativen bei der Cipro/Nys-Gruppe

Die Kontrollgruppe ist zu 100% negativ. In der Ciprofloxacin/Nystatin-Gruppe ist die Verteilung Positiv/Negativ etwa gleich, jedoch ist die Gruppe auch sehr klein.

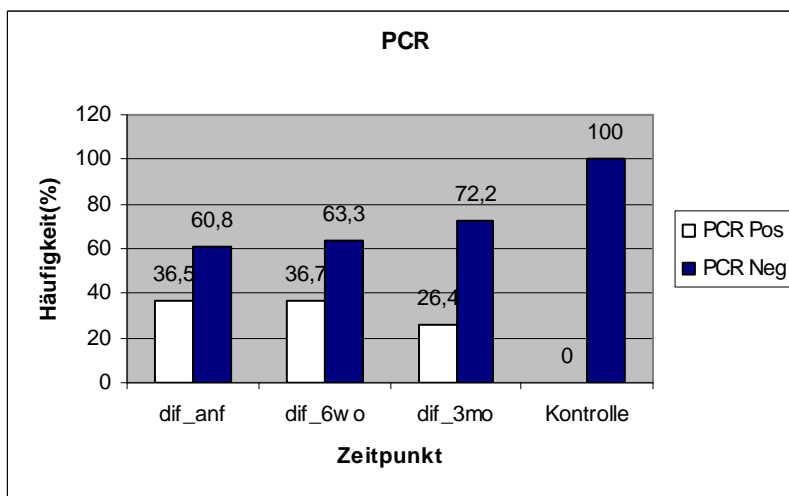


Abbildung 14: Häufigkeit der PCR-Positiven/Negativen bei den Patientinnengruppen

Vor Fluconazol-Einnahme sind nach PCR-Nachweis 36,5% der Patientinnen Candida-positiv und 60,8% Candida-negativ. In der Gruppe mit 3-monatiger Behandlung sind 26,4% Candida-positiv und 72,2% Candida-negativ.

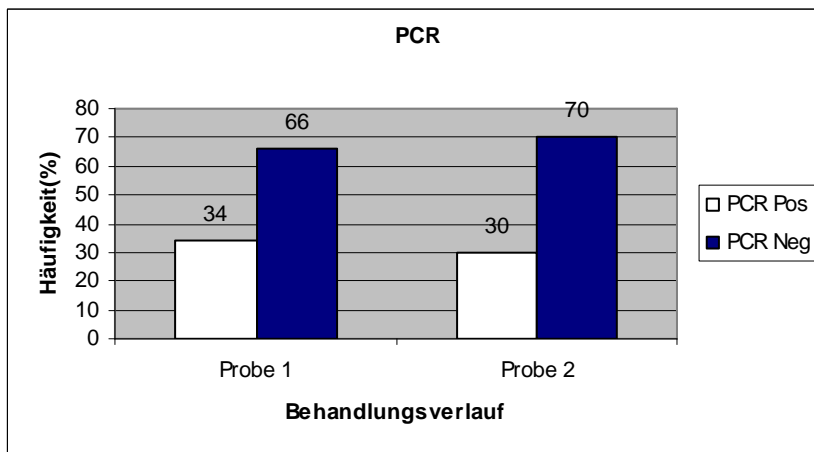


Abbildung 15: Häufigkeit der PCR-Positiven/Negativen beim Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen

Obige Ergebnisse wurden auch für den Behandlungsverlauf von den gleichen Patientinnen bestätigt.

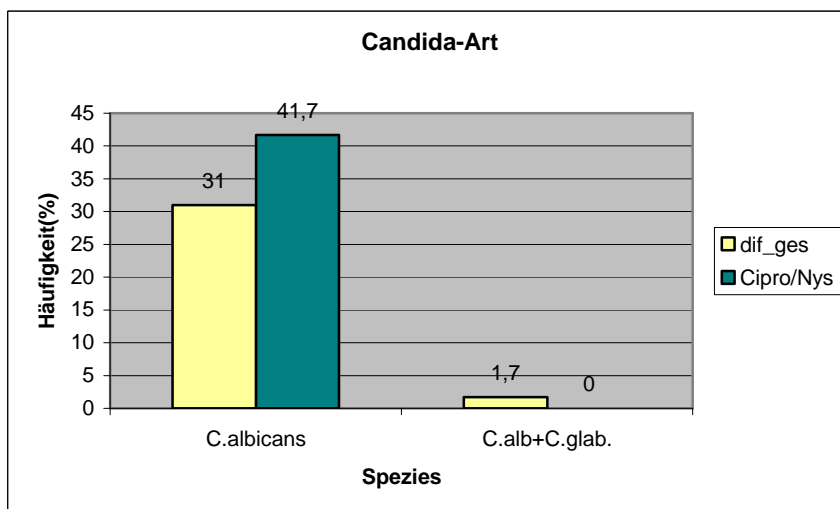


Abbildung 16: Häufigkeit der einzelnen Candida-Spezies durch PCR-Nachweis

Candida albicans ist der Hauptverursacher eine vaginalen Pilzinfektion. Selten liegt eine Besiedelung mit C. albicans und C. glabrata vor. Das Vorkommen von Saccharomyces cerevisiae und C. parapsilosis konnte mittels PCR nicht untersucht werden, da keine Positivproben der beiden Spezies als Vergleich vorlagen.

Nachfolgend werden die Nachweismethoden kulturelle Anzüchtung und PCR miteinander verglichen.

Nachweis	Pos(%(Anzahl n))	Neg(%(Anzahl n))
Kultur	11,3(57)	88,6(17)
PCR	32,8(116)	66,7(133)

Tabelle 11: Vergleich der Methoden PCR und Kultur der Gruppe Dif_gesamt

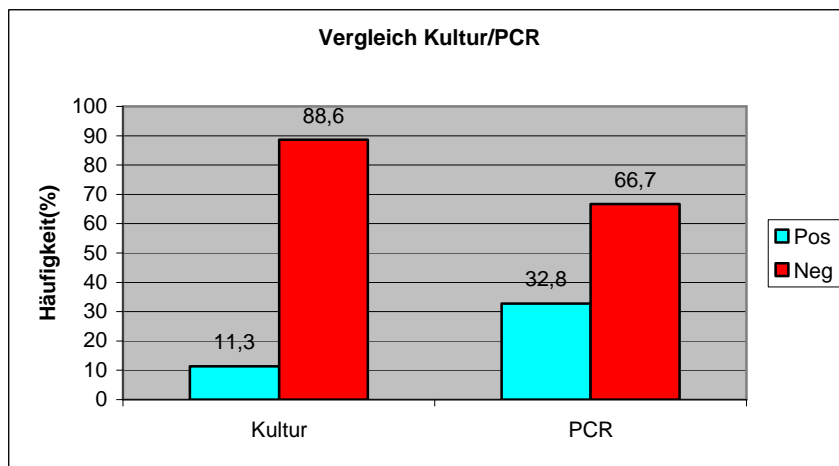


Abbildung 17: Vergleich der Häufigkeiten der Pos/Neg-Ergebnisse bei den Methoden Kultur und PCR

Aus obiger Graphik wird deutlich, dass mit Hilfe der PCR 21,5% mehr Patientinnen mit einer positiven Candida-Besiedelung nachgewiesen werden konnten. Die PCR ist daher eine genauere Nachweismethode als die kulturelle Anzüchtung, da hierbei auch kleine Mengen an Pilz-DNA nachgewiesen werden können.

Es wird aber auch deutlich, dass der Großteil der Patientinnen, die mit der Diagnose CRVVC in die Sprechstunde kommen, keine nachweisbare Pilzinfektion hat.

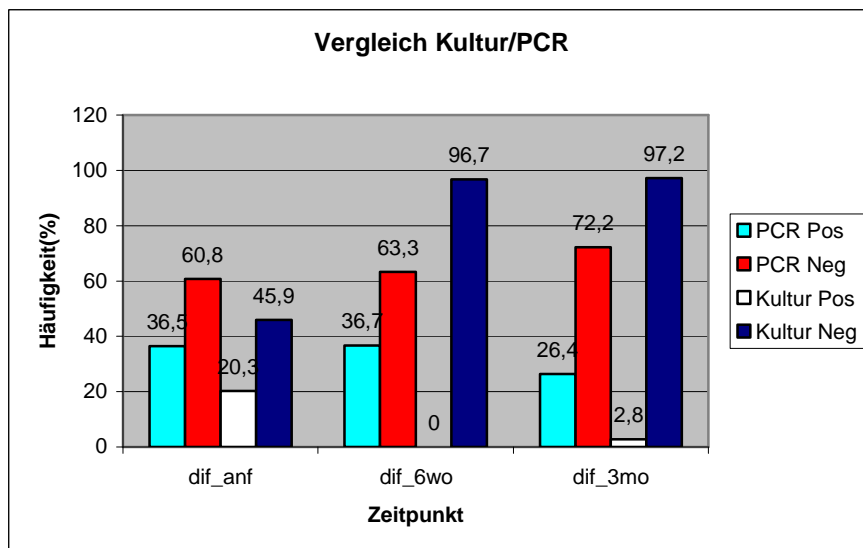


Abbildung 18: Vergleich der Häufigkeiten der Kultur/PCR-Positiven und –Negativen in den einzelnen Patientinnengruppen

Mit obigem Diagramm soll nochmals verdeutlicht werden, dass eine kulturelle Anzüchtung schon bei der Gruppe mit 6 Wochen Behandlung sowie auch der mit 3 Monaten Behandlung deutlich gesenkt wird. Dagegen sind in den Gruppen vor Behandlung (36,5%) und 6 Wochen Behandlung (36,7%) etwa gleich viele Patientinnen PCR-positiv, in der Gruppe mit 3 Monaten Behandlung sinkt die Zahl auf 26,4% ab.

3.6 Gesamt-IgE

Gruppe	n	n_{fehlend}	Median (pg/ml)	Max (pg/ml)	Min (pg/ml)	p-Wert
Diflucan Anfang	62	12	0,15	17,10	0,0	0,707 ¹
Diflucan 6 Wochen	28	2	0,20	6,50	0,0	
Diflucan 3 Monate	59	13	0,10	6,0	0,0	
Diflucan Probe 1	42	8	0,10	17,10	0,0	0,848 ²
Diflucan Probe 2	42	8	0,0	6,50	0,0	

Tabelle 12: Median/Max/Min der Konzentration an Gesamt-IgE in den einzelnen Gruppen, ¹=Kruskal-Wallis-Test, ²=Wilcoxon-Test; n=Anzahl; n_{fehlend}= Anzahl fehlend

Gruppe	n	n_{fehlend}	Median (pg/ml)	Max (pg/ml)	Min (pg/ml)	p-Wert
Diflucan Anfang	62	12	0,15	17,10	0,0	0,031 ¹
Diflucan 6 Wochen	28	2	0,20	6,50	0,0	0,014
Diflucan 3 Monate	59	13	0,10	6,0	0,0	
Kontrolle	39	1	0,0	6,0	0,0	
Cipro/Nystatin	10	2	0,0	3,60	0,0	0,952 ¹
Kontrolle	39	1	0,0	6,0	0,0	

Tabelle 13: Median/Max/Min der Konzentration an Gesamt-IgE in den einzelnen Gruppen, ¹=Mann-Whitney-U-Test; n=Anzahl; n_{fehlend}= Anzahl fehlend

Die folgenden Diagramme und deren Beschreibung dienen der Veranschaulichung der Ergebnisse aus den Tabellen 12 und 13. Die medianen Konzentrationen an Gesamt-IgE in den einzelnen Gruppen sind in den Balkendiagrammen nochmals angegeben.

Zwischen der Cipro/Nys-Gruppe und der Kontrolle ist kein Unterschied des Gesamt-IgE zu sehen ($p=0,952$), daher wurde hier auf ein Diagramm verzichtet.

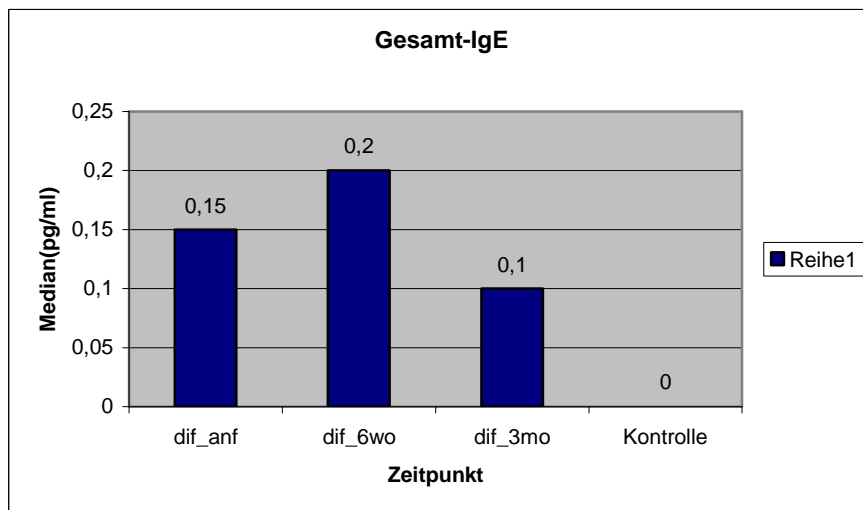


Abbildung 19: Vergleich der Konzentratione (Mediane) an Gesamt-IgE in den Patientinnengruppen und der Kontrollgruppe

Vor Behandlung und in der Gruppe mit 6 Wochen Behandlung ist die Konzentration an Gesamt-IgE gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht ($p=0,031$; $p=0,014$), in der Gruppe mit 3-monatiger Behandlung sinkt die Konzentration an Gesamt-IgE ab und ist nicht mehr signifikant erhöht ($p=0,087$).

Innerhalb der Patientinnen-Gruppen besteht zwischen den Zeitpunkten nach Einnahme von Fluconazol kein signifikanter Unterschied ($p=0,707$).

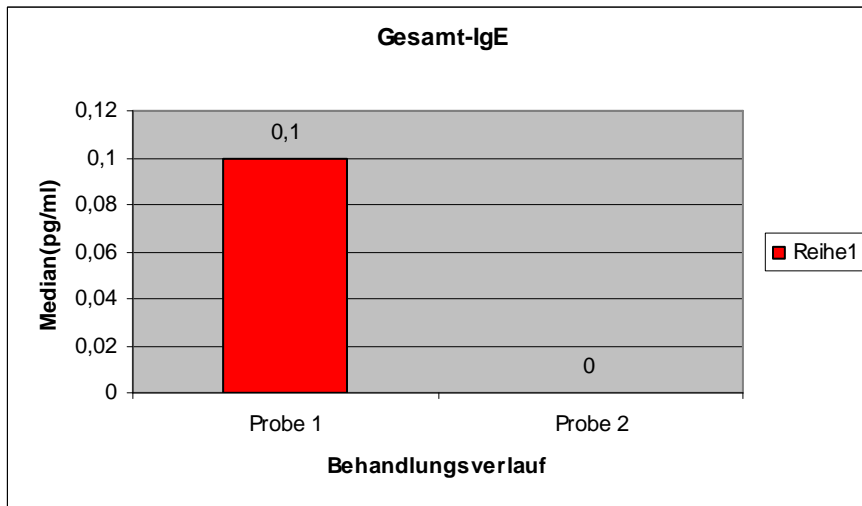


Abbildung 20: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an Gesamt-IgE im Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen

Auch der Behandlungsverlauf bei den gleichen Patientinnen zeigt das Absinken des Gesamt-IgE, das jedoch nicht signifikant ist ($p=0,848$).

3.7 Candida-IgE

Gruppe	n	n_{fehlend}	Median (OD)	Max (OD)	Min (OD)	p-Wert
Diflucan Anfang	67	7	0,054	0,165	0,019	0,647 ¹
Diflucan 6 Wochen	30	0	0,051	0,086	0,03	
Diflucan 3 Monate	65	7	0,054	0,110	0,032	
Diflucan Probe 1	45	5	0,054	0,165	0,019	0,350 ²
Diflucan Probe 2	45	5	0,057	0,102	0,03	

Tabelle 14: Median/Max/Min der Konzentration an Candida-IgE in den einzelnen Gruppen, ¹=Kruskal-Wallis-Test, ²=Wilcoxon-Test n=Anzahl; n_{fehlend}= Anzahl fehlend;

Gruppe	n	n_{fehlend}	Median (OD)	Max (OD)	Min (OD)	p-Wert
Diflucan Anfang	67	7	0,054	0,165	0,019	0,102 ¹
Diflucan 6 Wochen	30	0	0,051	0,086	0,03	0,572
Diflucan 3 Monate	65	7	0,054	0,110	0,032	
Kontrolle	40	0	0,049	0,107	0,033	0,044
Cipro/Nystatin	10	2	0,052	0,132	0,029	0,618 ¹
Kontrolle	40	0	0,049	0,107	0,033	

Tabelle 15: Median/Max/Min der Konzentration an Candida-IgE in den einzelnen Gruppen, ¹=Mann-Whitney-U-Test; n=Anzahl; n_{fehlend}= Anzahl fehlend

Die folgenden Diagramme und deren Beschreibung dienen der Veranschaulichung der Ergebnisse aus den Tabellen 14 und 15. Die medianen Konzentrationen an Candida-IgE in den einzelnen Gruppen sind in den Balkendiagrammen nochmals angegeben.

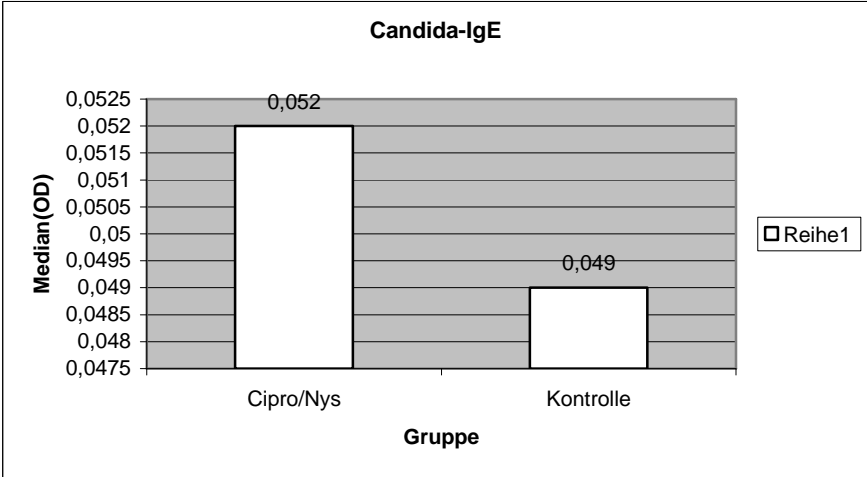


Abbildung 21: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an Candida-IgE in der Cipro/Nys-Gruppe und der Kontrollgruppe

Candida-IgE ist bei der Cipro/Nys-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erhöht, jedoch nicht signifikant ($p=0,618$).

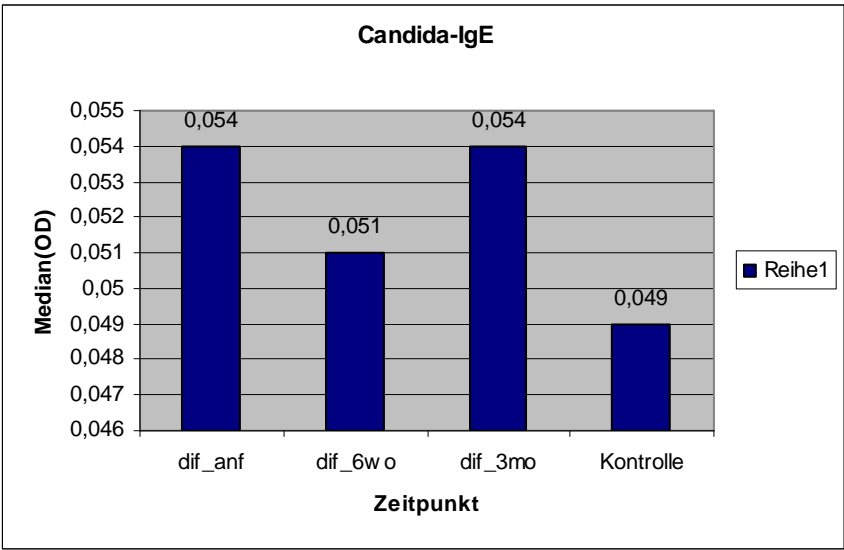


Abbildung 22: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an Candida-IgE in den Patientinnengruppen und der Kontrollgruppe

Candida-IgE ist gegenüber der Kontrollgruppe vor und während Behandlung leicht erhöht, eine Abnahme der Konzentration wie bei Gesamt-IgE ist hier jedoch nicht zu sehen.

Verglichen mit der Kontrollgruppe besteht nirgends ein signifikanter Unterschied der Konzentration von Candida-IgE ($p=0,102$; $p=0,572$), bis auf den Wert in der Gruppe mit 3-monatiger Behandlung, der signifikant erhöht ist ($p=0,044$).

Es besteht kein signifikanter Unterschied ($p=0,647$) zwischen Anfang, 6-wöchiger und 3-monatiger Einnahme von Fluconazol, noch bezogen auf den Behandlungsverlauf bei den gleichen Patientinnen zwischen den zwei Proben ($p=0,350$).

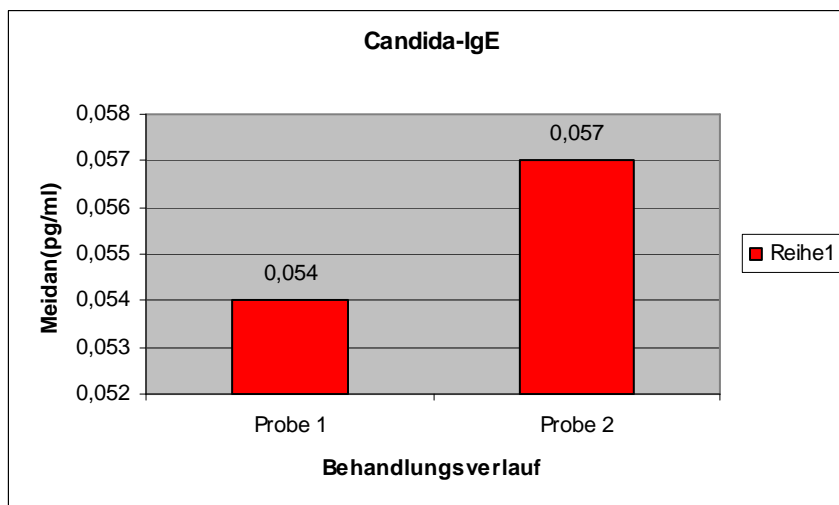


Abbildung 23: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an Candida-IgE im Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen

3.8 IL-4

Gruppe	n	n_{fehlend}	Median (pg/ml)	Max (pg/ml)	Min (pg/ml)	p-Wert
Diflucan Anfang	74	0	4,00	123,9	0,0	0,234 ¹
Diflucan 6 Wochen	30	0	3,25	15,3	0,0	
Diflucan 3 Monate	72	0	3,40	37,6	0,0	
Diflucan Probe 1	50	0	4,40	123,9	0,0	0,191 ²
Diflucan Probe 2	50	0	3,40	27,8	0,0	

Tabelle 16: Median/Max/Min der Konzentration an IL-4 in den einzelnen Gruppen, ¹=Kruskal-Wallis-Test, ²=Wilcoxon-Test; n=Anzahl; n_{fehlend}= Anzahl fehlend

Gruppe	n	n_{fehlend}	Median (pg/ml)	Max (pg/ml)	Min (pg/ml)	p-Wert
Diflucan Anfang	74	0	4,00	123,9	0,0	0,046 ¹
Diflucan 6 Wochen	30	0	3,25	15,3	0,0	0,626
Diflucan 3 Monate	72	0	3,40	37,6	0,0	
Kontrolle	40	0	3,50	14,1	0,0	
Cipro/Nystatin	12	0	3,30	7,0	0,30	0,761 ¹
Kontrolle	40	0	3,50	14,1	0,0	

Tabelle 17: Median/Max/Min der Konzentration an IL-4 in den einzelnen Gruppen, ¹=Mann-Whitney-U-Test; n=Anzahl; n_{fehlend}= Anzahl fehlend

Die folgenden Diagramme und deren Beschreibung dienen der Veranschaulichung der Ergebnisse aus den Tabellen 16 und 17. Die medianen Konzentrationen an IL-4 in den einzelnen Gruppen sind in den Balkendiagrammen nochmals angegeben.

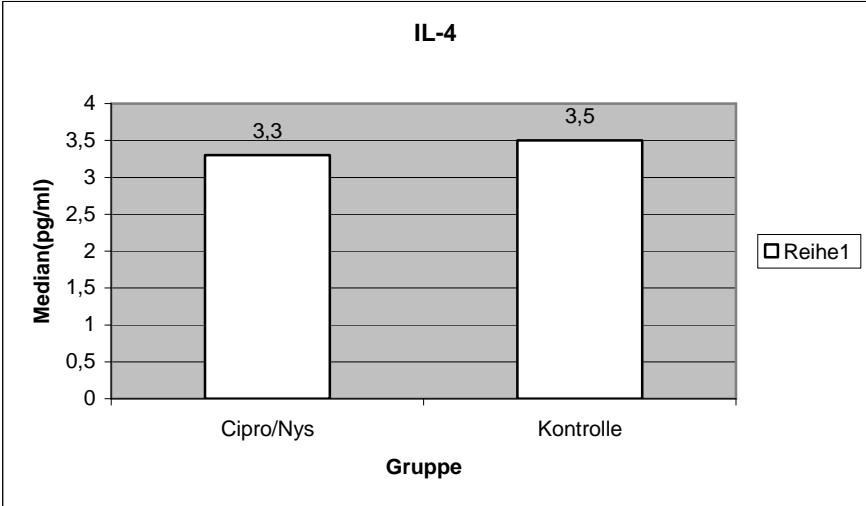


Abbildung 24: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an IL-4 in der Cipro/Nys-Gruppe und der Kontrollgruppe

In der Cipro/Nys-Gruppe ist kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle zu erkennen ($p=0,761$).

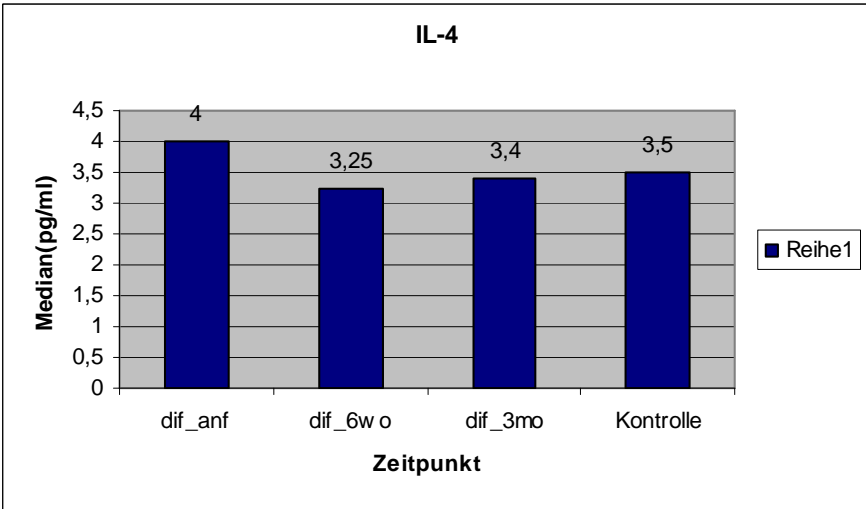


Abbildung 25: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an IL4 in den Patientinnengruppen und der Kontrollgruppe

Außer bei Behandlungsbeginn mit Fluconazol, ist in den Gruppen mit 6 Wochen- und 3-monatiger Behandlung verglichen mit der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied ($p=0,626$; $p=0,557$) zu erkennen. Bei Behandlungsbeginn ist IL-4 gegenüber der Kontrollgruppe allerdings signifikant erhöht ($p=0,046$). Dies könnte auch durch die einzelnen hohen Werte in dieser Gruppe begründet sein.

Die Konzentration an IL-4 verändert sich zwischen Anfang, 6-wöchiger Behandlung und 3-monatiger Behandlung nicht ($p=0,234$).

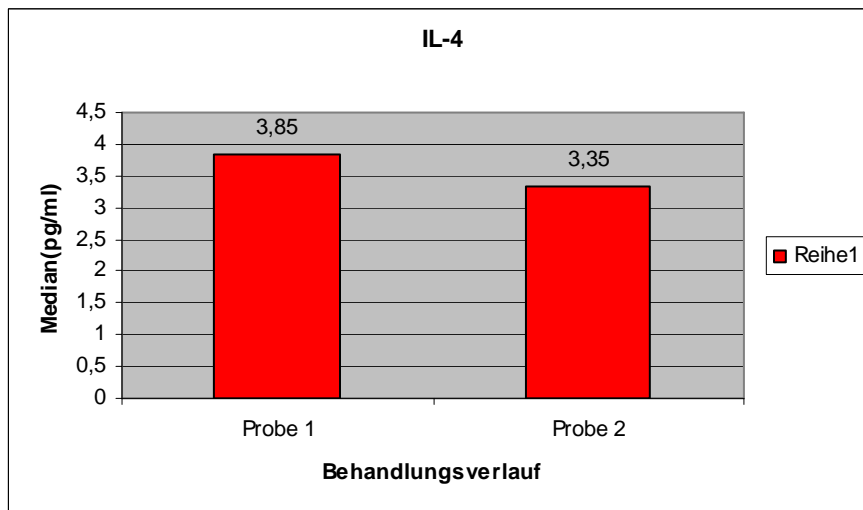


Abbildung 26: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an IL-4 im Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen

Bezogen auf den Behandlungsverlauf bei den gleichen Patientinnen, ist eine leichte Abnahme an IL-4 zu erkennen, jedoch nicht signifikant ($p=0,191$).

3.9 IL-10

Gruppe	n	n_{fehlend}	Median (pg/ml)	Max (pg/ml)	Min (pg/ml)	p-Wert
Diflucan Anfang	72	2	0,0	122,7	0,0	0,027 ¹
Diflucan 6 Wochen	30	0	0,0	4,30	0,0	
Diflucan 3 Monate	72	0	0,45	53,90	0,0	
Diflucan Probe 1	48	2	0,0	122,7	0,0	0,851 ²
Diflucan Probe 2	50	0	0,40	24,60	0,0	

Tabelle 18: Median/Max/Min der Konzentration an IL-10 in den einzelnen Gruppen, ¹=Kruskal-Wallis-Test, ²=Wilcoxon-Test; n=Anzahl; n_{fehlend}= Anzahl fehlend

Gruppe	n	n_{fehlend}	Median (pg/ml)	Max (pg/ml)	Min (pg/ml)	p-Wert
Diflucan Anfang	72	2	0,0	122,7	0,0	0,210 ¹
Diflucan 6 Wochen	30	0	0,0	4,30	0,0	0,004
Diflucan 3 Monate	72	0	0,45	53,90	0,0	
Kontrolle	40	0	1,30	180,7	0,0	
Cipro/Nystatin	12	0	0,35	6,40	0,0	0,329 ²
Kontrolle	40	0	1,30	180,7	0,0	

Tabelle 19: Median/Max/Min der Konzentration an IL-10 in den einzelnen Gruppen, ¹=Mann-Whitney-U-Test; n=Anzahl; n_{fehlend}= Anzahl fehlend

Die folgenden Diagramme und deren Beschreibung dienen der Veranschaulichung der Ergebnisse aus den Tabellen 18 und 19. Die medianen Konzentrationen an IL-10 in den einzelnen Gruppen sind in den Balkendiagrammen nochmals angegeben.

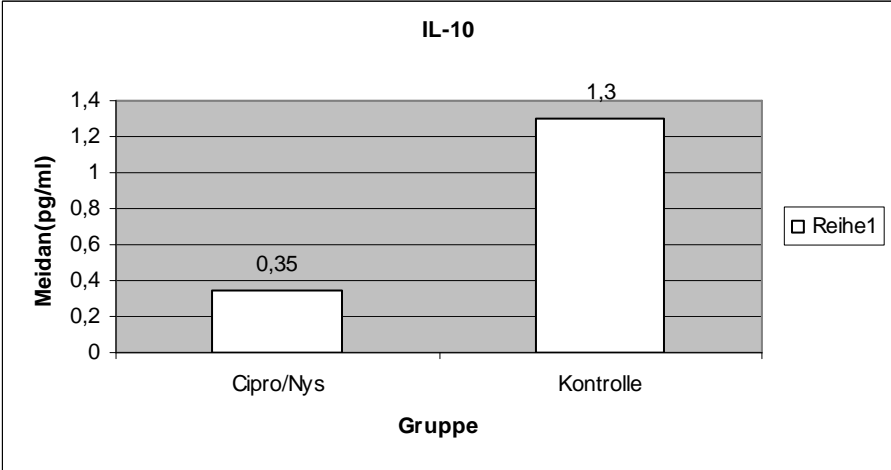


Abbildung 27: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an IL-10 in der Cipro/Nys-Gruppe und der Kontrollgruppe

IL-10 ist in der Cipro/Nys-Gruppe deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe, jedoch nicht signifikant ($p=0,329$).

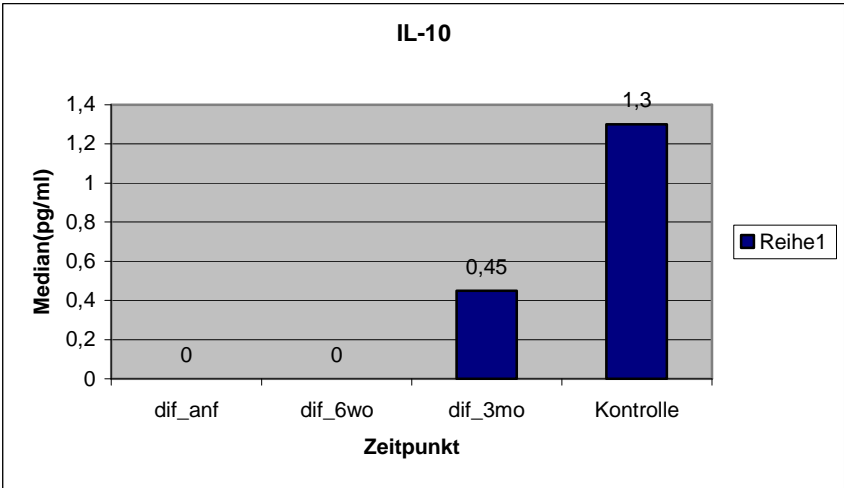


Abbildung 28: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an IL-10 in den Patientinnengruppen und der Kontrollgruppe

Zu allen Behandlungszeitpunkten ist IL-10 deutlich erniedrigt gegenüber der Kontrolle, in der Gruppe mit 6 Wochen Behandlung sogar signifikant ($p=0,004$), erst in der Gruppe mit 3-monatiger Behandlung ist eine leichte Zunahme zu erkennen. Im Vergleich zu den vorherigen Zeitpunkten ist diese Konzentrationserhöhung signifikant ($p=0,027$).

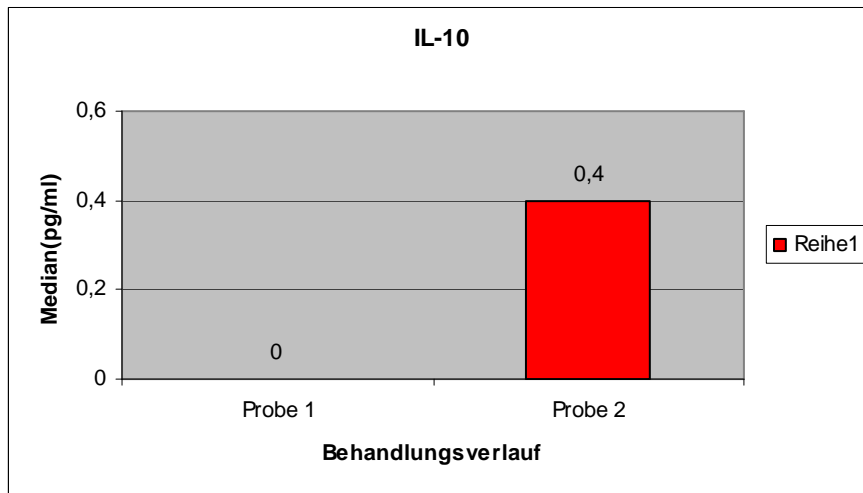


Abbildung 29: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an IL-10 im Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen

Auch der Behandlungsverlauf bei den gleichen Patientinnen zeigt die leichte Zunahme während Behandlung. Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,851$).

3.10 IL-12

Gruppe	n	n_{fehlend}	Median (pg/ml)	Max (pg/ml)	Min (pg/ml)	p-Wert
Diflucan Anfang	74	0	3,25	508,0	0,0	0,073 ¹
Diflucan 6 Wochen	30	0	1,30	16,70	0,0	
Diflucan 3 Monate	72	0	1,50	95,90	0,0	
Diflucan Probe 1	50	0	3,05	508,0	0,0	0,018 ²
Diflucan Probe 2	50	0	1,30	95,9	0,0	

Tabelle 20: Median/Max/Min der Konzentration an IL-12 in den einzelnen Gruppen, ¹=Kruskal-Wallis-Test, ²=Wilcoxon-Test; n=Anzahl; n_{fehlend}= Anzahl fehlend

Gruppe	n	n_{fehlend}	Median (pg/ml)	Max (pg/ml)	Min (pg/ml)	p-Wert
Diflucan Anfang	74	0	3,25	508,0	0,0	0,133 ¹
Diflucan 6 Wochen	30	0	1,30	16,70	0,0	0,957
Diflucan 3 Monate	72	0	1,50	95,90	0,0	
Kontrolle	40	0	1,85	54,70	0,0	
Cipro/Nystatin	12	0	4,45	70,20	0,0	0,222 ¹
Kontrolle	40	0	1,85	54,70	0,0	

Tabelle 21: Median/Max/Min der Konzentration an IL-12 in den einzelnen Gruppen, ¹=Mann-Whitney-U-Test; n=Anzahl; n_{fehlend}= Anzahl fehlend

Die folgenden Diagramme und deren Beschreibung dienen der Veranschaulichung der Ergebnisse aus den Tabellen 20 und 21. Die medianen Konzentrationen an IL-12 in den einzelnen Gruppen sind in den Balkendiagrammen nochmals angegeben.

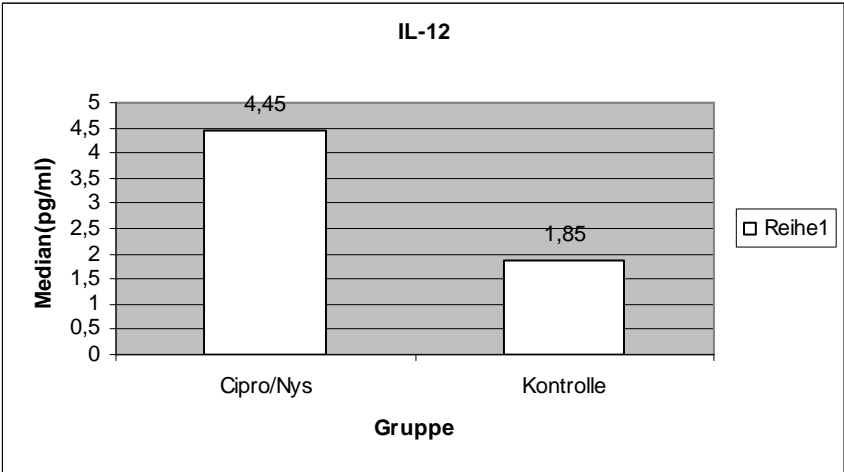


Abbildung 30: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an IL-12 in der Cipro/Nys-Gruppe und der Kontrollgruppe

IL-12 ist in der Cipro/Nys-Gruppe gegenüber der Kontrolle deutlich erhöht, jedoch nicht signifikant ($p=0,222$).

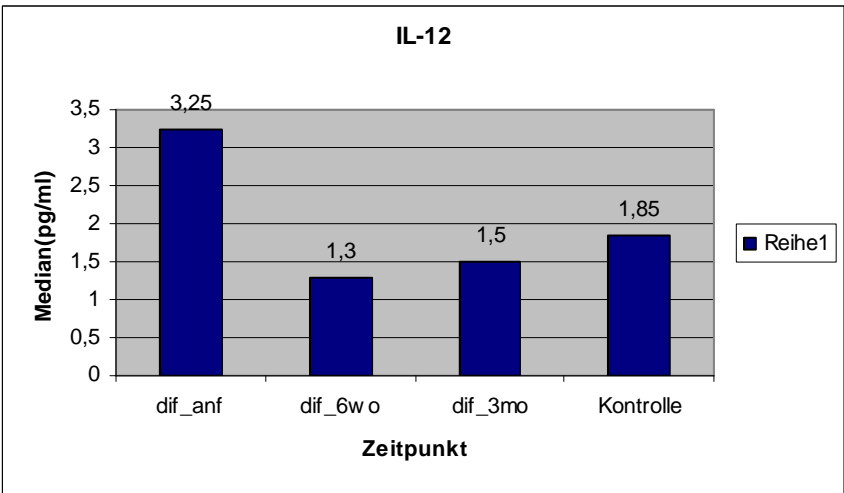


Abbildung 316: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an IL-12 in den Patientinnengruppen und der Kontrollgruppe

Die Konzentration an IL-12 nimmt bereits in der Gruppe mit 6 Wochen Behandlung gegenüber der Kontrolle ab, allerdings nicht signifikant ($p=0,957$). Sie bleibt auch in der Gruppe mit 3-monatiger Behandlung auf diesem erniedrigten Niveau. Die Werte liegen sogar unter den Kontrollwerten.

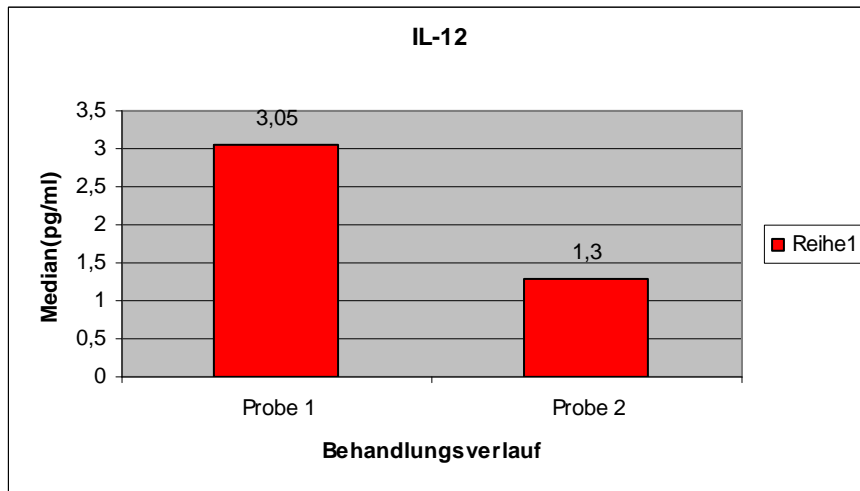


Abbildung 32: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an IL-12 im Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen

Bei dem Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen ist der Effekt ebenfalls zu sehen, hier sinkt IL-12 sogar signifikant ab ($p=0,018$).

3.11 Cys-Leukotriene

Gruppe	n	n_{fehlend}	Median (pg/ml)	Max (pg/ml)	Min (pg/ml)	p-Wert
Diflucan Anfang	69	5	166,7	1670	0,80	0,843 ¹
Diflucan 6 Wochen	29	1	140,8	1391	1,3	
Diflucan 3 Monate	67	5	127,9	789,1	1,00	
Diflucan Probe 1	46	4	168,4	1670	44,7	0,618 ²
Diflucan Probe 2	45	5	140,0	756,5	1,30	

Tabelle 22: Median/Max/Min der Konzentration an Cys-Leukotrienen in den einzelnen Gruppen, ¹=Kruskal-Wallis-Test, ²=Wilcoxon-Test; n=Anzahl; n_{fehlend}= Anzahl fehlend

Gruppe	n	n_{fehlend}	Median (pg/ml)	Max (pg/ml)	Min (pg/ml)	p-Wert
Diflucan Anfang	69	5	166,7	1670	0,80	0,024 ¹
Diflucan 6 Wochen	29	1	140,8	1391	1,3	0,075
Diflucan 3 Monate	67	5	127,9	789,1	1,00	
Kontrolle	40	0	104,9	922,8	0,50	
Cipro/Nystatin	11	1	155,7	618,1	56,5	0,287 ¹
Kontrolle	40	0	104,9	922,8	0,50	

Tabelle 23: Median/Max/Min der Konzentration an Cys-Leukotrienen in den einzelnen Gruppen, ¹=Mann-Whitney-U-Test; n=Anzahl; n_{fehlend}= Anzahl fehlend

Die folgenden Diagramme und deren Beschreibung dienen der Veranschaulichung der Ergebnisse aus den Tabellen 22 und 23. Die medianen Konzentrationen an Cys-LT in den einzelnen Gruppen sind in den Balkendiagrammen nochmals angegeben.

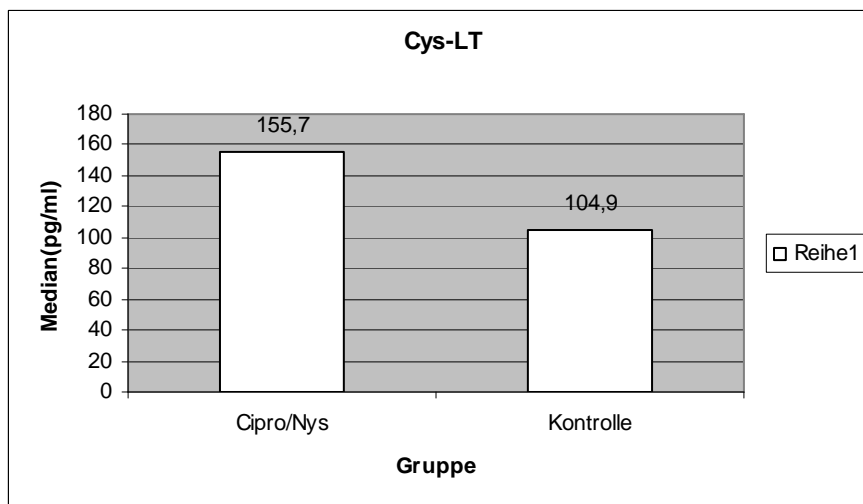


Abbildung 33: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an Cys-Leukotrienen in der Cipro/Nys-Gruppe und der Kontrollgruppe

Die Cys-Leukotriene sind in der Cipro/Nys-Gruppe höher konzentriert als in der Kontrollgruppe, jedoch nicht signifikant ($p=0,287$).

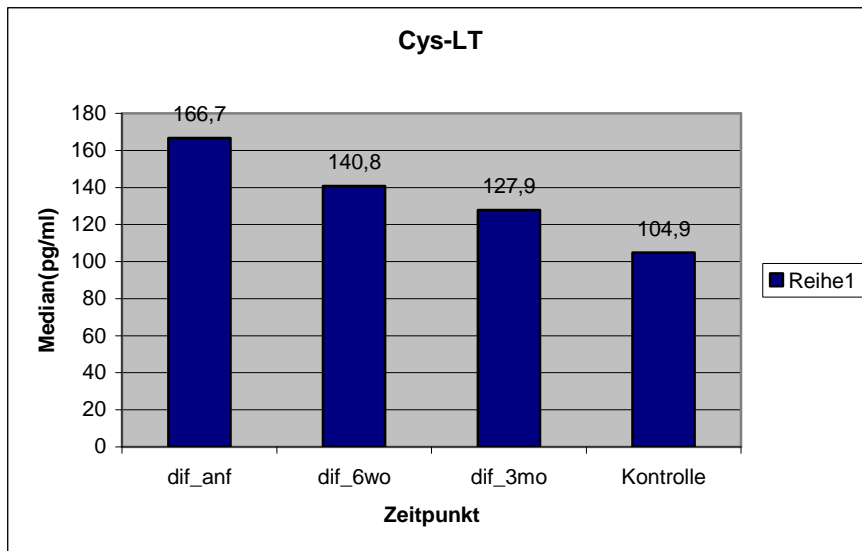


Abbildung 34: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an Cys-Leukotrienen in den Patientinnengruppen und der Kontrollgruppe

Man sieht bereits in der Gruppe mit 6 Wochen Fluconazol-Behandlung eine deutliche Abnahme an Cys-Leukotrienen, die in der Gruppe mit 3 Monaten Behandlung weiter absinkt und sich den Kontrollwerten nähert. Diese sind allerdings nicht signifikant ($p=0,075$; $p=0,055$). Vor Behandlung sind die Cys-LT gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht ($p=0,024$).

Bezogen auf die Behandlungszeitpunkte in den Positivgruppen besteht keine signifikante Abnahme ($p=0,843$)

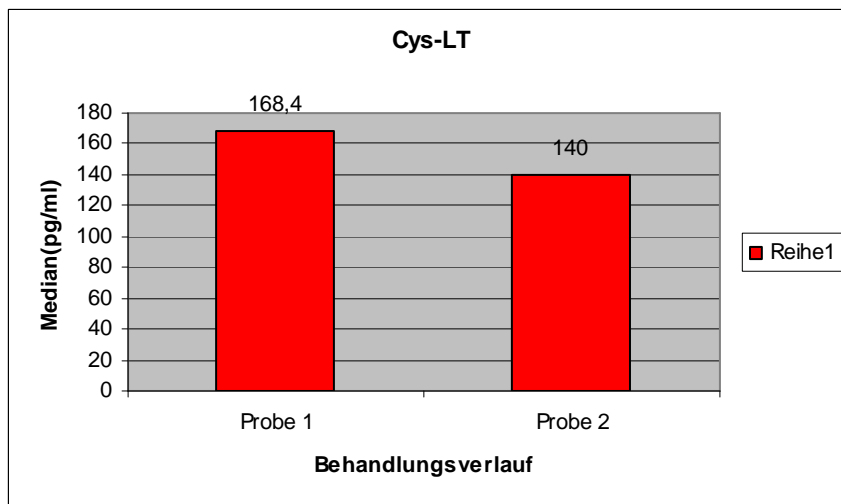


Abbildung 35: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an Cysteinyl-Leukotrienen im Behandlungsverlauf einer Patientin

Auch der Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen zeigt die Abnahme an Cys-Leukotrienen. Es besteht keine signifikante Abnahme der Konzentration ($p=0,618$).

3.12 PGE₂

Gruppe	n	n_{fehlend}	Median (pg/ml)	Max (pg/ml)	Min (pg/ml)	p-Wert
Diflucan Anfang	63	11	458,7	3447	18,30	0,460 ¹
Diflucan 6 Wochen	27	3	297,7	2564	0,20	
Diflucan 3 Monate	60	12	256,9	2939	3,60	
Diflucan Probe 1	44	6	398,8	3069	18,30	0,489 ²
Diflucan Probe 2	40	10	267,3	2564	0,20	

Tabelle 24: Median/Max/Min der Konzentration an PGE₂ in den einzelnen Gruppen,

¹=Kruskal-Wallis-Test, ²=Wilcoxon-Test; n=Anzahl;

n_{fehlend}= Anzahl fehlend

Gruppe	n	n_{fehlend}	Median (pg/ml)	Max (pg/ml)	Min (pg/ml)	p-Wert
Diflucan Anfang	63	11	458,7	3447	18,30	0,617 ¹
Diflucan 6 Wochen	27	3	297,7	2564	0,20	0,463
Diflucan 3 Monate	60	12	256,9	2939	3,60	
Kontrolle	37	3	315,7	2564	3,30	0,669
Cipro/Nystatin	9	3	730,7	3160	44,30	
Kontrolle	37	3	315,7	2564	3,30	

Tabelle 25: Median/Max/Min der Konzentration an PGE₂ in den einzelnen Gruppen,

¹=Mann-Whitney-U-Test; n=Anzahl; n_{fehlend}= Anzahl fehlend

Die folgenden Diagramme und deren Beschreibung dienen der Veranschaulichung der Ergebnisse aus den Tabellen 24 und 25. Die medianen Konzentrationen an PGE₂ in den einzelnen Gruppen sind in den Balkendiagrammen nochmals angegeben.

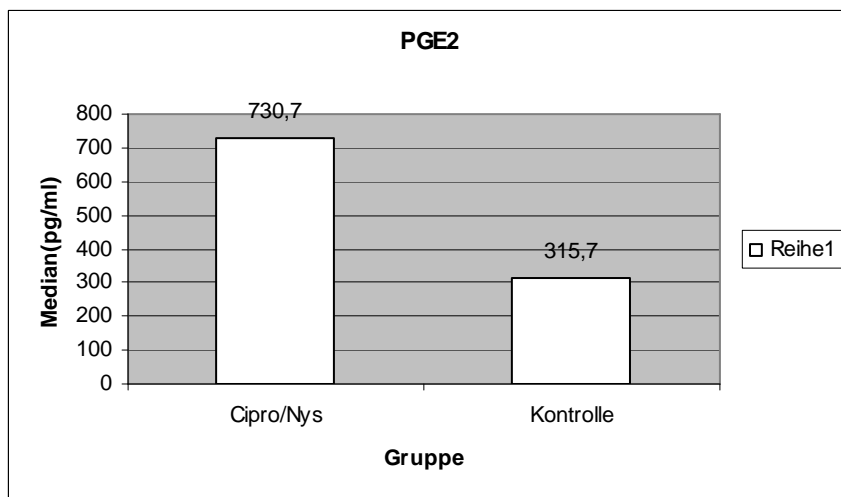


Abbildung 36: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an PGE₂ in der Cipro/Nys-Gruppe und der Kontrollgruppe

PGE₂ ist in der Cipro/Nystatin-Gruppe deutlich höher als in der Kontrollgruppe. Dieser Konzentrationsunterschied ist dennoch nicht signifikant ($p=0,478$), eventuell durch die kleine Gruppenanzahl.

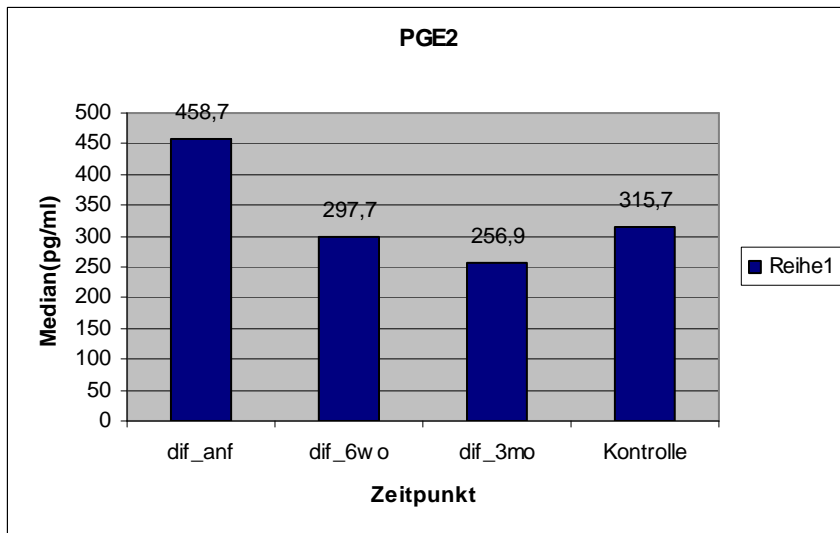


Abbildung 37: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an PGE₂ in den Patientinnengruppen und der Kontrollgruppe

Je länger Fluconazol eingenommen wurde, desto niedriger waren die Konzentrationen an PGE₂, sogar niedriger als in der Kontrollgruppe. Auch hier bestand jedoch keine statistische Signifikanz (s. Tabelle 25).

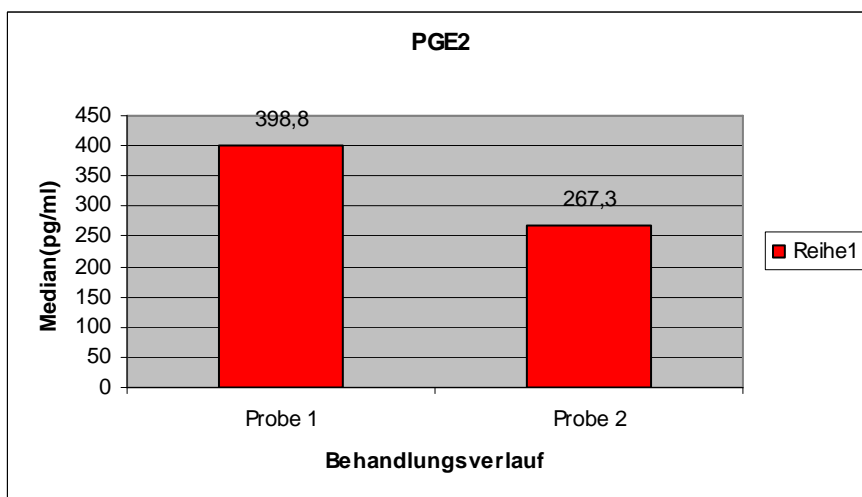


Abbildung 38: Vergleich der Konzentrationen (Mediane) an PGE₂ im Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen

Auch im Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen ist die Abnahme an PGE₂ zu erkennen, diese ist jedoch auch nicht signifikant (p=0,489).

4 Diskussion

Die Probandinnen dieser Studie wurden in der gynäkologisch-mikrobiologischen Sprechstunde in der Frauenklinik, Klinikum Großhadern, ausgewählt.

Alle Probandinnen der Positivgruppen hatten eine klinisch diagnostizierte CRVVC und bekamen das Antimykotikum Fluconazol verschrieben, außer der Ciprofloxacin/Nystatin-Gruppe.

Die Probandinnen der Kontrollgruppe kamen nur zur Krebsvorsorge in die Klinik und hatten keine Beschwerden.

Das Vaginalsekret der Patientinnen wurde hinsichtlich Reinheitsgrad (nur Positivgruppen), des Vorhandenseins von Candida mittels kultureller Pilzanzüchtung und PCR, sowie auf Zytokine untersucht.

Die Bestimmung des Reinheitsgrades ist eine einfache und schnelle Methode, um während der Sprechstunde erste Aufschlüsse über die Vaginalflora der Patientin zu erhalten.

Der RHG 1, der einer gesunden Flora entspricht, überwog bei allen Patientinnen deutlich, egal vor oder während der Behandlung mit Fluconazol. Bei keiner der Patientinnen konnten mikroskopisch Sproßzellen einer Candida-Spezies nachgewiesen werden.

Dennoch kann auch bei einem RHG 1, bei dem viele Laktobazillen vorliegen, eine Candida-Besiedelung nicht ausgeschlossen werden. *Candida albicans* ist tolerant gegenüber dem sauren Milieu in der Vagina (Larsen und Monif, 2001; Falagas, 2006; Witkin, 2007; Hill, 1986) und es sind auch nicht unbedingt Veränderungen der vaginalen Flora, z. B. Mengenänderung der Laktobazillen, mit dem Auftreten einer Pilzinfektion zu erkennen (Fidel und Sobel, 1996; Mijac, 2006).

Die RHG´s 2 und 3 kamen schon vor Behandlung deutlich weniger oft vor als der RHG 1 und nahmen bereits in der Gruppe mit 6-wöchiger Behandlung ab. Das Auftreten von Leukozyten und die Abnahme der Laktobazillen-Menge ist für die RHG´s 2 und 3 charakteristisch und deutet auf eine lokale Immunantwort und/oder entzündliche Vorgänge in der Scheide hin.

Mardh et al. fanden in einer Studie bei 96% der untersuchten RVVC-Patientinnen eine erhöhte Leukozyten-Esterase Aktivität, die mit der Anzahl an Leukozyten korrelierte (2003). In dieser Studie wurden Leukozyten deutlich seltener gefunden, da der RHG 1 überwog. Das könnte dadurch bedingt sein, dass im Gegensatz zu dieser Studie in der von Mardh et al. nur Patientinnen mit akuten Symptomen untersucht wurden, bei denen also akute entzündliche/immunologische Vorgänge vorliegen könnten.

Da die RHG´s 2 und 3 während der Behandlung abnehmen, scheint sich die Behandlung mit Fluconazol positiv auf die vaginale Flora auszuwirken. Der RHG sagt allerdings nicht unbedingt etwas über einen Pilzbefall aus, sondern beschreibt nur die mikroskopisch gesehene Flora.

Der RHG 0 lag jedoch auch bei einigen CRVVC-Patientinnen vor, hier treten keine Laktobazillen auf. Dies weist auf eine unphysiologische Flora hin, wie es häufig nach Medikamenteneinnahme anzutreffen ist.

Der RHG 3 ist in der Gruppe Ciprofloxacin/Nystatin gehäuft. Hierbei treten massenhaft Bakterien und auch Leukozyten auf, Laktobazillen sind nicht vertreten (Weissenbacher, 2001).

Im Gegensatz zur mikroskopischen Untersuchung kamen bei der kulturellen Anzucht positive Befunde heraus. Daran sieht man, dass eine alleinige mikroskopische Untersuchung, wie es in vielen gynäkologischen Sprechstunden der Fall ist, nicht ausreicht um eine

Pilzinfektion auszuschließen. Sie ist nicht zuverlässig genug (Weissenbacher, 2001).

Eine alleinige Untersuchung der Vagina und das Befragen der Patientinnen hinsichtlich der typischen Symptomatik bei einer Pilzinfektion reichen auch laut einer Studie von Novikova und Mardh (2002) nicht aus, um auf einen möglichen Pilzbefall zu schließen.

Eine kulturelle Anzucht, obwohl mit Kosten verbunden, ist daher stets sinnvoll. Bei unklarem mikroskopischem Befund und auch zur Sicherung der Diagnose ist sie wünschenswert (Weissenbacher, 2001). Außerdem dient sie der Differenzierung der einzelnen Candida-Spezies und in bestimmten Fällen der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK). So ist z. B. *Candida glabrata* erst ab einer bestimmten Konzentration an Fluconazol gegen dieses empfindlich, diese Konzentration wird durch Bestimmung der MHK herausgefunden.

Oft wird eine Pilzkultur zu früh nach einer antimykotischen Therapie angelegt. Die Reste des noch im Vaginalsekret vorhandenen Antimykotikums können dann zu einem negativen Pilznachweis führen, daher sollte mindestens ein 1-3-wöchiger Abstand eingehalten werden (Weissenbacher, 2001).

20,3% der CRVVC-Patientinnen waren in der Gruppe vor Fluconazol-Einnahme in der Kultur positiv, verglichen mit 45,9% Kultur-negativen CRVVC-Patientinnen vor Fluconazol-Einnahme. Die Zahl der Kultur-positiven Frauen nahm bereits in der Gruppe mit 6-wöchiger Behandlung bis fast auf Null ab und blieb auch in der mit 3-monatiger Behandlung fast auf Null. Man kann daher annehmen, dass Fluconazol das Wachstum der Pilzzellen effektiv hemmt.

In der Cipro/Nys-Gruppe waren 33,3% positiv und 66,7% negativ.

Die Ergebnisse sind in dieser Studie etwas niedriger ausgefallen als in anderen Studien, was an einer unterschiedlichen Probenverarbeitung oder auch an unterschiedlich ausgewählten Patientinnenkollektiven liegen könnte.

So kamen Weissenbacher et al. (2004) in einer Studie auf 29,8% Kultur-positive bei den CRVVC-Patientinnen (keine Fluconazol-Einnahme).

In einer Studie von Novikova et al. (2002) waren 44% der CRVVC-Patientinnen kultur-positiv.

Mittels Chromagarfärbung wurden bei den Kultur-positiven die Candida-Spezies bestimmt. In 76,2% aller Fälle war *Candida albicans* der Verursacher, gefolgt von *Candida glabrata* in 6,1% der Fälle.

Die Verteilung der Candida-Spezies in dieser Studie entspricht in etwa denen in anderen Studien, was *Candida albicans* als hauptsächlich vorkommende Art bestätigt.

In einer Studie von Linhares et al. (2001) wurde in 86,4% der Fälle *Candida albicans* und in 4,5% der Fälle *Candida glabrata* gefunden.

Novikova et al. (2002) fanden zu 87% *Candida albicans*, gefolgt von *Candida krusei* mit 9% und *Candida glabrata* mit 4%.

In 68% der Fälle wurde *Candida albicans* bei Nyirjesy et al. (1995) gefunden und in 92% der Fälle bei Vrablik (2007).

Die Verwendung von Chromagar zur Identifizierung der verschiedenen Candida-Spezies wird in der Literatur als konventionelle und verlässliche Methode beschrieben. Nur hinsichtlich des eindeutigen Nachweises von *Candida glabrata* wird diese Methode teils als unsicher gewertet (Novikova, 2002; Horvath, 2003; Gültekin, 2005).

Bei drei Patientinnen wurde *Saccharomyces cerevisiae* nach Einsendung in das mikrobiologische Labor der Klinik gefunden. Dies konnte nicht mittels Chromagarfärbung nachgewiesen werden und wurde deshalb durch kulturelle Anzucht in obigem Labor nachgewiesen.

Obwohl eine Besiedelung der Vagina mit *S. cerevisiae* saprophytär und wohl meist apathogen ist, wird in der Literatur auch eine „*S. cerevisiae*-Vaginitis“ beschrieben, die zu den Symptomen einer Pilzinfektion führt (Nyirjesy, 1995).

In der Cipro/Nys-Gruppe war *Candida parapsilosis* bei 8,3% der Patientinnen vorliegend, bei 25% *C. albicans*.

Der Nachweis von *Candida* bei Patientinnen, die gleichzeitig eine bakterielle Infektion haben, deutet darauf hin, dass *Candida* zusammen mit Bakterien auftreten kann. In der Literatur wird oft beschrieben, dass eine Pilzinfektion häufig nach Antibiotika-Einnahme auftritt und diese sogar Risikofaktor für das Auftreten einer VVC ist (Fidel, 1996; Fidel, 2004; Linhares, 2001; Cheng, 2006). Es kann daher durch Behandlung der Bakterien zu einem Ausbruch einer Pilzinfektion kommen.

Das Anwenden der Ovula mit einem Antibiotikum und Antimykotikum ist zur gleichzeitigen Therapie von Bakterien und Pilzen und zur Vorbeugung einer Pilzinfektion nach Antibiotika gerechtfertigt.

Candida-Spezies wie vor allem *C. glabrata* sind vermehrt resistent gegen Azole, vor allem auch Fluconazol (Fidel, 1999; Novikova, 2002; Nyirjesy, 1995; Pappas, 2004; Sobel, 2002). Daher sollte bei diesen Patientinnen überprüft werden, ob die Fluconazol-Therapie überhaupt anschlägt, oder auf ein anderes Antimykotikum umgestellt werden sollte bzw. die MHK für Fluconazol bestimmt werden. Für Patientinnen, die mit *Candida glabrata* befallen sind, wäre eine kulturelle Anzüchtung daher auch besonders wichtig (Nyirjesy, 1995; Owen, 2004). Frauen, die mit *C. glabrata* befallen sind, sprechen laut Literatur auf eine 2-wöchige Behandlung mit Borsäure-Zäpfchen an (Pappas, 2004; Ringdahl, 2006; Ray, 2007). Diese sind allerdings in Deutschland nicht erlaubt.

In der Arzneimitteldatenbank der deutschen Apothekerverbände (ABDA) sind bestimmte Stämme von *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. parapsilosis* als resistent gegen Fluconazol beschrieben.

Die PCR ist als Nachweismethode viel sensitiver und schneller als die kulturelle Anzucht (Morace, 1997; Trama, 2005). Die Nachweisgrenze von *Candida* mittels PCR schwankt in der Literatur zwischen 50µg DNA (Cramoin, 1993) und 200fg DNA (Morace, 1997). Dagegen sind mindestens 3000 *Candida*-Organismen/ml nötig, um einen positiven Kulturnachweis zu erhalten (Linhares, 2001).

Der Vergleich der beiden Methoden Kultur und PCR bezogen auf alle Patientinnengruppen (Gruppe Dif_gesamt) ergab, dass mittels PCR bei 21,5% mehr Patientinnen eine *Candida*-Kolonisation nachgewiesen werden konnte. Trotzdem waren insgesamt nur 1/3 der Patientinnen positiv und 2/3 negativ.

In der Cipro/Nys-Gruppe war die Verteilung Positiv/Negativ etwa gleich, jedoch ist die Gruppe auch sehr klein.

In zwei Studien von Weissenbacher et al. wurde einmal in 31,1% (2000) und einmal in 42,3% (2004) der Fälle *Candida* mittels PCR nachgewiesen. In anderen Arbeiten wurden bei CRVVC-Patientinnen 37% PCR-Positive gefunden (Crampin, 1993) bzw. 30% PCR-Positive (Giraldo, 2000).

Die Zahl der PCR-Positiven in dieser Studie ist vergleichbar mit den Ergebnissen der anderen zitierten Studien, nur ca. 1/3 der Patientinnen weisen eine *Candida*-Besiedelung auf.

Obwohl vielleicht auch bei der Verarbeitung der Proben Material verloren gehen kann oder die Mengen an *Candida* zu gering sind, um

nachgewiesen werden zu können, so hat doch der Großteil der Patientinnen mit Diagnose CRVVC keine nachweisbare Pilzinfektion.

In einer Arbeit von Mardh et al. (2003) wird darauf hingewiesen, dass eine alleinige Untersuchung der Patientinnen durch Mikroskopie, Kultur oder PCR zu inakkuraten Ergebnissen führen kann. Die Patientinnen in dortiger Studie waren zum Teil Kultur-positiv aber nicht PCR-positiv und umgekehrt.

Die hohe Rate an Frauen, bei denen keine Besiedelung nachgewiesen werden konnte, sollte Anlass dazu sein, über mögliche andere Ursachen der Symptome nachzudenken. So können z.B. eine bakterielle Vaginose, Herpes genitalis, ein Lichen oder auch allergische Reaktionen sowie entzündliche Vorgänge zu den Symptomen einer Pilzinfektion führen (Weissenbacher, 2001; Marrazzo, 2003). In der Literatur wird z.B. beschrieben (Linhares, 2001; Mashburn, 2006), dass mehr als die Hälfte der Frauen mit vermuteter VVC fehldiagnostiziert waren.

Bei den PCR-positiven Patientinnen konnte auch noch in der Gruppe mit 3-monatiger Behandlung eine Candida-Besiedelung nachgewiesen werden. Obwohl Fluconazol bei längerer Anwendung fungizid wirkt (ABDA, 2007), scheint es die Pilze nicht vollständig eliminieren zu können. Möglicherweise wirkt es nur auf die aktive Hyphenform der Pilze und nicht auf die Sporen. Dies könnte auch die häufigen Rückfälle nach Beendigung der Therapie erklären. Andererseits wird mittels PCR auch nur Pilz-DNA nachgewiesen, diese muß nicht unbedingt von lebenden Pilzzellen stammen, sondern auch aus abgetöteten Pilzzellen.

Auch nach Langzeittherapie mit Fluconazol über 6 Monate blieben laut einer Studie von Sobel et al. (2004) nur 43% der Frauen innerhalb von 10 Monaten nach Beendigung der Therapie beschwerdefrei. Sobel beschreibt, dass die Therapie mit Fluconazol zu keiner Eradikation von

Candida führt. Patientinnen, die in der Kultur negativ waren, wiesen trotzdem noch nicht mittels Kultur detektierbare Mengen an Candida auf. Auch andere Studien (Marrazzo, 2003; Sobel, 2006; El-Din, 2001) beschreiben eine fehlende Eradikation von Candida durch Fluconazol. Eine Studie von Ventolini et al. (2006) kommt zu einer 54,2%igen Rückfallrate innerhalb von 12 Monaten nach Beendigung einer 4-wöchigen Fluconazoltherapie.

Um Hinweise auf mögliche entzündliche und/oder allergische Vorgänge bei einer CRVVC zu erhalten, wurde die Konzentration von Zytokinen im Vaginalsekret vor und während Therapie bestimmt. Diese sind an entzündlichen und allergischen Vorgängen beteiligt.

So wird auch in einem Review von Fidel (2006) beschrieben, dass bei Patientinnen mit CRVVC eine Interaktion von Candida mit vaginalen Epithelzellen zu einer inflammatorischen Antwort des Immunsystems auf Candida führt. Ferner beschreibt er, dass eine CRVVC häufig als allergische Reaktion, verursacht durch Candida-IgE Antikörper, auf Candida betrachtet wird. Dies könnte auf bestimmte Patientinnen zutreffen, die eine Art Hyper-IgE-Syndrom hätten, welches durch ein TH1/TH2-Zell-Ungleichgewicht (Chehimi, 2001) zu einer CRVVC führen könnte. Die meisten Studien würden allerdings zeigen, dass ein Zusammenhang mit einer Allergie nur für eine Minderheit der Patientinnen zuträfe.

Gesamt-IgE spielt bei allergischen Reaktionen im Körper eine bedeutende Rolle. Es sitzt auf Mastzellen und Granulozyten. Bindet ein Allergen an IgE, führt dies zur Mastzelldegranulation und damit zur

Ausschüttung von Histamin, Leukotrienen, Prostaglandinen und anderen chemotaktischen Faktoren (Mutschler, 2001).

Candida-IgE ist ein spezifisch gegen Candida-Antigene gerichtetes IgE und deutet auf eine allergische Reaktion auf Candida hin (Fidel, 2006).

Gesamt-IgE ist in dieser Studie vor Behandlungsbeginn und in der Gruppe mit 6-wöchiger Behandlung, jedoch nicht in der Gruppe mit 3-monatiger Behandlung, gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht.

Im Gegensatz dazu ist bei Candida-IgE gegenüber der Kontrolle zwar eine tendenzielle Erhöhung zu sehen, diese ist jedoch außer in der Gruppe mit 3-monatiger Behandlung nicht signifikant.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass bei einigen Patientinnen mit CRVVC allergische Reaktionen auf bestimmte Allergene ablaufen. Da Gesamt-IgE signifikant erhöht ist, nicht jedoch Candida-IgE (bis auf die Gruppe mit 3-monatiger Behandlung), scheinen bei den Patientinnen andere Allergene als Candida für die allergischen Reaktionen verantwortlich zu sein. So gaben 34% aller Patientinnen an, Allergien wie Heuschnupfen oder Kontaktallergien zu haben. Dafür, dass in dieser Studie auch Patientinnen mit einer Hypersensitivität gegen Candida dabei sind, spricht das signifikant erhöhte Candida-IgE in der Gruppe mit 3-monatiger Behandlung.

In zwei Studien von Witkin et al. (1988; 1987) wurde beschrieben, dass die im Vaginalsekret gefundenen IgE-Antikörper gegen Candida, aber auch gegen die Spermien des Partners oder gegen Chemikalien in Toilettenpapier, Waschlotionen, Tampons oder auch gegen Pollen, Tierhaare oder Staub gerichtet sein können, die mit den Fingern übertragen werden.

In einer Studie von Neves et al. (2005) wurde auch ein Zusammenhang zwischen Allergien und CRVVC beschrieben, so hatten 68% der Patientinnen mit CRVVC auch eine Allergie. Es wurde jedoch keine signifikante

Erhöhung von Gesamt-IgE und Candida-IgE festgestellt. Das Auftreten von Candida-IgE-Antikörpern war viel niedriger als der Teil an CRVVC-Patientinnen, die Allergien der Haut, Schleimhäute, etc. hatten.

Auch in anderen Studien ist ein Zusammenhang zwischen Allergien wie Rhinitis (Moraes, 1998; Moraes, 2000) oder Pollenallergie (Bermann, 1964) und CRVVC beschrieben worden. Vulva und Vagina werden auch als mögliche Eintrittspforten für Allergene beschrieben (Kudelko, 1971).

Eine Studie von Weissenbacher et al. (2004) kommt dagegen zu einer signifikanten Erhöhung von Candida-IgE gegenüber der Kontrolle und keiner signifikanten Erhöhung von Gesamt-IgE.

Diese Unterschiede könnten an einer Auswahl der Patientinnen unter unterschiedlichen Gesichtspunkten liegen, durch unterschiedliche statistische Ergebnisse auf Grund der verschiedenen Patientenkollektive oder auch einfach an den untersuchten Frauen. Denn wie in einem Review von Fidel (2006) beschrieben, betrifft eine „Candida-Allergie“ nur einen kleinen Teil der CRVVC-Patientinnen. Vielleicht traten in der Weissenbacher-Studie zufällig mehr Frauen mit einer Candida-Allergie auf, als in dieser Studie.

In anderen Arbeiten wurde ebenfalls deutlich, dass eine „Candida-Allergie“ nur einen Teil der CRVVC-Patientinnen betrifft (Ricer, 1988; Neves, 2005). In zwei Studien von Witkin et al. wurden einmal bei 18,8% (1988) der dort untersuchten Patientinnen Candida-IgE Antikörper gefunden, und einmal bei 25,6% (1989).

Gesamt-IgE, nicht jedoch Candida-IgE, nimmt während der Langzeit-Fluconazol-Behandlung ab. Frauen, die nicht auf Candida allergisch reagieren sondern auf andere Allergene, könnten daher von der Fluconazol-Behandlung profitieren. Da durch das Auftreten einer Allergie das lokale Immunsystem in der Vagina gestört ist, könnte es dadurch leichter zum wiederholten Auftreten einer Pilzinfektion kommen und

dadurch zu einer weiteren Störung des lokalen Immunsystems. Durch die Fluconazol-Behandlung wird die Immunreaktion vielleicht abgeschwächt, was auch einen positiven Einfluss auf diese gegen das Allergen haben könnte. Allergische Reaktionen auf Candida-Antigene scheinen durch die Behandlung mit Fluconazol nicht beeinflusst zu werden, vielleicht weil Fluconazol Candida nicht vollständig eliminieren kann oder trotzdem noch Candida-Antigene vorhanden sind.

IL-4 und IL-10 sind anti-inflammatorische Zytokine, die vor allem mit einer TH2-zellvermittelten Immunantwort zusammenhängen und bei Patientinnen mit CRVVC im Vaginalsekret gefunden wurden. Durch die verstärkte TH2-Aktivierung soll die der TH1-Zellen gedrosselt werden und somit auch die CMI (Fidel, 2004; Fiorentino, 1991). Daneben scheint IL-10, stärker als IL-4, inhibitorisch auf die Zytokin-Produktion in Makrophagen zu wirken und damit eine wichtige Rolle in der Regulierung von Entzündungen zu spielen (Fiorentino, 1991; Mosmann, 2007; Jeannin, 1996; Moore, 2001; Babula, 2005). IL-4 ist daneben für die gesteigerte Produktion von IgE und damit für eine auftretende Hypersensitivität verantwortlich (Fidel, 2004).

Interleukin-12 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin. Es stimuliert die Differenzierung von CD4-Zellen zu TH1-Zellen und hemmt die Bildung von TH2-Zellen. Dies wird als protektiver Mechanismus gegen eine Candida-Infektion angesehen (Weissenbacher, 2005; Romani, 1997; Rogge, 1997).

IL-4 ist nur vor der Therapie signifikant höher als in der Kontrollgruppe, es nimmt bereits in der Gruppe mit 6 Wochen Behandlung ab und bleibt auch in der mit 3 Monaten Behandlung auf diesem niedrigen Niveau. Dies ist auch im Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen zu sehen.

IL-10 ist dagegen zu allen Zeitpunkten gegenüber der Kontrolle erniedrigt, in der Gruppe mit 6-wöchiger Behandlung sogar signifikant. In der mit 3-monatiger Behandlung und auch im Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen ist eine leichte Zunahme an IL-10 zu erkennen.

IL-12 ist im Vergleich zur Kontrolle vor Behandlungsbeginn tendentiell erhöht, jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant, es sinkt bereits in der Gruppe mit 6 Wochen Behandlung unter die Kontrollwerte ab und bleibt auch in der mit 3 Monaten Behandlung so niedrig. Im Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen nimmt IL-12 sogar signifikant ab.

Da IL-4 für die gesteigerte Produktion von IgE verantwortlich ist, könnte die in der Gruppe vor Behandlungsbeginn signifikant erhöhte Konzentration an IL-4 für die dort ebenfalls signifikant erhöhte Konzentration an Gesamt-IgE verantwortlich sein. Dies würde wieder für allergische Reaktionen sprechen, die bei einigen Patientinnen mit CRVVC auftreten könnten, jedoch gegen andere Allergene als die von Candida.

Da IL-4 ebenfalls während der Behandlung mit Fluconazol abnimmt, könnte sich die Therapie positiv auf eine mögliche Hypersensitivität auswirken.

Ein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen an IL-4 und Candida-IgE besteht in dieser Studie entgegen einer von Weissenbacher et al. (2004) nicht. Dort wurde bei CRVVC-Patientinnen eine signifikante Erhöhung von IL-4 und Candida-IgE gefunden und damit eine allergische Reaktion auf Candida.

IL-4 ist aber auch bei chronischen Entzündungen als protektiver Mechanismus gegen eine überschießende pro-inflammatorische Reaktion aktiv. Es inhibiert die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1 und TNF- α) aus TH1-Zellen und die Makrophagen-Aktivierung (Babula, 2005). Das könnte auch eine mögliche Erklärung für die anfängliche Erhöhung von IL-4 sein.

Da IL-12 ein pro-inflammatorisches Zytokin ist, deutet die in der Gruppe vor Behandlung tendentiell erhöhte Konzentration an IL-12 auf entzündliche Reaktionen hin. Eine verstärkte TH1-Zellaktivität in Antwort auf eine Candida-Infektion (Weissenbacher, 2000; Romani, 1997; Cenci, 1998; Altamura, 2001) scheint hier nicht vorzuliegen, da IL-12 nicht signifikant erhöht ist. Ebenso ist eine Dysfunktion der CMI mit verminderter TH1- und verstärkter TH2-Zellaktivität, wie in der Literatur (Fidel, 1996; Fidel, 2004; Weissenbacher, 2005; Kosonen, 2006; Santoni, 2002) häufig als ursächlicher Mechanismus bei CRVCC-Patientinnen beschrieben, eher unwahrscheinlich.

Die deutlich gegenüber der Kontrolle erniedrigten IL-10 Spiegel sprechen auch gegen eine Dysfunktion der CMI als Ursache für das Auftreten einer CRVVC. Nach dieser Theorie müsste demnach IL-10 deutlich erhöht sein, da es zu einer verstärkten TH2-Zellaktivität kommt. Die anfänglich erhöhten IL-4 Spiegel hängen eher mit dem erhöhten Gesamt-IgE als mit einer verstärkten TH2-Antwort zusammen.

Fidel (2006) schließt ebenfalls eine Beteiligung der CMI an der Protektion gegen Candida und/oder der Infektion mit Candida aus und nimmt eine Dysfunktion des angeborenen Immunsystems als Ursache einer CRVVC an.

Einen Zusammenhang zwischen erhöhten bzw. erniedrigten Spiegeln und die gegenseitige Regulierung an IL-12 und IL-10 sowie auch IL-4 beschreiben viele Studien, kommen jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen.

So weisen Steele und Fidel (2002) auf mögliche Entzündungsvorgänge bei einer CRVVC hin, da sie eine Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α und TNF- α als Antwort auf eine Candida-Infektion nachgewiesen haben. Sie konnten keine erhöhten Spiegel von IL-12 und IL-10 feststellen.

In einer Studie von Lilic et al. (2003) wurden dagegen erniedrigte Spiegel für IL-12 und stark erhöhte Spiegel für IL-10 festgestellt, was als Feedback-Regulation auf pro-inflammatorische Vorgänge gedeutet wurde. Außerdem wurde eine Down-Regulation von IL-12 durch IL-10 vermutet. Auch andere Studien beschreiben den inhibitorischen Effekt auf IL-12 sowie Interferon- γ und den damit verbundenen protektiven Mechanismus bei Entzündungen (Mosmann, 2007; Jeannin, 1996).

Eine in vitro-Studie von Jeannin et al. (1996) zeigte, dass IL-12 einen stimulierenden Effekt auf die IL-4- und vor allem IL-10-Produktion in TH-Zellen hat, was auch auf einen Feedback-Mechanismus hindeutet. Auch in einem Mausmodell (Mencacci, 1998) wird von einem stimulierenden Effekt von IL-12 auf IL-10 hingewiesen.

Interessant ist auch, dass das Eicosanoid PGE₂ anscheinend einen Einfluss auf diese Interleukine hat. Es soll u.a. die IL-10- und IL-4-Produktion stimulieren und die von IL-12 inhibieren (Demeure, 1997).

In dieser Studie ist, wie schon erwähnt, IL-12 vor Behandlung tendentiell erhöht und IL-10 deutlich erniedrigt gegenüber der Kontrolle. IL-10 steigt erst nach 3-monatiger Fluconazol-Behandlung leicht an. In der Kontrollgruppe war IL-10 deutlich höher als bei den CRVVC-Patientinnen und IL-12 erniedrigt. Vor allem im Behandlungsverlauf einer Patientin sieht man bei der zweiten Probe, also während Behandlung, ein gegenüber der ersten Probe erniedrigtes IL-12 und erhöhtes IL-10.

Bei den gesunden Patientinnen könnte daher die bei Lilic et al. (2003) erwähnte Down-Regulation von IL-12 durch IL-10 zutreffen und dadurch das Auftreten von etwaigen Entzündungen unterbinden. Bei den CRVVC-Patientinnen könnte vor Behandlung eine lokale Inflammation in der Vagina überwiegen, die die Down-Regulation von IL-12 durch IL-10 zunächst nicht ermöglicht. Ob IL-12 zunächst nicht IL-10 stimuliert oder

andere Komponenten des Immunsystems, z.B. Makrophagen, in der Regulierung dieser Zytokine eine Rolle spielen, bleibt offen.

Durch die Langzeittherapie mit Fluconazol könnte die Entzündung vermindert werden und dadurch die protektive Wirkung von IL-10 ermöglicht werden.

Die zu den Eicosanoiden gehörenden Cys-Leukotriene und PGE₂ sind bedeutende Entzündungsmediatoren, die in Makrophagen produziert werden. PGE₂ soll einen inhibitorischen Effekt auf die TH1-Zellantwort haben, sowie auf die Phagozytose und die Lymphozyten-Proliferation (Witkin, 1988, Noverr, 2002; Witkin, 1986; Goodwin, 1983; Betz, 1991). Es soll dadurch die Umwandlung der apathogenen Blastosporen-Form von Candida in die pathogenere Hyphenform fördern (Fidel, 2004; Kalkon-Klein und Witkin, 1989). Die Cys-Leukotriene sind chemotaktische Faktoren (Noverr, 2002), die auch bei Allergien wie Asthma eine zentrale Rolle spielen (Riccioni, 2007). Beide können eine TH2-Zellantwort verstärken.

Die Cys-Leukotriene sind vor Behandlungsbeginn im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht, sinken aber in der Gruppe mit 6 Wochen Behandlung ab und in der mit 3 Monaten Behandlung noch weiter ab. Sie bleiben jedoch tendentiell erhöht gegenüber der Kontrolle. Auch im Behandlungsverlauf der gleichen Patientinnen nehmen sie ab.

PGE₂ ist vor Therapie gegenüber der Kontrolle erhöht und sinkt bereits in der Gruppe mit 6 Wochen Behandlung unter die Kontrollwerte ab, diese Werte sind jedoch nicht signifikant.

Die vor Behandlung signifikant erhöhten Spiegel der Cys-Leukotriene könnten einerseits in Zusammenhang mit dem erhöhten Gesamt-IgE und IL-4 vor Behandlung stehen und damit für eine allergische Komponente bei einigen CRVVC-Patientinnen sprechen. Leukotriene werden bei einer

durch IgE verursachten Mastzelldegranulation freigesetzt. Andererseits könnten die erhöhten Spiegel auch für eine lokale Entzündung vor Behandlung sprechen.

Auch Noverr (2002) vermutet, dass Leukotriene eine Entzündungsantwort auf pathogene Pilze verstärken können und Prostaglandine eine protektive TH1-Zellantwort abschwächen können. Dies könnte zu einer chronischen Pilzbesiedelung mit oder ohne Entzündungssymptomatik führen.

Die Beteiligung der Cys-Leukotriene bei einer inflammatorischen Antwort auf pathogene Pilze wurde auch in einem Mausmodell von Kustimur (1992) beschrieben.

Das vor Behandlung erhöhte PGE₂ könnte dessen Beteiligung an einer allergischen Komponente bei CRVVC-Patientinnen andeuten, aber auch bei einer lokalen Entzündung bei diesen. Entgegen anderen Studien ist hier kein Zusammenhang zwischen erhöhten Spiegeln von PGE₂ und Candida-IgE und damit das Vorliegen einer Candida-Allergie zu sehen.

So hat Witkin et al. (1988) PGE₂ nur in Zusammenhang mit Candida-IgE im Vaginalsekret gefunden.

Weissenbacher et al. (2004) kam zu einer signifikanten Erhöhung von PGE₂, IL-4 und Candida-IgE und konnte damit auch auf eine gegen Candida gerichtete allergische Komponente schließen.

In einem Modellversuch (Witkin, 1991) wurde außerdem festgestellt, dass in der Anwesenheit von Histamin und *Candida albicans* maximale Mengen an PGE₂ produziert wurden. In dieser Studie war zwar Gesamt-IgE signifikant erhöht, aber es wurden keine maximalen Mengen an PGE₂ produziert.

Für eine Beteiligung von PGE₂ an einer lokalen Entzündung spricht eine Studie von Castro (1996), in der festgestellt wurde, dass durch *C. albicans* stimulierte Monozyten IL-1-beta, TNF- α , IL-6 und IL-8 frei-

gesetzt wurde, alles proinflammatorische Zytokine. Ebenso wurde Arachidonsäure produziert, der Vorläufer der Eicosanoide. Die Arachidonsäure-Produktion scheint dabei durch Mannan- und β -Glucan-Komponenten des Pilzes stimuliert worden zu sein. Sie ist der Vorläufer von PGE_2 und den Cys-Leukotrienen.

Ein wie in der Literatur beschriebener inhibitorischer Effekt auf die TH1-Zellen und Förderung der TH2-Antwort (Witkin, 1988, Noverr, 2002) besteht in dieser Studie nicht. Sonst dürften nicht IL-12 und PGE_2 gleichzeitig erhöht sein, außerdem müsste IL-10 erhöht sein. Die erhöhten Spiegel von IL-4 stehen in Zusammenhang mit Gesamt-IgE.

Es ist anzunehmen, dass in dieser Studie zwei verschiedene Gruppen von Patientinnen mit CRVVC enthalten sind.

Bei der einen Gruppe scheint eine allergische Komponente vorhanden zu sein, darauf deuten die erhöhten Spiegel von IL-4, Gesamt-IgE und bedingt auch der Cys-Leukotriene hin. Eine auf Candida-spezifische Allergie konnte bei den meisten Patientinnen hier nicht erkannt werden, dennoch könnten auch in dieser Studie wenige Patientinnen mit einer Candida-Allergie enthalten sein.

Eine allergische Reaktion wird hier eher von Allergenen ausgelöst, die z.B. gegen die Spermien des Partners oder gegen Chemikalien in Toilettenpapier, Waschlotionen, Tampons oder auch gegen Pollen, Tierhaare oder Staub gerichtet sind. Diese werden mit den Fingern übertragen (Witkin, 1987, 1988).

Bei der anderen Gruppe könnte eine lokale Entzündung vorliegen, dafür sprechen die erhöhten Spiegel an IL-12, Cys-Leukotrienen und PGE_2 .

Als mögliche Ursache für diese lokale Inflammation könnte man eine verstärkte Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit Antigen-

präsentierenden Zellen vermuten, die ihrerseits wieder die TH-Zellen beeinflussen. So werden auch die Eicosanoide Cys-LT und PGE₂ aus Makrophagen ausgeschüttet und sind Entzündungsmediatoren, die auch einen Einfluss auf TH-Zellen haben. Diese These wird in der Literatur ebenfalls bekräftigt.

Lilic et al. (2003) vermuten, dass Patienten mit chronischen Candidosen der Schleimhaut auf Candida überreagieren durch eine überschießende Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. Sie vermuten, dass ein Defekt des angeborenen Immunsystems für die auftretende Entzündung verantwortlich ist, z.B. durch Stimulierung von Mannose-Rezeptoren, β -Glucan-Rezeptoren oder Toll-like-Rezeptoren. Stimulation von Mannose- und β -Glucan-Rezeptoren durch Candida führt zur Ausschüttung von Eicosanoiden, Toll-like-Rezeptoren dagegen zur Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und IL-8.

Die oben genannte These, also die Beteiligung des angeborenen Immunsystems an einer entzündlichen Reaktion, wird in anderen Arbeiten bestätigt (Barousse, 2005; Raska, 2007).

Fidel postuliert in einem Review (2007), dass Patientinnen mit CRVVC gegen Candida sehr intolerant sind und auf eine Candida-Besiedelung mit einer Entzündung reagieren, während Patientinnen mit asymptomatischer Besiedelung tolerant gegen den Pilz sind.

Manche Frauen haben nur etwa 100 Organismen/ml und haben starke Symptome einer Pilzinfektion, andere haben bis zu 10.000 Organismen/ml und sind asymptomatisch (Linhares, 2001).

Ein anderer Ansatz ist ein möglicher Gendefekt bei Patientinnen mit CRVVC. So wurde bei IL-4 ein Genpolymorphismus an Position 589 in der Promotor-Region des IL-4 Gens entdeckt, bei dem ein Cytidin gegen ein Thymin ausgetauscht ist. Dies führt zu einer gesteigerten IL-4

Produktion. Dieser Gendefekt kam bei 76,2% der Patientinnen mit CRVVC vor. Die erhöhten IL-4-Konzentrationen führten zu einer verstärkten Inhibierung protektiver Mechanismen des angeborenen Immunsystems, nämlich Mannose-bindendes Lektin (MBL) und Stickstoffoxid (NO).

Außerdem wurde von einer eingeschränkten Abwehrfunktion von vaginalen Epithelzellen gegen Candida berichtet, die als immun-kompetente Zellen gelten. In gleicher Studie wird auf viele weitere verwiesen, die keine Rolle für eine Beteiligung der systemischen oder lokalen CMI als Schutz gegen Candida bestätigen (Nomanbhoy, 2002; Barousse, 2005).

Nachfolgend wird kurz auf die untersuchten Frauen eingegangen, die die Ciprofloxacin/Nystatin-Ovula bekommen haben. Die hier erhaltenen Zytokinkonzentrationen geben Hinweise auf die möglichen molekularen Vorgänge bei Patientinnen mit Bakterien- und Pilzbefall. Um genauere Aussagen über diese treffen zu können, müssten jedoch Studien mit mehr Patientinnen durchgeführt werden, denn diese Gruppe umfasst 12 Frauen.

Bei Gesamt-IgE ist kein Unterschied zur Kontrollgruppe zu erkennen, es scheinen daher keine unspezifischen allergischen Reaktionen vorzuliegen.

Candida-IgE ist gegenüber der Kontrolle leicht erhöht, jedoch nicht signifikant.

IL-4 liegt auf Kontrollniveau, während IL-10, wie in den CRVVC-Gruppen, gegenüber diesem erniedrigt ist. IL-12 ist wie in den CRVVC-Gruppen deutlich erhöht.

Auch PGE₂ und die Cys-Leukotriene sind deutlich erhöht, vor allem PGE₂.

Bei diesen Patientinnen liegt entweder gleichzeitig ein Pilz- und Bakterienbefall vor oder eine bakterielle Infektion, die durch die Antibiotika-Behandlung leicht zu einer Pilzinfektion führen kann.

Hier liegen anscheinend vergleichbare Vorgänge vor, also eine lokale Entzündung, wie bei den CRVVC-Patientinnen.

Während der Behandlung mit Fluconazol über mindestens drei Monate ist ein Absinken von Gesamt-IgE, IL-12, PGE₂ und Cys-LT zu sehen. Die abnehmenden Zytokin-Spiegel sind auch schon nach 6 Wochen Behandlung zu sehen, nehmen jedoch nach 3-monatiger Therapie weiter ab.

Obwohl Fluconazol eine Candida-Kolonisation womöglich nicht eliminieren kann, scheint es sich positiv auf allergische und/oder inflammatorische Faktoren auszuwirken und sollte daher auf jeden Fall indiziert sein. Ebenso rechtfertigen die Ergebnisse eine Langzeittherapie mit Fluconazol.

Bei der Patientinnen-Gruppe, die eine lokale Entzündung als Hauptursache der CRVVC haben könnte, könnte eine zusätzliche Gabe von entzündungshemmenden Mitteln wie Diclofenac oder auch LT-Rezeptorantagonisten (White, 2004; Riccioni, 2007) von Vorteil sein.

Bei der Gruppe von Patientinnen, bei denen eine Allergie gegen bestimmte Allergene in der Vagina die Hauptursache der CRVVC sein könnte, könnte die zusätzliche Gabe von Antihistaminika (Neves, 2005) helfen. Bei diesen Frauen wäre außerdem eine Identifizierung des auslösenden Allergens sehr hilfreich, um selbiges zu vermeiden.

Eine Hyposensibilisierung mit Candida-Allergenen wurde bei Patientinnen mit CRVVC und positivem Candida-Hauttest in zwei Studien getestet und bei 79% (Rigg, 1990) bzw. 64% (Moraes, 2000) der Patientinnen eine Verbesserung der Symptomatik festgestellt. Eine Hyposensibilisierung könnte daher bei Patientinnen mit einer Candida-Allergie vorteilhaft sein.

Fidel und Sobel erwähnen in einer Arbeit (2004), dass mögliche immunologische Abnormalitäten während der Therapie abnehmen oder aufgehoben werden. Die schnelle Rückfälligkeit nach Absetzen der Therapie bei einer Reihe von Patientinnen wird dagegen als mögliche irreversible immunologische Dysfunktion gedeutet, die durch Absetzen der Pilzmittel wieder ansteigt. Bei Frauen, die dagegen nach der Langzeittherapie frei von Rückfällen sind, wird eine Re-Etablierung des möglichen Immundefekts angenommen.

5 Zusammenfassung

Da die Symptome einer vaginalen Pilzinfektion auch durch andere Erkrankungen der Scheide ausgelöst werden können, sollte die Ursache der Symptomatik immer zumindest durch einen kulturellen Nachweis überprüft werden. Eine alleinige mikroskopische Untersuchung ist zu unspezifisch.

Bei Patientinnen mit einer CRVVC kann ein Candida-Nachweis mittels PCR sinnvoll sein, da bei dieser Methode geringere Mengen an Candida nachgewiesen werden können. Diese reichen eventuell schon aus, um Symptome hervorzurufen.

Die Untersuchung von Zytokinen im Vaginalsekret zeigte vor Fluconazol-Einnahme eine Erhöhung an Gesamt-IgE, IL-4, IL-12, PGE₂ und Cys-Leukotrienen und eine Erniedrigung von IL-10.

Die anfänglich erhöhten Spiegel an Gesamt-IgE, IL-4 und bedingt der Cys-Leukotriene und PGE₂ deuten auf eine allergische Komponente bei einigen Patientinnen hin.

Die zu Beginn erhöhten Werte an IL-12, sowie auch der Cys-Leukotriene und PGE₂ sind ein Zeichen für eine lokale Entzündung bei den Patientinnen. Die nach 3-monatiger Therapie leicht zunehmenden Spiegel an IL-10 sprechen für das Abklingen einer anfänglichen Entzündung. Unter der Einnahme von Fluconazol über mindestens 6 Wochen näherten sich alle Parameter den Kontrollwerten an, d.h. die erhöhten Zytokine nahmen ab und das erniedrigte IL-10 zu.

Mögliche lokale immunologische Defekte, die zu allergischen Reaktionen und/oder lokalen Entzündungen führen könnten, werden anscheinend durch die Therapie positiv beeinflusst.

Um die Patientinnen spezifischer und dadurch auch effektiver behandeln zu können, sollten sie vor einer zusätzlichen Gabe von Antiphlogistika

oder Antihistaminika zur antimykotischen Therapie mittels immunologischer Tests auf eine Allergie gegen Candida oder andere allergene Substanzen sowie auf vorliegende Entzündungen überprüft werden.

6 Anhang

6.1 Geräteliste

6.1.1 Allgemein

Geräte

- Laminar-flow-box Typ Uniflow
Firma Uniequip
- Voretaxgerät Typ VF 2
Firma Janke&Kunkel, IKA Labortechnik
- Pipetten (1-1000 µl), Typ Reference
Firma Eppendorf
- Pipetten (1-1000µl), Typ Pipetman
Firma Gilson
- Tischzentrifuge (max. 10900 rpm)
Firma Abbott

6.1.2 Candida – Kultur

Geräte

- Mikroskop Typ Dialux
Firma Leitz
- Brutschrank Typ 2770
Firma Köttermann

6.1.3 DNA-Extraktion

Geräte

- Tischzentrifuge Typ Z 230 MR (max. 13000 rpm)
Firma Hermle
- Wasserbad Typ B3
Firma Haake

6.1.4 Candida – PCR

Geräte

- PCR – Gerät Typ Mastercycler Gradient
Firma Eppendorf

6.1.5 Gelelektrophorese

Geräte

- Waage Typ Mettler P 1200
Firma Mettler
- Mikrowellengerät Typ MC 653
Firma Udo Classen GmbH
- Gelelektrophorese – Apparatur
Typ Mini Sub Cell GT
Firma BioRad
- UV-Leuchtkasten Typ N 90, KW 254 nm
Firma Uni Equip
- Polaroidkamera Typ Polaroid Gel Cam
Firma UniEquip

- Spannungsquelle Typ EPS 500/400
Firma Pharmacia

6.1.6 ELISA

Geräte

- 8-fach Pipette, Typ Pipetman
Firma Gilson
- Plattenschüttler, Typ Vibromix 301 EVT
Firma Tehnica
- Wasserbad Typ B3
Firma Haake
- Spektralphotometer
Firma Anthos Labtec Instruments

6.2 Auswertungstabellen Patientinnen und Kontrollen

Patienttinnengruppen															
fortl. Nr.	Datum	Kultur	PCR	PCR Art	PG2	Geo-IGe	Cand-IGe	IL-4	IL-10	IL-12	LT	Dif Anf	Dif 6Wo	Dif 3Mo	RHG
2485	20.04.2006	neg	neg		2564,2	0	0,03	5,8	0,9	1,1	67,8	x			
2475	13.04.2006	neg	neg			3,4	0,052	2,2	0	10,9	524,1	x			
2499	27.04.2006	neg	neg		853,5	6,5	0,049	1,9	0	6	485,4	x			
2315	07.02.2006	neg	neg		100	1,7	0,08	15,3	0,9	8,5	247,3	x			
2206	01.12.2005	neg	neg		29,3	0,1	0,04	2,9	1,5	2,2	62,4	x			
2367	02.03.2006	neg	pos	albicans	124,3	0,3	0,059	3,4	3,2	0,5	170	x			
2291	26.01.2006	neg	pos	albicans	54,5	0,2	0,059	0,6	0	1,6	337,6	x			
2109	20.10.2005	neg	neg		192,4	0,2	0,043	3,4	0	0,5	142,2	x			
2127	28.10.2005	neg	neg		71,1	0,5	0,041	3,1	0	1,8	68,2	x			1
2144	04.11.2005	neg	neg		54,5	0,2	0,06	4	0	1,3	124,1	x			1
2486	20.04.2006	neg	neg		106,7	0	0,047	4,8	1,9	0	195,9	x			
2190	25.11.2005	neg	pos	albicans	807,9	0,8	0,034	1,7	0	2,9	1,3	x			2
2370	02.03.2006	neg	neg		2231,1	0,2	0,085	2,6	0	7,8	357,9	x			
2163	10.11.2005	neg	pos	beides	106,2	0,1	0,073	5,1	1,7	3,9	75,4	x			2
2165	10.11.2005	neg	pos	albicans	357,2	0,1	0,043	14,2	0	8,4	165,7	x			3
2208	01.12.2005	neg	neg		739,7	0	0,064	1,2	0	0	296,5	x			
2514	15.05.2006	neg	neg		75,4	4,1	0,058	6	2,3	0	113,2	x			
2250	22.12.2005	neg	neg		84,3	0	0,051	3,4	0	0	58,9	x			
2289	19.01.2006	neg	pos	albicans	0,2	0	0,049	0	0	0,4	53,9	x			
2168	10.11.2005	neg	pos	albicans	297,7	0	0,041	2	0	2,2	128,7	x			0
2486	06.04.2006	neg	neg		892,3	0	0,066	4,3	0	0,9	140,8	x			
2474	13.04.2006	neg	neg		439,8	0,6	0,041	3,1	0	16,7	172,1	x			
2178	18.11.2005	neg	pos	albicans	1750,4	0,9	0,075	1,3	0	0,4	1391,8	x			
2254	22.12.2005	neg	pos	albicans	314,6	0	0,061	3,7	0	0,1	76,3	x			
2167	10.11.2005	neg	pos	albicans	379,5	0	0,043	2,9	0	5,2	133,9	x			
2407	17.03.2006	neg	pos	albicans	2307,5	0,6	0,051	0	0	0	759,7	x			1
2243	16.12.2005	neg	neg		84	0	0,046	4	0	0,3	106,9	x			
2285	23.01.2006	neg	pos	albicans	222,1	0,4	0,045	0	0	0,6	781,1	x			1
2239	16.12.2005	neg	pos	albicans	67,6	0	0,032	3,2	0,4	1,2	112,7	x			
2222	09.12.2005	neg	pos	albicans	3,6	0,6	0,067	2,9	0	0,2	391,3	x			
2241	16.12.2005	neg	neg		1033,9	1,1	0,074	4,8	0,4	0,5	114,5	x			
2316	06.02.2006	neg	neg		595,7	0	0,079	11,9	1,9	10,4	149	x			
2223	09.12.2005	S.cerev+++	NN		105,9	0	0,057	2,6	0	1,4	244,7	x			
2436	23.03.2006	neg	neg		292,8	0	0,045	0	0	0	331	x			1
2354	25.02.2006	neg	neg		249,4	0	0,055	10,8	1	0	97,2	x			
2124	24.10.2005	glabrata+++	pos	beides	1687,9	0,1	0,093	37,6	1,7	26,2	530,7	x			
2392	10.03.2006	neg	pos	albicans	1003,3	0	0,047	6,5	5,7	0	98,9	x			2
2294	27.01.2006	neg	pos	albicans	2939,1	0,2	0,045	0	0	0,8	183,1	x			
2448	30.03.2006	neg	neg		80,1	0	0,034	1,9	6,1	4,7	113,2	x			
2255	22.12.2005	neg	neg		1323,1	0	0,046	4,6	0	1,1	99,3	x			1
2248	0.12.08.2006	neg	neg		711,1	0	0,044	0	0	6,8	63,9	x			
2321	09.02.2006	neg	neg		1507,7	0	0,053	3,7	5,4	4	269,1	x			
2322	10.02.2006	neg	neg			0	0,047	0,5	0	0	112,6	x			2
2425	24.03.2006	neg	neg		284,1	0	0,047	0	0	0	112,6	x			
2113	20.10.2005	neg	pos	albicans	36,1	0,3	0,039	2,4	0	0,6	86,3	x			
2453	30.03.2006	neg	pos	albicans	78,9	0	0,049	7,4	2,2	0,6	113,2	x			
2447	27.03.2006	neg	pos	albicans	219,9	0	0,056	1,2	0	0	31,2	x			1
2125	28.10.2005	neg	pos	albicans	2024,8	0	0,036	4,3	1,5	0,2	71,9	x			
2478	14.04.2006	neg	neg		30,1	1,4	0,049	6,6	0	1,9	108,7	x			1
2225	09.12.2005	neg	neg		59,3	0	0,065	3,4	0	3,1	127,9	x			
2481	20.04.2006	neg	neg			0	0,065	4,6	0	0,8	107,5	x			1
2287	23.01.2006	neg	neg		2655,2	0	0,048	0	0	0	107,5	x			
2455	30.03.2006	neg	neg		1292	0,1	0,065	5,9	0	9,8	112,6	x			
2253	22.12.2005	neg	neg		45,7	0	0,075	4,4	0	1,4	132,7	x			
2181	25.11.2005	neg	pos	albicans	152,8	0	0,037	8,6	5,1	10	99,9	x			3
2366	02.03.2006	neg	pos	albicans	270,2	0	0,06	1,5	1,2	0	177,8	x			1
2191	25.11.2005	neg	pos	albicans	152,8	1,5	0,047	6,9	0,5	2,8	177,8	x			1
2126	28.10.2005	neg	pos	albicans	1373,3	1	0,07	3,4	2,9	1	549,8	x			
2205	02.12.2005	neg	neg		142	0	0,049	0	3,4	10,4	108,5	x			
2384	02.03.2006	neg	neg			0	0,049	5,2	3,9	3,2	108,5	x			
2317	10.02.2006	neg	neg			0	0,049	27,8	24,6	95,9	118,8	x			3
2500	28.04.2006	neg	neg		142	0,6	0,035	2,5	0	0	325,2	x			
2271	12.01.2006	neg	neg			0	0,035	3,2	0	3,3	308,6	x			
2365	02.03.2006	neg	neg		622,2	0	0,059	3,4	2,5	1	332,9	x			
2319	10.02.2006	neg	pos	albicans	640,5	0,4	0,049	1,6	0,4	23,1	212,2	x			
2338	17.02.2006	neg	pos	albicans	29,1	0	0,065	0,8	0	0	756,5	x			1
2483	20.04.2006	neg	neg		29,1	6,3	0,078	27,4	5,8	21,8	25,5	x			
2226	09.12.2005	neg	neg		2733,4	0,7	0,055	3,4	2,5	1,4	478,1	x			1
2472	10.04.2006	neg	neg		82,6	0	0,053	3,6	1,8	0	30,2	x			3
2292	27.01.2006	neg	neg		91,6	0	0,061	1,7	0	1,5	77,9	x			1
2346	25.02.2006	neg	neg			0	0,038	3,8	0,5	2,2	58,6	x			2
2220	08.12.2005	neg	neg		1246,3	1,7	0,102	2,7	2,5	2,7	27,7	x			
2389	10.03.2006	neg	neg		1171,2	0,9	0,062	0,5	7	0	45,4	x			
2306	07.02.2006	neg	neg		1794,5	2,4	0,063	2,4	32	10,8	179,3	x			1
2180	18.11.2005	neg	pos	albicans	27,9	0,1	0,042	2,6	4,3	7,1	200	x			
2284	09.01.2006	neg	neg			0	0,046	4,8	0,6	0	285,1	x			
2324	10.02.2006	neg	neg			0	0,062	3,1	5	22,2	4	x			1
2129	28.10.2005	neg	neg		1373,3	0,5	0,047	2,5	0,2	0,4	55,2	x			
2219	09.12.2005	neg	neg		704,6	0,2	0,069	1,6	0	0	45,2	x			1
2373	03.03.2006	neg	neg		2230,9	0	0,07	3,1	5	3,8	98,3	x			
2186	25.11.2005	neg	pos	beides	1051,6	0,7	0,095	2,7	3	2,7	262,1	x			
2259	12.01.2006	neg	pos	albicans	1144,4	0	0,053	5,2	0	0	84,3	x			
2426	27.03.2006	neg	neg		148,6	1,1	0,053	24,2	0	3,4	48,5	x			1
2110	20.10.2005	neg	neg		439	3	0,11	4	0,5	25,3	271,5	x			
2350	25.02.2006	neg	neg			0	0,11	1,8	1,2	1	171,9	x			
2384	10.03.2006	neg	neg		2505,5	2	0,101	13	53,9	10,4	618,1	x			
2244	16.12.2005	neg	neg		126,1	0	0,068	5	2,6	0	66,2	x			1
2154	10.11.2005	neg	pos	albicans	1952,4	0,6	0,068	0	0	3,9	32,2	x			1
2383	03.03.2006	neg	neg		1286,8	0	0,06	5,4	3,4	4,5	342,9	x			
2204	02.12.2005	neg	neg		60	0,3	0,059	0,3	6	4,9	151,7	x			2
2288	23.01.2006	neg	neg		57,6	0	0,05	1	0,2	1,5	88,1	x			2
2482	03.03.2006	neg	neg		264,3	0	0,063	14,2	1,6	3,7	22,7	x			
2242	16.12.2005	neg	pos	albicans	53,6	0	0,042	3,5	0	0	101,4	x			
2293	26.01.2006	neg	neg		73,3	0	0,069	0,9	0	5,6	313,5	x			
2145	04.11.2005	neg	neg		32,7	0,4	0,049	3,8	0,7	2	117,1	x			
2177	18.11.2005	neg	pos	albicans	1261,5	0	0,098	0	0	13,2	618,4	x			
2202	02.12.2005	neg	neg		91,8	1,1	0,046	5,3	4,9	4,5	113,7	x			3
2465	06.04.2006	neg	neg		89	0	0,051	4,1	0	0	61	x			
2224	09.12.2005	neg	neg		40,7	0	0,065	4,2	0	2,4	323,6	x			
1788	21.04.2005	neg	neg		47,2	0	0,019	7,2	0	5,8	76,7	x			1
2138	31.10.2005	neg	neg												

Kontrollgruppe											
fortl. Nr.	Datum	Kultur	PCR	PCR Art	PGE2	Ges-IgE	Cand-IgE	IL-4	IL-10	IL-12	LT
2494	24.04.2006	neg	neg		1490,5	0	0,044	5	0	0	245
2378	07.03.2006	neg	neg				0,047	0,7	0	0	0,5
2495	28.04.2006	neg	neg		116,8	0,9	0,048	1,1	5,2	0	108,7
2308	07.02.2006	neg	neg		225,3	0	0,05	4,2	1,2	1,5	137
2414	20.03.2006	neg	neg		2564,2	0,4	0,047	3,5	7	6,6	39,7
2437	27.03.2006	neg	neg		1681,5	4,6	0,059	0,2	54,3	25,8	223
2471	10.04.2006	neg	neg		21	0	0,049	8,3	5,7	4	275,7
2460	03.04.2006	neg	neg		267,5	0,1	0,033	1,7	4,3	0	91,6
2430	24.03.2006	neg	neg		756,5	1,6	0,053	0	0	0	97,1
2444	27.03.2006	neg	neg		148,6	0	0,046	3,5	0	0	67,4
2439	27.03.2006	neg	neg		315,7	0	0,036	4,9	0	0	181,4
2173	07.03.2006	neg	neg		0	0	0,065	5,6	5	9,7	688
2351	25.02.2006	neg	neg		55,9	0,2	0,047	4,4	0	1,9	63,1
2416	20.03.2006	neg	neg		1490,5	0,9	0,053	0	19,3	9,5	152
2427	24.03.2006	neg	neg		131,7	0,4	0,047	5,2	0	3,1	70,7
2359	28.02.2006	neg	neg		222,1	0	0,058	0	0	0	79,6
2377	07.03.2006	neg	neg		920,6	0	0,062	2,2	0	0	106,8
2393	10.03.2006	neg	neg		934,2	2,9	0,05	1,8	2,9	0	264,6
2371	03.03.2006	neg	neg		86,5	1,4	0,046	0	180,7	43,7	48,2
2395	14.03.2006	neg	neg		1069,9	0	0,057	3	0	0,4	103
2386	10.03.2006	neg	neg		0	0	0,068	0	7,4	0,6	54,8
2443	27.03.2006	neg	neg		866,4	0	0,049	5,9	5,2	8,6	411,6
2463	07.04.2006	neg	neg		207	0	0,043	2,6	0	5,6	81,9
2462	07.04.2006	neg	neg		3,3	0	0,053	14,1	0,9	11	109,9
2461	07.04.2006	neg	neg		297,2	0	0,054	0,4	8,4	0	128,1
2497	28.04.2006	neg	neg		292,8	0	0,052	4,7	6,6	8,7	56,5
2418	20.03.2006	neg	neg		1189	0	0,043	4,9	0	4,2	922,8
2491	24.04.2006	neg	neg		1607,2	0	0,053	3,5	15,5	5,6	303
2349	25.02.2006	neg	neg		947,7	0	0,076	1,1	1,4	0	171
2469	10.04.2006	neg	neg		271,5	6	0,107	8,6	1,4	2	54,5
2405	17.03.2006	neg	neg		453,2	0	0,043	6,8	3,6	5,6	49
2397	14.03.2006	neg	neg		31,9	0	0,047	4,2	0	3,7	91
2423	20.03.2006	neg	neg		892,9	0	0,046	4,3	0	0,7	839,7
2355	28.02.2006	neg	neg		328,6	0	0,043	2,6	0	0	160,5
2399	14.03.2006	neg	neg		36	0	0,059	4,7	10,9	4,4	67,8
2309	07.02.2006	neg	neg		1901,8	0,1	0,057	3,7	0	0	123,3
2458	03.04.2006	neg	neg		660,6	0	0,046	4	0	4,9	118,7
2413	20.03.2006	neg	neg		54,1	0	0,04	2	2,7	1,8	67,4
2400	14.03.2006	neg	neg		691,1	0	0,059	0	7,4	54,7	64,7
2376	07.03.2006	neg	neg		161,4	0	0,053	0	0	0	49,6

6.3 Literaturverzeichnis

1. Fidel, P.L., Jr. and J.D. Sobel, *Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis*. Clin Microbiol Rev, 1996. **9**: p. 335-48.
2. Trama, J.P., Martin, E.A., Raphaelli, I., Stemmer, S.M., Mordechai, E., *Detection of Candida species in vaginal samples in a clinical laboratory setting*. Infect Dis Obstet Gynecol, 2005. **13**: p. 63-7.
3. Fidel, P.L., Jr and J.D. Sobel., *An intravaginal live Candida challenge in humans leads to new hypotheses for the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis*. Infect Immun, 2004. **72**: p. 2939-46.
4. Linhares, I.M., Witkin, S.S., Miranda, S.D., Fonseca, A.M., Pinotti, J.A., Ledger, W.J., *Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for Candida species by culture*. Infect Dis Obstet Gynecol, 2001. **9**: p. 221-5.
5. Xu, J. and J.D. Sobel, *Candida Vulvovaginitis in Pregnancy*. Curr Infect Dis Rep, 2004. **6**: p. 445-449.
6. Cheng, G., K.M. Yeater, and L.L. Hoyer, *Cellular and molecular biology of Candida albicans estrogen response*. Eukaryot Cell, 2006. **5**: p. 180-91.
7. Witkin, S.S., I.M. Linhares, and P. Giraldo, *Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2007.
8. Larsen, B., *Vaginal flora in health and disease*. Clin Obstet Gynecol, 1993. **36**: p. 107-21.
9. Fidel, P.L., Jr., *Immunity in vaginal candidiasis*. Curr Opin Infect Dis, 2005. **18**: p. 107-11.

10. Wozniak, K.L., Palmer, G., Kutner, R., Fidel, P.L., Jr., *immunotherapeutic approaches to enhance protective immunity against Candida vaginitis*. Med Mycol, 2005. **43**: p. 589-601
11. Fidel, P.L., Jr., *History and update on host defense against vaginal candidiasis*. Am J Reprod Immunol, 2007. **57**: p. 2-12.
12. Weissenbacher, S., Witkin, S.S., Tolbert, V., Giraldo, P., Linhares, I., Haas, A., Weissenbacher, E.R., Ledger, W.J., *Value of Candida polymerase chain reaction and vaginal cytokine analysis for the differential diagnosis of women with recurrent vulvovaginitis*. Infect Dis Obstet Gynecol, 2000. **8**: p. 244-7.
13. Weissenbacher, E.R., T. Weissenbacher, and H. Spitzbart, *Die Bedeutung der Interleukine und des Candida-IgE bei der chronisch rezidivierenden Vulvovaginalcandidose. The significance of interleukins and of Candida-IgE in chronic recurrent vulvovaginal candidosis*. Mycoses, 2004. **47**.
14. Witkin, S.S., J. Jeremias, and W.J. Ledger, *A localized vaginal allergic response in women with recurrent vaginitis*. J Allergy Clin Immunol, 1988. **81**: p. 412-6.
15. Weissenbacher, E.R., *Method for the local detection of inflammation and allergy mediators*, www.freepatentsonline.de, 2005
16. Kosonen, J., Rantala, A., Little, C.H., Lintu, P., Harjamäki, P., Georgiou, G.M., Cone, R.E., Savolainen, J. , *Increased levels of Candida albicans mannan-specific T-cell-derived antigen binding molecules in patients with invasive candidiasis*. Clin Vaccine Immunol, 2006. **13**: p. 467-74.

17. Kalo-Klein, A. and S.S. Witkin, *Prostaglandin E2 enhances and gamma interferon inhibits germ tube formation in Candida albicans*. Infect Immun, 1990. **58**: p. 260-2.
18. Ishiguro, A., Homma, M., Torii, S., Tanaka, K. , *Identification of Candida albicans antigens reactive with immunoglobulin E antibody of human sera*. Infect Immun, 1992. **60**: p. 1550-7.
19. Steele, C. and P.L. Fidel, Jr., *Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to Candida albicans*. Infect Immun, 2002. **70**: p. 577-83.
20. White, D.J., Vanthuyne, A., Wood, P.M., Ayres, J.G. , *Zafirlukast for severe recurrent vulvovaginal candidiasis: an open label pilot study*. Sex Transm Infect, 2004. **80**: p. 219-22.
21. Noverr, M.C., G.B. Toews, and G.B. Huffnagle, *Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi*. Infect Immun, 2002. **70**: p. 400-2.
22. Cormack, B.P., Falkow, S., *Leukotriene A4 hydrolase from candida albicans*. www.freepatentsonline.de, 1994
23. Oethinger, *Kurzlehrbuch Mikrobiologie und Immunologie*, 10. Auflage, Urban und Fischer, 2000
24. Thews, Mutschler, Vaupel, *Anatomie, Physiologie, Pathologie des Menschen*, 5.Auflage, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart , 1999
25. Cha, R. and J.D. Sobel, *Fluconazole for the treatment of candidiasis: 15 years experience*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2004. **2** p. 357-66.
26. Sobel, J.D., Wiesenfeld, Martens, M., Danna, P., Hooton, T.M.,et.al., *Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis*. N Engl J Med, 2004. 351: p. 876-83.

27. Fidel, P.L., Jr., J.A. Vazquez, and J.D. Sobel, *Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. albicans*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**: p. 80-96.
28. Neves, N.A., Carvalho, L.P., De Oliveira, M.A.M., Giraldo, P.C., Cruz, A.A., Carvalho, E.M., *Association between atopy and recurrent vaginal candidiasis*, Clin and Exp Immun, 2005, **142**: p. 167-171.
29. Lilic, D., Gravenor, I., Robson, N., Lammas, D.A., Drysdale, P., Calvert, J.E., Cant, A.J., Abinum, M., *Deregulated production of protective cytokines in response to Candida albicans infection in patients with chronic mucocutaneous Candidiasis*. Infect and Immun, 2003, **71**: p. 5690-5699.
30. Kustimur, S., *The role of eicosanoids in the kidney damage induced by Candida albicans*, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1992. **47** p. 83-4.
31. Weissenbacher, E.R. *Fluorpraktikum*, medifact publishing, 2001
32. Mutschler, *Arzneimittelwirkungen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 8. Auflage, 2001
33. Pascual, LM, Daniele, M.B., Pajaro, C., Barberis, L., *Lactobacillus species isolated from the vagina: identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance*, Contraception, 2006, **73**: p.78-81.
34. Forsum, U, Holst, E., Larsson, P.G., Vasquez, A., Jakobsson, T., Mattsby-Baltzer, I., *Bacterial vaginosis-a microbial and immunological enigma*, APMIS, 2005, **113**: p.81-90.
35. Falagas, ME, Betsi, G.I., Athanasiou, S., *Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review*, J Antimic Chemo, 2006, **58**:p.266-272.

36. Hill, L, Embil. J.A., *Vaginitis: current microbiologic and clinical concepts*, CAN MED ASSOC J, 1986, **134**: p.321-331.
37. Hill, GB, Eschenbach, D.A., Holmes, K.K., *Bacteriology of the vagina*, Scand J Urol Nephrol Suppl., 1984, **86**: p.23-39.
38. Eschenbach, DA, Davick, P.R., Williams, B.J., Klebanoff, S.J., Young-Smith, K., Critchlow, C.M., Holmes, K.K., *Prevalence of Hydrogen Peroxide-Producing Lactobacillus Species in Normal Women and Women with Bacterial Vaginosis*, J Clin Microbiol, 1989, **27**: p.251-256.
39. Larsen B and Monif G, *Understanding the Bacterial Flora of the Female Genital Tract*, C I D, 2001, **32**: p.69-77.
40. Mardh, PA, Novikova, N., Niklasson, O., Bekassy, Z., Skude, L., *Leukozyte esterase activity in vaginal fluid of pregnant and non-pregnant women with vaginitis/vaginosis and in controls*, Infect Dis Obstet Gynecol, 2003, **11**:p.19-26.
41. Novikova, N and Mardh, PA, *Characterization of women with a history of recurrent vulvovaginal candidosis*, Acta Obstet Gynecol Scand, 2002, **81**:p.1047-52.
42. Novikova, N., Rodrigues, A., Mardh, P.A., *Can the diagnosis of recurrent vulvovaginal candidosis be improved by use of vaginal lavage samples and cultures on chromogenic agar?*, Infect Dis Obstet Gynecol, 2002, **10**:p.89-92.
43. Nyirjesy, P, Seeney, S.M., Grodhy, M.H., Jordan, C.A., Buckley, H.R., *Chronic fungal vaginitis: the value of cultures*, Am J Obstet Gynecol, 1995, **173**:p.820-3.
44. Horvath, LL, Hospenthal, D.R., Murray, C.K., Dooley, D.P., *Direct Isolation of Candida spp. from Blood Cultures on the Chromogenic Medium Chromagar Candida*, J Clin Microbiol, 2003, **41**:p.2629-2632.

45. Mardh, PA, Novikova, N., Witkin, S.S., Korneeva, I., Rodrigues, A.R., *Detection of candida by polymerase chain reaction vs microscopy and culture in women diagnosed as recurrent vulvovaginal cases*, Int J STD AIDS, 2003, **14**:p.753-6.
46. Giraldo, P, von Nowaskonski, A., Gomes, F.A., Linhares, I., Neves, N.A., Witkin, S.S., *Vaginal colonization by Candida in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis*, Obstet Gynecol, 2000, **95**p:423-6.
47. Morace, G, Sanguinetti, M., Posteraro, B., Lo Cascio, G., Fadda, G., *Identification of Various Medically Important Candida Species in Clinical Specimens by PCR-Restriction Enzyme Analysis*, J Clin Microbiol, 1997, **35**:p.667-672.
48. Crampin, AC and Matthews RC, *Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP 90 gene fragment*, J Med Microbiol, 1993, **39**:p.233-8.
49. Moraes, PS, *Recurrent vaginal candidiasis and allergic rhinitis: a common association*, Ann Allergy Asthma Immunol, 1998, **81**:p.165-9.
50. Bermann B, *Seasonal allergic vulvovaginitis caused by pollen*, Ann Allergy, 1964, **22**:p.594-7.
51. Kudelko N, *Allergy in chronic monilial vaginitis*, Ann Allergy, 1971, **29**:p.266-7.
52. Moraes, PS, de Lima Goiaba, S., Taketomi, E.A., *Candida albicans allergen immunotherapy in recurrent vaginal candidiasis*, J Investig Allergol Clin Immunol, 2000, **10**:p.305-9.
53. Rigg, D, Miller, M.M., Metzger, W.J., *Recurrent allergic vulvovaginitis: treatment with Candida albicans allergen immunotherapy*, Am J Obstet Gynecol, 1990, **162**:p. 332-6.

54. Ricer, RE and Gutherie, RM, *Allergic vaginitis, a possibly new syndrome. A case report.*, J Reprod Med, 1988, **33**:p. 781-3.
55. Witkin, SS, *Immunology of recurrent vaginitis*, AM J Reprod Immunol Microbiol, 1987, **15**:p. 34-7.
56. Witkin, SS, Jeremias, J., Ledger, W.J., *Vaginal eosinophiles and IgE antibodies to Candida albicans in women with recurrent vaginitis*, J Med Vet Mycol, 1989, **27**:p. 57-8.
57. Babula, O, Lazdane, G. Kroica, J., Linhares, I., Ledger, W.J., Witkin, S.S., *Frequency of Interleukin-4-589 Gene Polymorphism and Vaginal Concentrations of IL-4, Nitric Oxide, and Mannose-Binding Lectin in Women with Recurrent Vulvovaginal Candidiasis*, C I D, 2005, **40**:p. 1258-62.
58. Romani, L, Mencacci, A., Grohmann, U., Mocci, S., Mosci, P., Puccetti, P., Bistoni, F., *Neutralizing antibody to interleukin-4 induces systemic protection and T helper type 1-associated immunity in murine candidiasis*, J Exp Med, 1992, **176**:p. 19-25.
59. Fiorentino, DF, Zlotnik, A., Mosmann, T.R. Howard, M., O'Garra, A., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages*, J Immunol, 1991, **147**:p. 3815-22.
60. Fiorentino, DF, Zlotnik, A., Mosmann, T.R. Howard, M., O'Garra, A., *IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by TH 1 cells*, J Immunol, 1991, **146**:p. 3444-51.
61. Mosmann, T, *TH1/TH2 cross regulation and the discovery of IL-10*, J E M, 2007, **2**:p. 237.
62. Jeannin, P, Delneste, Y., Seveso, M., Life, P., Bonnefoy, J.Y., *IL-12 synergizes with IL-2 and other stimuli in inducing IL-10 prduction by human T cells*, J Immunol, 1996, **156**:p. 3159-65.

63. Mencacci, A, Cenci, E., Del Sero, G., Fe de Ostiani, C., Mosci, P., Trinchieri, G., Adorini, L., Romani, L. *IL-10 is required for development of protective Th1 responses in IL-12-deficient mice upon Candida albicans infection*, J Immunol, 1998, **161**:p. 6228-37.
64. Moore, KW, de Waal, M., Coffmann, R.L., O'Garra, A., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*, Annu Rev Immunol, 2001, **19**:p. 683-765.
65. Romani, L, Bistoni, F., Puccetti, P., *Initiation of T-helper cell immunity to Candida albicans by IL-12: the role of neutrophils*, Chem Immunol, 1997, **68**:p. 110-35.
66. Romani, L, Bistoni, F., Puccetti, P., *Interleukin-12 in infectious diseases*, Clin Microbiol Rev, 1997, **10**:p. 611-36.
67. Rogge, L, Barberis-Maino, L., Biffi, M., Passini, N., Presky, D.H., Gubler, U., Sinigaglia, F., *Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells*, J Exp Med, 1997, **185**:p. 825-31.
68. Cenci, E, Mencacci, A., Del Sero, G., dÓstiani, C.F., Mosci, P., Bacci, A., Montagnoli, C., Kopf, M., Romani, L., *IFN-gamma is required for IL-12 responsiveness in mice with Candida albicans infection*, J Immunol, 1998, **161**:p. 3543-50.
69. Chehimi, J, Elder, M., Greene, J., Noroski, L., Stiehm, E.R., Winkelstein, J.A., Sullivan, K.E., *Cytokine and chemokine dysregulation in hyper-IgE syndrome*, Clin Immunol, 2001, **100**:p. 49-56.
70. Arzneimitteldatenbank ABDA, 2007, www.abda.de

71. Witkin, SS, Kalo-Klein, A., Galland, L., Teich, M., Ledger, W.J., *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, 1991, **164**:p. 396-9.
72. Witkin, SS, Hirsch, J., Ledger, W.J., *A macrophage defect in women with recurrent Candida vaginitis and its reversal in vitro by prostaglandin inhibitors*, Am J Obstet Gynecol, 1986, **155**:p. 790-5.
73. Goodwin, JS and Ceuppens, J, *Regulation of the immune response by prostaglandins*, J Clin Immunol, 1983, **3**:p. 295-315.
74. Castro, M, Bjoraker, J.A., Rohrbach, M.S., Limper, A.H., *Candida albicans induces the release of inflammatory mediators from human peripheral blood monocytes*, Inflammation, 1996, **20**:p. 107-22.
75. Chouaib, S, Chatenoud, L., Klatzmann, D., Fradelizi, D., *The mechanisms of inhibition of human IL 2 production. II. PGE2 induction of suppressor T lymphocytes*, J Immunol, 1984, **132**:p. 1851-7.
76. Bonney, RJ and Humes, JL, *Physiological and pharmacological prostaglandin and leukotriene production by macrophages*, J Leukoc Biol, 1984, **35**:p. 1-10.
77. Demeure, CE, Yang, L.P., Desjardins, C., Raynauld, P., Delespresse, G., *Prostaglandin E2 primes naïve T cells for the production of anti-inflammatory cytokines*, Eur J Immunol, 1997, **27**:p. 3526-31.
78. Betz, M and Fox, BS, *Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines*, J Immunol, 1991, **146**:p. 108-13.

79. Fidel, PL, Lynch, M.E., Redondo-Lopez, V., Sobel, J.D., Robinson, R., *Systemic cell-mediated immune reactivity in women with recurrent vulvovaginal candidiasis*, J Infect Dis, 1993, **168**:p. 1458-65.
80. Nyirjesy, P, Vazquez, J.A., Ufberg, D.D., Sobel, J.D., Boikov; D.A., Buckley, H.R., *Saccharomyces cerevisiae vaginitis: transmission from yeast used in baking*, Obstet Gynecol, 1995, **86**:p. 326-9.
81. Pappas, P, Rex, J.H., Sobel; J.D., Filler, S.G., Dismukes, W.E., Walsh, T.J., Edwards, J.E., *Guidelines for Treatment of Candidiasis*, C I D, 2004, **38**:p. 161-89.
82. Sobel, JD, *Treatment of vaginal Candida infections*, Expert Opin Pharmacother, 2002, **3**:p. 1059-65.
83. Santoni, G, Boccanera, M., Adriani, D., Lucciarini, R., Amantini, C., Morrone, S., Cassone, A., de Bernardis, F., *Immune cell-mediated protection against vaginal candidiasis: evidence for a major role of vaginal CD4(+) T cells and possible participation of other lymphocyte effectors*, Infect Immun, 2002, **70**:p. 4791-7.
84. Nomanbhoy, F, Steele, C., Yano, J., Fidel, P.L., Jr., *Vaginal and Oral Epithelial Cell Anti-Candida Activity*, Infect Immun, 2002, **70**:p. 7081-88.
85. Altamura, M, Casale, D., Pepe, M., Tafaro, A., *Immune responses to fungal infections and therapeutic implications*, Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2001, **1**:p. 189-97.
86. Marrazzo, J, *Vulvovaginal candidiasis*, B M J, 2003, **326**:p. 993-4.
87. Owen, MK and Clenney, TL, *Management of vaginitis*, Am Fam Physician, 2004, **70**:p. 2125-32.

88. Neves, NA, Carvalho, L.P., Lopes, A.C., Cruz, A., Carvalho, E.M., *Successful treatment of refractory recurrent vaginal candidiasis with cetirizine plus fluconazole*, J Low Genit Tract Dis, 2005, **9**:p. 167-70.
89. Barousse, MM, Espinosa, T., Dunlap, K., Fidel, P.L., Jr., *Vaginal Epithelial Cell Anti-Candida albicans Activity is associated with Protection against Symptomatic Vaginal Candidiasis*, Infect Immunol, 2005, **73**:p. 7765-7767.
90. Gültekin, B, Yazici, B., Aydin, N., *Distribution of Candida species in vaginal specimens and evaluation of CHROMagar Candida medium*, Mikrobiyol Bul, 2005, **39**:p. 319-24.
91. Meyer, H, Goettlicher, S., Mendling, W., *Stress as a cause of chronic recurrent vulvovaginal candidosis and the effectiveness of the conventional antimycotic therapy*, Mycoses, 2006, **49**:p. 202-9.
92. Ringdahl, EN, *Recurrent vulvovaginal candidiasis*, Mo Med, 2006, **103**:p. 165-8.
93. Mijac, VD, Dukic´, S.V., Opavski, N.Z., Ranin, L.T., , *Hydrogen peroxide producing lactobacilli in women with vaginal infections*, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2006, **129**:p. 69-76.
94. Ventolini, G, Baggish, M.S., Walsh, P.M., *Vulvovaginal candidiasis from non-albicans species: retrospective study of recurrence rate after flucoanzole therapy*, J Reprod Med, 2006, **51**:p. 475-8.
95. Sobel, JD, *Management of recurrent vulvovaginal candidiasis: unresolved issues*, Curr Infect Dis Rep, 2006, **8**:p. 481-6.
96. Mashburn, J, *Etiology, diagnosis, and management of vaginitis*, J Midwifery Womens Health, 2006, **51**:p. 423-30.

97. Ray, D, Goswami, R., Banerjee, U., Dadhwal, V., Goswami, D., Sreenivas, V., Kochupillai, N., *Prevalence of Candida glabrata and its response to boric acid vaginal suppositories in comparison with oral fluconazole in patients with diabetes and vulvovaginal candidiasis*, Diabetes Care, 2007, **30**:p. 312-7.
98. Vrablik, J, Masata, J., Jedlickova, A., Hájková, M., *Prospective study the prevalence of different candida strains and their sensitivity to different antimycotic treatment with vulvovaginal candidiasis*, Ceska Gynekol, 2007, **72**:p. 27-32.
99. Fosch, S, Fogolín, N., Azzaroni, E., Pairetti, N., Dana, L., Minacori, H., Tita, I., Redona, M., Gribaudo, G., *Vulvovaginitis: correlation with predisposing factors, clinical manifestations and microbiological studies*, Rev Argent Microbiol, 2006, **38**:p. 202-5.
100. Raska, M, Beláková, J., Krupka, M., Weigl, E., *Candidiasis-do we need to fight or to tolerate the Candida fungus?*, Folia Microbiol(Praha), 2007, **52**:p. 297-312.
101. Riccioni, G, Bucciarelli, T., Mancini, B., Di Ilio, C., D`Orazio, N., *Antileukotriene drugs: clinical application, effectiveness and safety*, Curr Med Chem, 2007, **14**:p. 1966-77.
102. El-Din, SS, Reynolds, M.T, Ashbee, H.R., Barton, R.C., Evans; E.G., *An investigation into the pathogenesis of vulvovaginal candidosis*, Sex Transm Infect, 2001, **77**:p. 179-83.
103. Donders, G, *Das Mikroskop in der gynäkologischen Praxis: Obsolet oder unzureichend genutzt?*, Speculum- Zeitschrift für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2004, **22**: p.14-23.

6.4 Abkürzungen

s.u.	Siehe unten
s.o.	Siehe oben
N	Anzahl
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
CRVVC	Chronisch-Rezidivierende-Vulvo-Vaginale-Candidose
Cipro/Nys	Ciprofloxacin/Nystatin
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Absorbent-Assay
x	Fach (5x = 5-fach)
fg	Femtogramm
°C	Grad Celsius
IL	Interleukin
IE	Internationale Einheiten
LT	Leukotrien
Max	Maximalwert
max.	Maximal
Min	Minimalwert
µM	Mikro Mol
µg	Mikrogramm

µl	Mikroliter
mA	Milli Ampere
mM	Milli Mol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minuten
M	Mol
nm	Nanometer
Neg	Negativ
N	Normal
o.A.	Ohne Angaben
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	Picogramm
Pos	Positiv
PGE2	Prostaglandin-E2
RT	Raumtemperatur
RHG	Reinheitsgrad
rpm	Rounds per minute
sec	Sekunden
s	Standardabweichung
h	Stunde
U	Units
V	Volt
H ₂ O	Wasser

Tabelle 27: Verzeichnis der Abkürzungen

6.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. E.R. Weissenbacher für die Übertragung dieses interessanten medizinischen Dissertationsthemas, sowie die fachliche Unterstützung.

Danken möchte ich außerdem Herrn Prof. Dr. med. H. Spitzbart für die Unterstützung während dem Anfertigen der Arbeit sowie für die Ratschläge während der Korrektur. Ebenfalls möchte ich Frau Dr. Gabriele Anton danken, die mir mit großer Geduld alle experimentellen Verfahren im Labor erklärt hat und immer eine Ansprechpartnerin für mich war.

Mein persönlicher Dank gilt meinen Eltern, Doris und Gerd, meiner Großmutter Inke und Bernd. Sie alle haben mich immer motiviert und bestens unterstützt. Ebenso wie Silke Lautenschläger, die meine Arbeit stilistisch überprüft hat.