

**OVER HET ONTSTAAN VAN HET ZURE MILIEU
IN DE VAGINA**

OVER HET ONTSTAAN VAN HET ZURE MILIEU IN DE VAGINA

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE
AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT TE ROTTERDAM
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
PROF. DR. B. LEIJNSE
EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.
DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATS VINDEN OP
WOENSDAG 21 JUNI 1978
DES NAMIDDAGS TE 3.00 UUR PRECIES

DOOR

JACOBUS CORNELIS HAGE

geboren te Rotterdam

1978

grafische verzorging:
davids decor alblaserdam

PROMOTOR: PROF. DR. A.C. DROGENDIJK
CO-REFERENTEN: PROF. DR. J.J. VAN DER WERFF TEN BOSCH
DR. J.W. WLADIMIROFF

Aan mijn vrouw,
onze kinderen Alexandra en Juliette en
onze wederzijdse ouders.

VOORWOORD

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd uitgevoerd op de gynaecologische afdeling van het Academisch Ziekenhuis Dijkzigt en het Sint Franciscus Gasthuis te Rotterdam.

Prof. Dr. A.C. Drogendijk, die het idee opperde voor dit onderzoek en onder wiens leiding dit proefschrift tot stand kwam, ben ik zeer erkentelijk voor zijn grote inzet en waardevolle kritiek.

Prof. Dr. J.J. van der Werff ten Bosch en Dr. J.W. Wladimiroff dank ik voor hun belangstelling en kritische beoordeling van het manuscript. Grote bewondering en dank voel ik voor Dr. A. Helbing, hoofd van het klinisch-chemisch laboratorium van het Sint Franciscus Gasthuis, door wiens inspanning de glycogeen- en lactaatbepalingen toegepast konden worden op de fluor vaginalis. Peter de Bot verzorgde met grote nauwgezetheid de uitvoering hiervan.

De bereidheid van Dr. H. Ottens, hoofd van het bacteriologisch laboratorium van het Sint Franciscus Gasthuis, om het microbieel onderzoek te verzorgen stemt mij tot grote dankbaarheid.

De samenwerking met Dr. J.M.J. Lamers, van de afdeling Biochemie I van de Erasmus Universiteit (hoofd Prof. Dr. W.C. Hülsman), was bijzonder prettig. Door zijn inspanning werd de DNA-bepaling van de fluor vaginalis mogelijk.

Dr. F.H. de Jong, hoofd van het steroïed laboratorium van de Erasmus Universiteit, die gelegenheid bood tot het bepalen van het oestradiol en progesteron en Mej. Evelyn Cappon, die de technische uitvoering hiervan verzorgde als ook van de DNA-bepalingen, ben ik zeer erkentelijk.

Met grote inzet voerde Drs. A. Volovics, van de afdeling Biostatistica van de Erasmus Universiteit (hoofd Dr. R. van Strik), de statistische bewerking uit.

Drs. E.M. van Ingen en de afdeling Histichemie en Cytochemie te Leiden dank ik voor het verrichten van de fluorometrische DNA bepalingen.

De samenwerking met en de hulp van Mevrouw Rogier-van der Have bij de technische uitvoering van het onderzoek was mij tot grote steun. De accuratesse en snelheid van Mevrouw Hartman-Willemse bij het uittypen van het manuscript waren een essentiële bijdrage tot het tot stand komen hiervan.

Mijn associés en andere collegae in het Sint Franciscus Gasthuis dank ik voor hun hulp en interesse.

Tenslotte gaan mijn gevoelens van dankbaarheid uit naar haar, aan wie dit proefschrift in eerste instantie is opgedragen. Haar opvang in het gezin en haar begrip voor de moeilijkheden in deze tijd waren een grote stimulans.

INHOUD

Hoofdstuk 1.	Voorwoord	6
Hoofdstuk 2.	Opzet, uitvoering en bewerking van het onderzoek	13
2.1.	Opzet van het onderzoek	13
2.2.	Uitvoering van het onderzoek	13
2.3.	Bewerking van het onderzoek	14
Hoofdstuk 3.	Het plasma oestradiol- en progesterongehalte in het verloop van de menstruele cyclus	17
3.1.	Literatuur	17
3.2.	Eigen onderzoek van het oestradiol- en progesterongehalte in het plasma	19
	Methodiek	19
	Nauwkeurigheid van de bepaling	19
3.2.1.	Resultaten van het onderzoek	19
	Longitudinaal onderzoek	19
	Transversaal onderzoek	20
Hoofdstuk 4.	De hoeveelheid fluor vaginalis	27
4.1.	Literatuur	27
4.2.	Eigen onderzoek	28
	Verzamelmethode van de fluor vaginalis	28
	Nauwkeurigheid van de methode	28
4.2.1.	Resultaten van het onderzoek	30
	Longitudinaal onderzoek	30
	Transversaal onderzoek	33
Hoofdstuk 5.	Het DNA-gehalte van de fluor vaginalis	35
5.1.	Literatuur	35
5.2.	Eigen onderzoek	36
	Onderzoek naar het voorkomen van polyploidie	

	in vagina epitheel	36
	DNA-gehalte van de fluor vaginalis	36
	Principe van de DNA-bepaling	36
	Methodiek	37
	Nauwkeurigheid van de bepaling	38
5.2.1.	Resultaten van het onderzoek	38
	Longitudinaal onderzoek	38
	Transversaal onderzoek	38
Hoofdstuk 6.	Het glycogeengehalte van de fluor vaginalis	43
6.1.	Literatuur	43
6.2.	Eigen onderzoek	45
	Principe van de glycogeen-bepaling	45
	Methodiek	46
	Nauwkeurigheid van de bepaling	46
6.2.1.	Resultaten van het onderzoek	47
	Longitudinaal onderzoek	47
	Transversaal onderzoek	48
Hoofdstuk 7.	Lactaatgehalte van de fluor vaginalis	51
7.1.	Literatuur	51
7.2.	Eigen onderzoek	51
	Principe van de lactaat-bepaling	51
	Methodiek	52
	Nauwkeurigheid van de bepaling	53
7.2.1.	Resultaten van het onderzoek	53
	Longitudinaal onderzoek	53
	Transversaal onderzoek	54
Hoofdstuk 8.	pH bepaling van de fluor vaginalis	57
8.1.	Literatuur	57
	Toegepaste methoden voor de pH meting van de fluor vaginalis	57
	Colorimetrische methode	57
	Elektrometrische methode	58
	Het principe van de glaselektrode	58
	Literatuurgegevens over de vaginale pH meting . .	59

	De vaginale pH bij fysiologische en geïnfecteerde fluor vaginalis	59
	Het verloop van de vaginale pH gedurende de menstruele cyclus	60
	De pH gradient in de vagina.	61
8.2.	Eigen onderzoek	62
	Methodiek.	62
8.2.1.	Resultaten eigen onderzoek.	63
	Longitudinaal onderzoek.	63
	Transversaal onderzoek.	68
Hoofdstuk 9.	De vaginale flora	69
9.1.	Literatuur	69
9.2.	Eigen onderzoek	72
	Methodiek.	72
9.2.1.	Resultaten eigen onderzoek.	72
	Longitudinaal onderzoek.	72
	Transversaal onderzoek.	74
Hoofdstuk 10.	Bespreking van de onderlinge relaties der varia- belen-konklusies	77
	Samenvatting.	89
	Summary.	95
	Literatuurlijst	99
	Curriculum vitae	102

HOOFDSTUK 1

Inleiding

De bekleding van de vagina bestaat uit plaveiselepitheel, dat opgebouwd is uit een basale, intermediaire en superficiële laag; de laatste bevat het meeste glycogeen (Rakoff e.a. 1944, Matter 1955, Gregoire e.a. 1971).

De fluor vaginalis bevat glycogeen door exfoliatie van de oppervlakkig cellen.

Döderlein (1892), die met een lakmoespapiertje vaststelde dat het vaginale milieu zuur reageert, legde verband tussen het voorkomen in de vagina van lactobacillen en melkzuur. Hij veronderstelde, dat het melkzuur door de lactobacillen wordt gevormd uit het glycogeen van de afgeschilferde epitheelcellen. Zijn theorie leek ondersteund door de klinische waarneming dat juist of vooral bij rijkelijke aanwezigheid van lactobacillen de fluor vaginalis zuur reageert.

Als nuttige functie van het zure karakter van het vaginale milieu werd gezien het voorkomen van opstijgende infecties. Deze theorie vond zo algemeen ingang dat deze zich tot heden als een vast gegeven in de vaginale fysiologie heeft gehandhaafd.

Toch werden sinds de oorsprong van de theorie wel enkele waarnemingen gedaan die met de conceptie van melkzuurproductie door de commensaal lactobacillus ter bescherming tegen andere, pathogene infecties, duidelijk in strijd waren. Cruickshank en Sharman (1934) toonden melkzuur aan in de neonatale vagina vóór bacteriële invasie had plaats gevonden, wat er op wees dat de aanwezigheid van een bacteriële flora voor de vorming van een melk-zuur milieu wellicht niet nodig is. Stewart - Tull (1964) kon onder 42 geïsoleerde lactobacillus stammen geen enkele vinden, die zelfstandig, d.w.z. zonder toevoeging van het enzym glycogenase, in staat bleek glycogeen in melkzuur om te zetten. Wylie en Henderson (1969) vonden onder eveneens 42

uit de menselijke vagina gekweekte lactobacillus stammen slechts een drietal dat in staat was vagina glycogeen tot melkzuur om te zetten. Uit deze waarnemingen bleek duidelijk dat de vaginale lactobacillus gewoonlijk niet in staat is tot wat de theorie van hem verwacht.

In feite is bij herhaling gebleken, dat het vaginale milieu wel altijd meer of minder sterk zuur is maar dat bij de geslachtsrijpe vrouwen zónder fluorklachten lang niet altijd een lactobacillus in de vagina de enige of voornaamste aanwezige bakteriesoort is, ja dat lactobacillus zelfs geheel kan ontbreken. Veel minder is bekend over de feitelijke samenstelling van de vaginale fluor in chemisch opzicht, zeker wat betreft de kwantiteit van de componenten die met het typisch sterk zure karakter van de fluor te maken hebben. Het moge overdreven lijken, het is het niet: over het fysiologische milieu van de vagina, één van de meest bekende en best toegankelijke holtes van het menselijke lichaam, is nog vrijwel niets bekend. Dit ook nog niet tegenstaande het feit dat deze holte zeer frekvent tot medische klachten leidt en sinds lang reeds met de meest uiteenlopende middelen wordt behandeld, van arseenverbindingen tot yoghurt toe.

Ons onderzoek had tot doel enige kennis te krijgen over de ogeneschijnlijk belangrijkste componenten van het fysiologische vaginale milieu, ook wat betreft hun te verwachten relatie met de menstruele cyclus. Een verder gelegen doel was na te gaan in hoeverre de bevindingen zich zouden verdragen met de meest voor de hand liggende theorie over het ontstaan van het sterk zure karakter van het vaginale milieu. Deze theorie gaat uit van het anaerobe karakter van de celstofwisseling in de oppervlakkige lagen van de vaginawand en in de vaginaholte met als gevolg de produktie van melkzuur door de vagina epitheelcellen en dus sterke verzuring van de gevormde fluor vaginalis..

HOOFDSTUK 2

Opzet, uitvoering en bewerking van het onderzoek

2.1. De opzet van het onderzoek

De opzet van het onderzoek was om bij vrouwen in de fertiele levensfase met normaal vaginaal milieu vast te stellen hoe de pH in de vagina is op de verschillende tijdstippen van de menstruele cyclus en hoe de fluor vaginalis in de loop van de cyclus is, wat betreft de hoeveelheid, het celgehalte en de voor de pH vermoedelijk belangrijke factoren glycoegeenhalte en lactaatgehalte. Uitgegaan werd van de stelling, dat van een normaal vaginaal milieu kan worden gesproken als de betreffende vrouw géén fluorklachten heeft en als haar fluor macroscopisch normaal van aspect is. Om de te onderzoeken fluorfactoren te kunnen betrekken op de cyclus diende bij ieder onderzoek de cyclusdag, het rangnummer bepaald als gebruikelijk vanaf de eerste dag der laatste menstruatie, genoteerd te worden én het plasma oestradiol en progesteron gehalte bepaald te worden. Om praktische redenen (zie 2.3.) zou slechts bij een klein aantal vrouwen longitudinaal onderzoek gedaan kunnen worden en moest de vraagstelling verder worden geëvalueerd uit een transversaal onderzoek.

2.2. De uitvoering van het onderzoek

Het onderzoek vond plaats in de periode van januari '76 tot juni '77. Voor deelneming aan het onderzoek werden gekozen gezonde vrouwen, die om redenen van nakontrolé na een laparoscopische sterilisatie of anticonceptie (IUD) de gynaecologische polikliniek van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam Dijkzigt, van het Sint Franciscus Gasthuis te Rotterdam of van het Elisabeth Gasthuis te Haarlem bezochten. Het longitudinaal onderzoek beperkte zich tot een 5-tal vrou-

wen; elk van hen werd in de loop van een enkele cyclus driemaal per week onderzocht. Het transversaal onderzoek betrof 137 vrouwen; elk van hen werd, op een willekeurige dag van de cyclus, slechts éénmaal onderzocht.

Alle vrouwen moesten voldoen aan de volgende criteria:

1. leeftijd van minimaal 18 en maximaal 40 jaar
2. regelmatige menstruele cyclus (26-30 dagen)
3. geen gebruik van een hormonaal anticonceptivum
4. geen fluorklachten
5. macroscopisch normaal aspect van de fluor

Onder een macroscopisch normaal aspect is te verstaan dat de fluor wit is, smeug, vrijwel reukloos en in matige hoeveelheid aanwezig.

Bij de uitvoering van het onderzoek bevond de vrouw zich in steensnede ligging. Na het instellen van de vaginawand met een eendenbek speculum, werd in de laterale fornix m.b.v. een steriel wattenstokje materiaal afgenomen voor microbiel onderzoek; vervolgens werd de vaginale pH gemeten, waarna alle macroscopisch aanwezige fluor werd afgezogen in een cupje met bekend gewicht.

Vervolgens werd bloed afgenomen uit de vena cubiti ter bepaling van het plasma- oestradiol- en progesterongehalte.

Van de vaginale fluor werd bepaald:

1. het gewicht
2. de DNA-koncentratie
3. de glycogeen concentratie
4. de lactaat concentratie.

2.3. Bewerking van het onderzoek

Een optimale statistische benadering zou m.b.v. een tijdreeks analyse uitgevoerd kunnen worden. Hiervoor zou bij een aantal vrouwen, over meerdere cycli (4-5) dagelijks waarnemingen omtrent de betrokken variabelen moeten worden gedaan.

In de praktijk is zulk een onderzoek niet mogelijk door het ontbreken van vrouwen die aan zo'n belastend onderzoek zouden willen (en kunnen) meewerken, alsook door het feit dat zó frekwent uitgevoerde bepalingen de samenstelling van het vaginale milieu te sterk zouden beïnvloeden.

Voor het onderzoek naar de veronderstelde relatie tussen de fluorsamenstelling en de menstruele cyclus moest daarom worden volstaan met het verkrijgen van een indruk uit een longitudinaal onderzoek bij een zeer beperkt aantal vrouwen en werd nadere evaluatie van deze indruk nagestreefd vanuit een transversaal onderzoek bij een veel groter aantal vrouwen.

In het longitudinaal onderzoek werd een vijftal vrouwen betrokken. Het hierbij verkregen resultaat werd niet statistisch geanalyseerd omdat het aantal waarnemingen (drie onderzoeken per week per vrouw) daarvoor niet toereikend was.

Voor de bewerking van de gegevens van het transversale onderzoek – gegevens niet weinig in aantal maar in de tijd gespreid over de menstruele cyclus én een enorme individuele spreiding vertonend – werd een benadering gekozen die speciaal gericht is op het feit dat de verschillende onderzochte variabelen door een proces in de tijd – de cyclus – geordend zijn. Om voor elke variabele dat verloop in de tijd zichtbaar te maken werden de waarden verwerkt met de empirisch heuristische aanpak van het één dimensionaal gladstrijken volgens de methode van "smoothing of sequences" (Tukey 1977). Om van de zo verkregen curven de significantie van een eventueel stijgend of dalend verloop na te gaan werd Kendalls korrelatie coëfficiënt berekend. Om de functionele relatie tussen twee variabelen onderling zichtbaar te maken werden de gegevens bewerkt en in een kromme weergegeven middels bepalen van "median traces" en twee dimensionaal gladstrijken (Tukey 1977). Deze techniek is slechts exploratief, levert een suggestie maar geenszins een bewijs voor het karakter van de onderzochte relatie. Door een bepaalde relatie op twee geheel verschillende manieren te onderzoeken – in feite het uitzetten van een variabele tegen het cyclusverloop én tegen een van de andere onderzochte variabelen – kan het gewicht van een verkregen suggestie aanmerkelijk worden verzwakt, nl. dan als beide opstellingen van de gegevens in dezelfde richting wijzen.

HOOFDSTUK 3

Het plasma oestradiol- en progesteron-gehalte in het verloop van de menstruele cyclus

3.1. Literatuur

Sedert de toepassing van de radio-immuno-assay ter bepaling van FSH, LH, oestradiol en progesteron, zijn meerdere onderzoeken verricht naar het verloop van het plasma-gehalte van deze hormonen bij vrouwen met een regulaire ovulatoire cyclus (Mishell e.a. 1971, Shaaban en Klopper 1973).

Deze onderzoeken hebben aangetoond, dat in de folliculaire fase het LH-gehalte geleidelijk iets stijgt en het FSH-gehalte, alleen pre-ovulatoir, iets daalt. Minstens 13 dagen voor het begin van de volgende menstruatie stijgen tegelijkertijd zowel het LH- als FSH-gehalte significant. In de luteale fase daalt het LH-gehalte en blijft het FSH-gehalte gelijk, dus lager dan in het grootste deel van de folliculaire fase.

Het oestradiol-gehalte is laag gedurende de menstruatie (omstreeks 40 pg/ml); hierna treedt eerst geleidelijk, daarna snel een stijging op tot een piek-waarde van 150 - 400 pg/ml omstreeks het midden van de menstruele cyclus. De oestradiolpiek gaat 24 - 36 uur vooraf aan de LH-piek van de ovulatie (Mishell e.a. 1971). Na de top daalt het oestradiol tot een waarde van omstreeks 40 pg/ml. Dit wordt gevolgd door een stijging, die altijd beneden de midcyclische piek blijft. Het bereikte niveau wordt ongeveer 6 dagen gehandhaafd, waarna 3 tot 5 dagen voor het begin van de menstruatie waarden bereikt worden als tijdens de menstruatie.

Het progesteron-gehalte is tot het optreden van de oestradiolpiek laag ($< 0,1$ ng/ml). Een tot twee dagen na de oestradiolpiek, rond het midden van de cyclus, treedt een stijging op tot een niveau van omstreeks 12 ng/ml, dat ongeveer 6 dagen blijft bestaan; 2 tot 6 dagen

voor het begin van de menstruatie volgt een daling tot het preovulatoire niveau. Het progesteron-gehalte stijgt niet vóór de LH-piek (Mishell e.a. 1971). Om van meerdere menstruele cycli het verloop van het plasma gehalte van deze hormonen te kunnen vergelijken, wordt gewoonlijk het optreden van de LH- of oestradiolpiek als referentiepunt genomen. Het etmaal waarin deze piek optreedt wordt aangeduid als dag O, de dagen van de folliculaire en luteale fase worden vanuit dit punt genummerd en respectievelijk aangegeven met een (-) teken of (+) teken.

Tabel 1.

Recovery, precision en interassay variatie coëfficiënt van de bepaling van het plasma 17β -oestradiolgehalte.

1. *Recovery*: 107.0 ± 16.7 (S.D.) % (n = 63) voor 30, 50, 70 en 100 pg/ml.

2. *Precision*

<i>pg/ml</i>	<i>aantal bepalingen</i>	<i>variatie coëfficiënt</i> %
0- 50	30	19.3
51- 100	30	15.5
101- 200	30	13.5
>200	30	12.5

3. *Interassay variatie coëfficiënt*

<i>pg/ml</i>	<i>aantal bepalingen</i>	<i>variatie coëfficiënt</i> %
50	72	17.1
pool I 85.5 ± 18.3 (S.D.)	62	21.3
pool II 108.9 ± 23.4 (S.D.)	9	21.5

3.2. Eigen onderzoek van het oestradiol- en progesteron-gehalte in het plasma

Bij 5 vrouwen werd een longitudinaal onderzoek verricht door bij elk van hen gedurende één cyclus driemaal per week bloed af te nemen voor een bepaling van het oestradiol- en progesterongehalte en bij dezelfde gelegenheid de pH in de vagina te meten, een kweek af te nemen voor microbiel onderzoek en de fluor uit de vagina te verzamelen voor het meten van de hoeveelheid en voor het bepalen van glyco-geen-, lactaat- en DNA-gehalte.

Een transversaal onderzoek naar het verloop van dezelfde parameters in de menstruele cyclus werd gedaan bij 137 vrouwen; bij elk van hen werd slechts éénmaal in de cyclus bloed afgenomen en een vaginaal onderzoek verricht.

Methodiek

De gebruikte bepalingsmethode van oestradiol en progesteron is beschreven door de Jong e.a. (1973) en door de Jong e.a. (1974).

Nauwkeurigheid van de bepaling

Alle bepalingen werden in duplo uitgevoerd. In de bepalingsreeksen t.b.v. ons onderzoek werden zowel voor oestradiol als progesteron monsters uit een plasma pool meegenomen. De recovery, precision en interassay variatiecoëfficiënt voor oestradiol en progesteron zijn weergegeven in tabel 1 en 2.

3.2.1. Resultaten van het onderzoek

Longitudinaal onderzoek

De gevonden waarden voor oestradiol en progesteron zijn, in curve uitgezet, weergegeven in figuur 1 en 2, met als referentiepunt de oestradiolpiek. Het verloop van de curve komt overeen met wat verwacht mocht worden. Het tijdstip waarop bij de 5 vrouwen de oestradiolpiek werd vastgesteld varieerde tussen de 12de en 19e cyclusdag.

Transversaal onderzoek

Van elke patiënte werd wel de datum van de laatste menstruatie vóór het onderzoek genoteerd, niet de datum van de eerste menstruatie na het onderzoek. Daarom zijn de cyclusedagen alleen van rangnummer te voorzien uitgaande van de laatste menstruatiedatum en niet terugrekenend van de eerste dag van de volgende cyclus. Ten behoeve van het onderzoek naar de relatie tussen hoeveelheid en samenstelling van de vaginale fluor enerzijds en het plasma gehalte van de geslachtsteroiden oestradiol en progesteron anderzijds, vormt het ovulatietijdstip een draaipunt: pas na de ovulatie komt de invloed van het proges-

Tabel 2.

Recovery, precision en interassay variatie coëfficiënt van de bepaling van het plasma progesteron-gehalte.

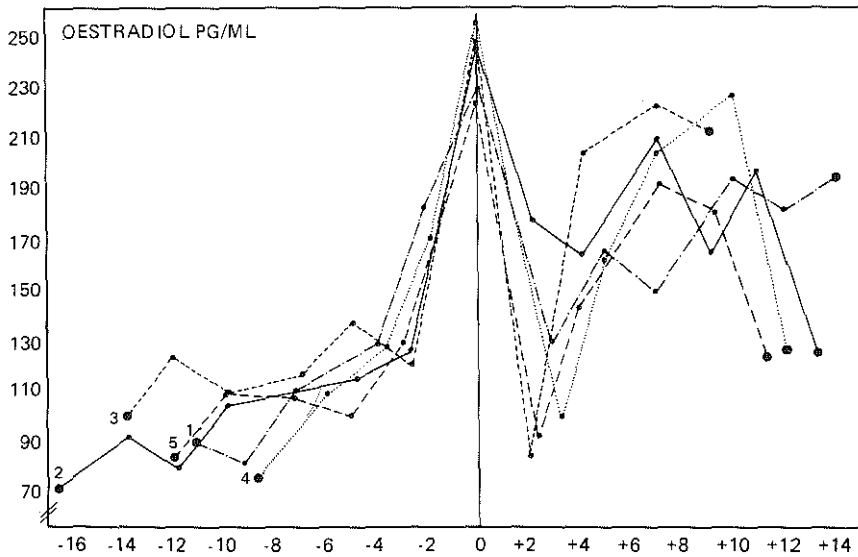
1. *Recovery*: bedraagt $103.2 \pm 17.5\%$ ($n = 62$) voor 20, 50, 100, 200 en 400 pg/ml.

2. *Precision*

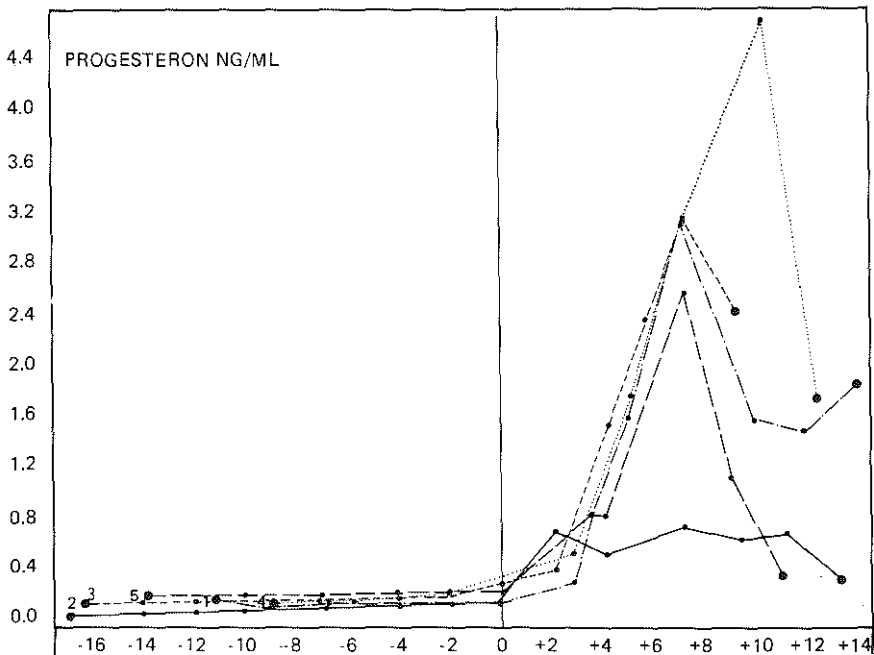
$\mu\text{g}/100 \text{ ml}$	<i>aantal bepalingen</i>	<i>variatie coëfficiënt</i> %
0 - 0,10	30	39.2
0,11 - 0,50	30	26.9
0,51 - 1,00	30	15.5
> 100	30	18.2

3. *Interassay variatie coëfficiënt*

$\mu\text{g}/\text{ml}$	<i>aantal bepalingen</i>	<i>variatie coëfficiënt</i> %
pool I $0,06 \pm 0,02$ (S.D.)	8	33.3
pool II $0,34 \pm 0,06$ (S.D.)	12	17.1



Figuur 1. Het verloop van het plasma oestradiolgehalte bij de 5 vrouwen van het longitudinaal onderzoek. Als cycluserferentiepunt werd bij iedere vrouw de dag van de maximum oestradiolwaarde genomen.



Figuur 2. Het verloop van het plasma progesterongehalte bij de 5 vrouwen van het longitudinale onderzoek. Als cycluserferentiepunt werd bij iedere vrouw de dag van de maximum oestradiolwaarde genomen.

teron op de vagina in het geding. Het rangnummer in de cyclus van de dag waarop het onderzoek plaats vond, geeft in veel gevallen niet met voldoende zekerheid aan of het tijdstip pre- of postovulatoir was. Bij de al grote biologische spreiding in het ovulatietijdstip in de normale cyclus van precies 28 dagen komt nog eens de spreiding voor de cyclus lengte.

Toch is het voor de interpretatie van de gegevens van het fluor onderzoek essentieel te weten of een gegeven waarde van een pre- of post-ovulatoir tijdstip afkomstig is. In principe is in de meeste gevallen dit probleem op te lossen door rekening te houden met het gevonden plasma progesteron-gehalte, dat vóór en na de ovulatie duidelijk verschilt. Alle gevallen waarin het niveau van het plasma progesteron-gehalte onzekerheid laat of ovulatie al of niet reeds heeft plaatsgevonden, kunnen buiten de verdere bewerking van de onderzoek-gegevens worden gelaten. Zowel uit de literatuur als op grond van genoemde eigen ervaring kan worden gesteld, dat bij een plasma progesteron-gehalte van $< 0,1$ ng/ml de folliculaire fase nog niet voorbij is en bij een gehalte van $> 0,2$ ng/ml de luteale fase zeker begonnen is. Bij een progesteron-gehalte van $0,1 - 0,2$ ng/ml kan redelijke twijfel bestaan of de overgang van folliculaire naar luteale fase gemaakt is.

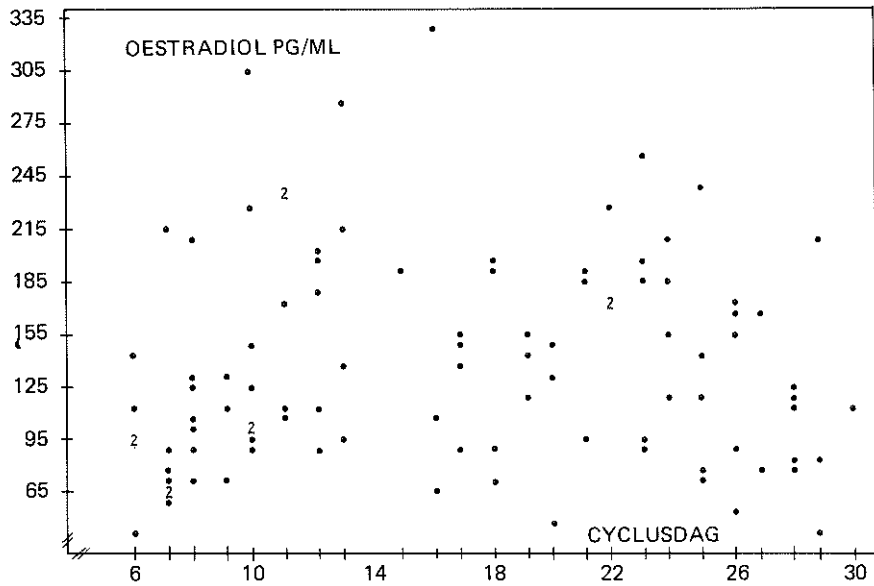
Tabel 3 toont op welke wijze de cyclus ten behoeve van ons onderzoek werd ingedeeld en hoeveel gevallen, wegens twijfel aan hun juiste indeling op grond van het plasma progesteron-gehalte uit de bewerking van de onderzoek resultaten werden geweerd. Een zeer belangrijk aspect van deze selectie is, dat geen redelijke twijfel bestaat, dat de in de evaluatie betrokken vrouwen, die op grond van de cyclusdag "luteaal" zouden moeten zijn, ook werkelijk geovuleerd hebben.

Figuur 3 en 4 geven de gevonden oestradiol en progesteron waarden in het plasma weer van de vrouwen, die werden opgenomen in het transversaal onderzoek. Na statistische bewerking van deze plasma oestradiol en progesteron waarden (3R SSH3 plots; Tukey 1977) ontstaat een curve voor het plasma oestradiol en progesteron zoals weergegeven in fig. 5 en 6; deze curves geven een beeld als beschreven bij het longitudinaal onderzoek.

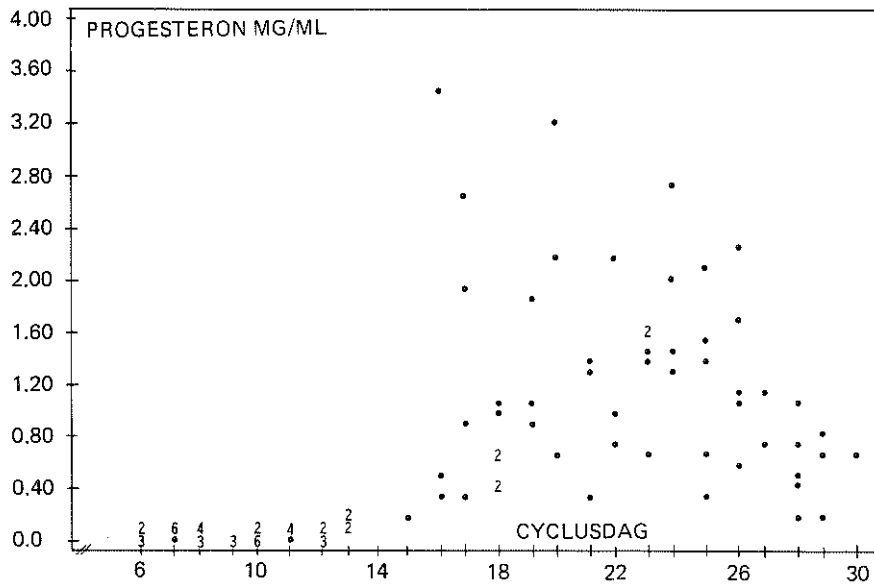
Tabel 3.

fase van de cyclus	rangnummer cyclusdag	vereist plasma progesteron-gehalte (ng/ml)	aantal vrouwen	
			totaal	behouden voor evaluatie
vroege proliferatie fase	1 - 8	$\leq 0,10$	22	19
late proliferatie fase	9 - 12	$\leq 0,10$	25	21
peri-ovulatoire fase	13 - 15	$0,10 < > 0,20$	25	5
vroege luteale fase	16 - 19	$\geq 0,20$	18	16
late luteale fase	20 - 27	$\geq 0,20$	37	30
premenstruele fase	28 - 30	$\geq 0,20$	<u>10</u>	<u>9</u>
			137	100

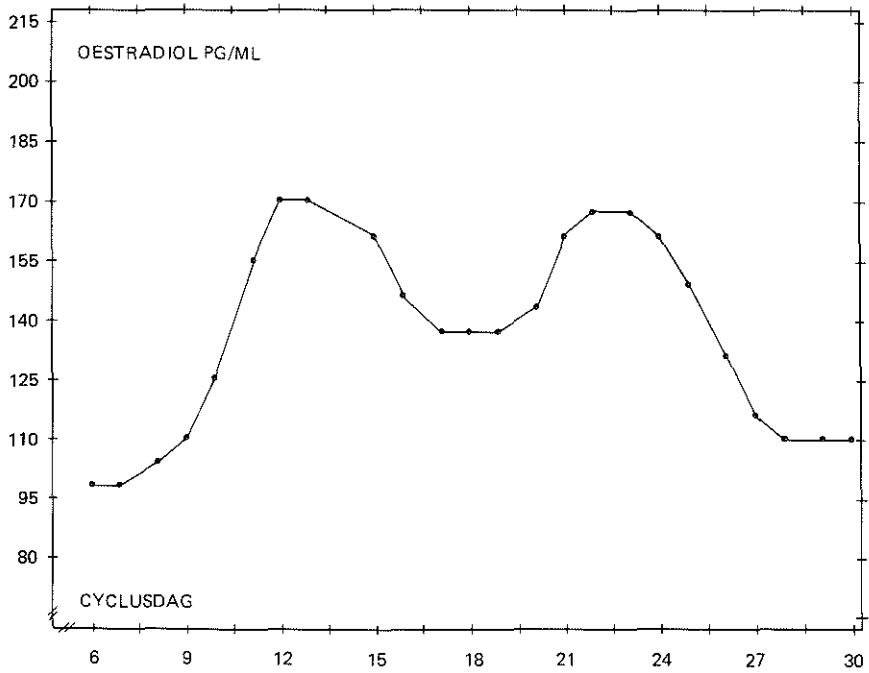
De op grond van het plasma progesteron-gehalte uitgevoerde selectie bij de 137 vrouwen, die oorspronkelijk in het transversale onderzoek werden betrokken.



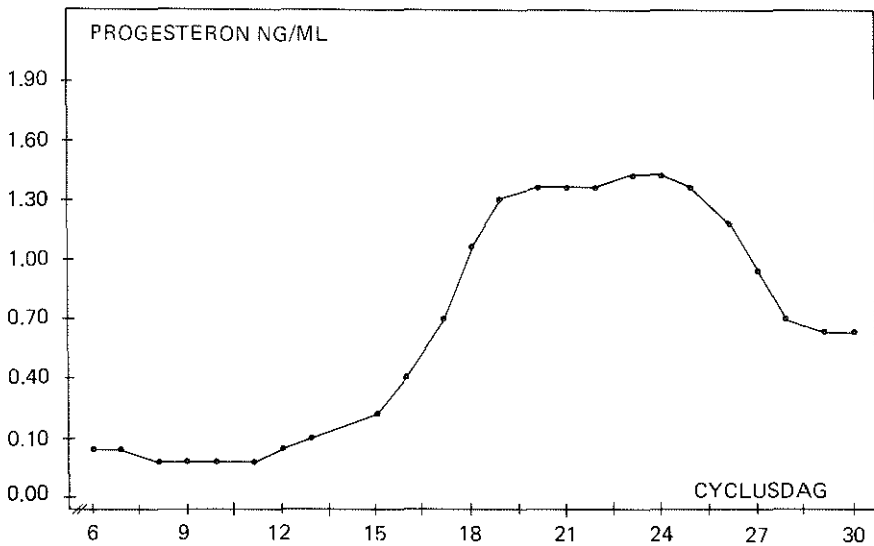
Figuur 3. De plasma-oestradiol gehalten van de 100 vrouwen die opgenomen werden in het transversaal onderzoek, uitgezet tegen de cyclusedagen.



Figuur 4. De plasma progesteron gehalten van de 100 vrouwen van het transversaal onderzoek, uitgezet tegen de cyclusedagen.



Figuur 5. De relatie van het plasma-oestradiolgehalte t.o.v. de cyclusedagen, na een smoothing sequences bewerking van de gegevens uit fig. 4.



Figuur 6. De relatie van het plasma progesterongehalte t.o.v. de cyclusedagen na een smoothing sequences bewerking van de gegevens uit figuur 4.

HOOFDSTUK 4

De hoeveelheid fluor vaginalis

4.1. Literatuur

Bij een onderzoek naar de fysiologische hoeveelheid fluor vaginalis dient o.m. te worden gelet op de te hanteren definitie van fysiologische fluor, op het tijdstip in de cyclus dat het onderzoek plaatsvindt en op de methode, die voor het verzamelen van de fluor wordt gebruikt.

Over de in de vagina aanwezige hoeveelheid fluor vaginalis is weinig onderzoek gedaan en, voor zover ons bekend, in het geheel geen onderzoek dat adequate criteria van bruikbaarheid kan doorstaan.

Voor de hoeveelheid fluor, ongerelateerd aan het cyclustijdstip, vond Schröder (1925) een gemiddelde hoeveelheid van 0,3 gram (spreiding 0,1 tot 1,2 g), Göttinger e.a. (1955) 0,8 g (spreiding van 0,5 tot 1,75 g). De eerst genoemde auteur gebruikte voor het verzamelen van de fluor een spatel; in het andere onderzoek werd een tampon gebruikt, die 3 uur in de vagina verbleef.

Wel gerelateerd aan de menstruele cyclus was het onderzoek van Stone en Gamble (1959). Zij verzamelden de fluor vaginalis bij 113 vrouwen door de vagina droog te wassen met een tampon. De hoeveelheid fluor werd bepaald door wegen van de tampon vóór en na het wassen. De zo bepaalde hoeveelheid fluor vaginalis bedroeg gemiddeld 0,76 gram (S.D. \pm 0,04 g). Niet werd aangegeven aan welke cyclus voorwaarde de onderzochte vrouwen moesten voldoen. Het onderzoek omvatte ook vrouwen met fluorklachten en patienten bij wie vaginale irrigaties hadden plaatsgevonden. De meeste fluor, gemiddeld 1,0 g kon worden verzameld in de ovulatie periode (13e t/m 16e dag na de L.M.). Er was echter tussen geen van de gemiddelde waarden over telkens 4 aaneengesloten dagen van de cyclus, waaronder de reeds genoemde periode van de 13e t/m de 16e dag, een significant verschil.

Geen van de door ons in de literatuur gevonden onderzoeken over de fysiologisch in de vagina aanwezige hoeveelheid fluor, voldeed aan elementaire voorwaarden van bruikbaarheid.

4.2. Eigen onderzoek

Verzamelmethode van de fluor vaginalis

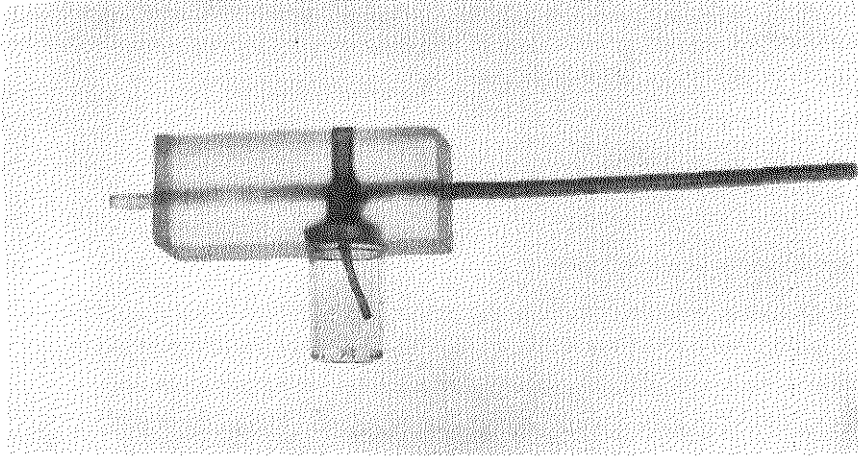
De door andere onderzoekers gebruikte methoden voor fluor verzamelen leken ons niet geschikt. Bij het gebruik van een spatel zal door het strijken over de vagina-wand de cellulaire component van de fluor kunstmatig worden vergroot. Hetzelfde geldt voor het wassen met een tampon. Bij het toepassen van een tampon, die gedurende enige tijd in de vagina wordt gelegd, zal door gretiger opzuigen van vocht dan van cellen de waterige component van de fluor kunstmatig kunnen worden vergroot en blijft het onzeker of bij het verwijderen van de tampon de aanwezige fluor wel maximaal wordt meegenomen. Bovendien prikkelt de tampon in de vagina wellicht tot grotere productie en is mede verzamelen van cervixsekreet niet te vermijden.

De beste methode leek ons à vue alle op de vagina-wand aanwezige fluor op te zuigen met een voor dit doel ontworpen zuigapparaatje (Figuur 7).

De verzameling van de fluor verliep als volgt. De vrouw bevond zich in steensnede ligging. De vagina werd met een eendenbek speculum ingesteld. Na het verrichten van een vaginale pH meting en het afnemen van kweek voor microbiologisch onderzoek, werd alle op de vagina-wand zichtbare fluor opgezogen in het plastic verzamelcupje. Het plastic cupje, voorzien van een afsluitdopje, werd voor en na de verzameling gewogen.

Nauwkeurigheid van de methode

De nauwkeurigheid van de methode hangt af van de nauwkeurigheid van het verzamelen als zodanig, van het mogelijke waterverlies uit de verzamelde fluor door de over het verzamelcupje strijkende luchtstroom en van de gebruikte balans.



Figuur 7. Voor dit onderzoek ontworpen apparaatje voor het verzamelen van de fluor vaginalis; de fluor vaginalis wordt opgevangen in een hierop aangesloten cupje van auto-analyzer; de zuigkracht wordt verkregen door aansluiting op een waterstraalpompje.

Het verzamelen gebeurde zo nauwkeurig mogelijk doordat éénzelfde onderzoeker de vagina-wand op zoveel mogelijk dezelfde wijze afzoog met vermijden van cervixsekreet.

Het bij de zuigmethode onvermijdelijke waterverlies uit de fluor werd tijdens het fluor verzamelen niet gemeten. Om een schatting te maken voor het waterverlies tijdens het verzamelen werd het volgende onderzoek gedaan. Een microcupje met de daarin op boven vermelde wijze verzamelde fluor vaginalis werd nogmaals aangesloten op het zuigapparaatje; gedurende 90 sekonden, de gemiddeld benodigde tijd voor het verzamelen van alle aanwezige vaginale fluor, werd d.m.v. het waterstraalpompje een luchtstroom over het fluor monster gezogen. De hierdoor opgetreden gewichtsvermindering werd bij 10 monsters fluor bepaald door twee wegingen en bedroeg 3,2% (± 2.1 S.D.) De nauwkeurigheid van de balans bedroeg 0,1 mg. Niet vergeten mag worden dat vóór het bepalen van de hoeveelheid in de vagina aanwezige fluor reeds een zekere onnauwkeurigheid werd teweeg gebracht door het afnemen van fluor voor de microbiële kweek. Om bij benadering vast te stellen hoeveel fluor bij het afnemen van een kweek aan de hoeveelheid fluor onttrokken wordt, werd bij 10 vrouwen bepaald hoeveel de kweekwat hierdoor in gewicht toeneemt. Dit be-

droeg gemiddeld 33.6 mg (15.5 – 46.7 mg). Door deze laatste omstandigheid zal de gemeten hoeveelheid fluor ongeveer 10-15% beneden de werkelijke waarde liggen.

4.2.1. Resultaten van het onderzoek

Longitudinaal onderzoek

De gemiddeld per onderzoek gemeten hoeveelheid fluor vaginalis met de gevonden spreiding, is voor elk van de 5 onderzochte vrouwen in tabel 4 weergegeven. Er blijken aanzienlijke verschillen in dat gemiddelde te zijn, zowel interindividueel als intraindividueel.

In figuur 8 is voor de 5 vrouwen de per onderzoek gemeten hoeveelheid fluor in het verloop van de menstruele cyclus, met de oestradiolpiek als referentiepunt, uitgezet.

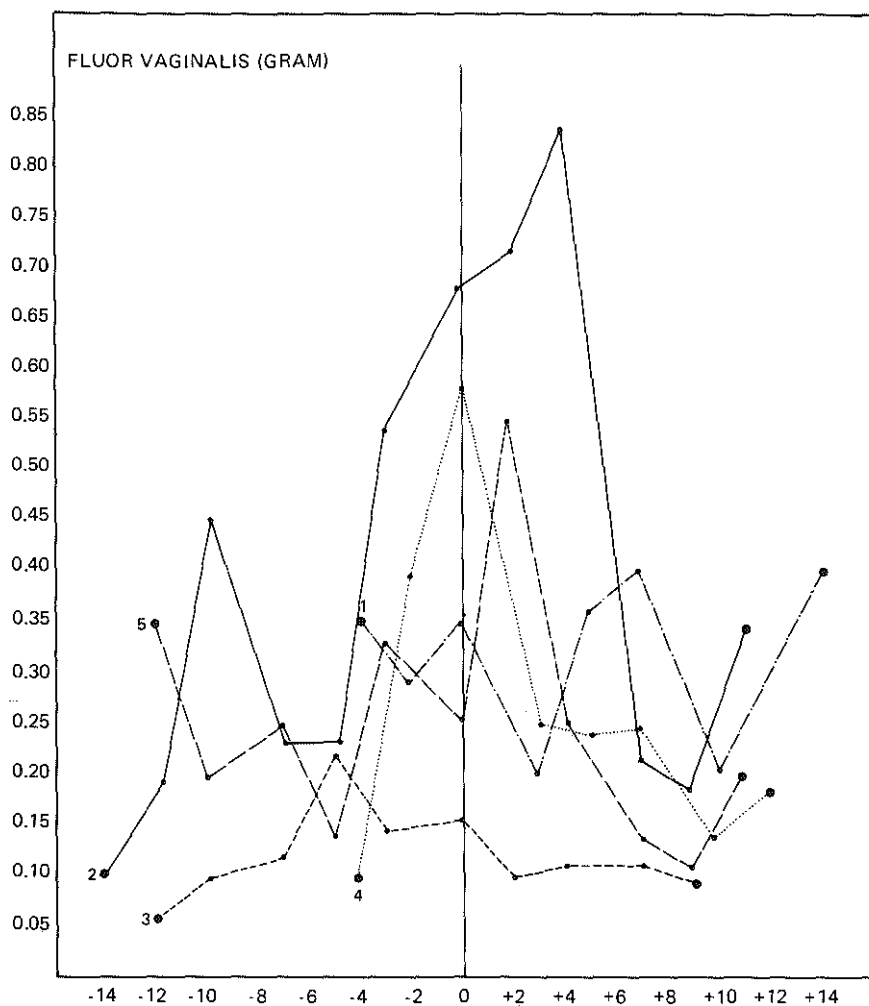
Bij 3 vrouwen nam de hoeveelheid fluor in de loop van de proliferatie fase toe tot een maximum in de peri-ovulatoire fase; daarna nam

Tabel 4.

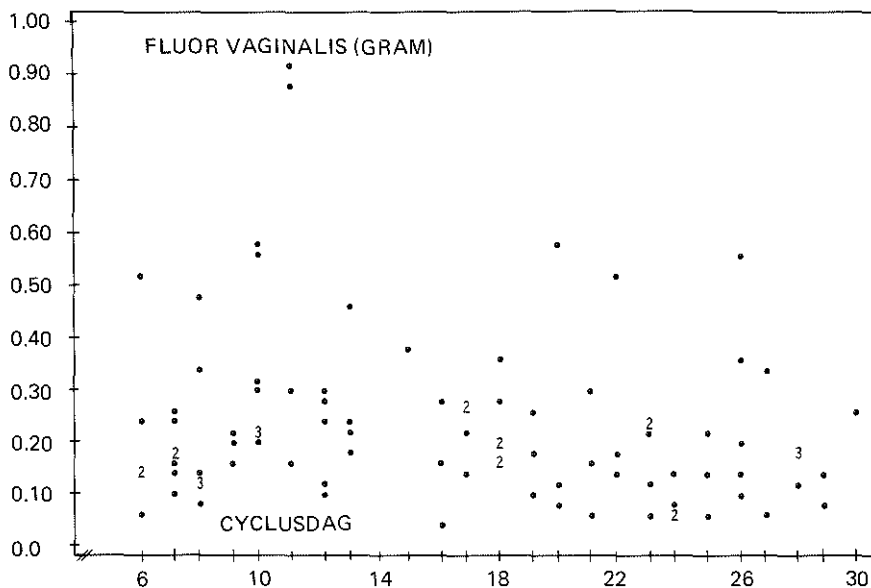
casus	aantal bepalingen	gemiddelde hoeveelheid fluor (mg)	uiterste waarden (mg)
I	9	327	204 – 408
II	12	379	87 – 847
III	9	122	62 – 224
IV	8	279	114 – 594
V	11	256	111 – 544

Het gemiddelde van de gemeten hoeveelheid fluor vaginalis, bij de 5 vrouwen van het longitudinaal onderzoek.

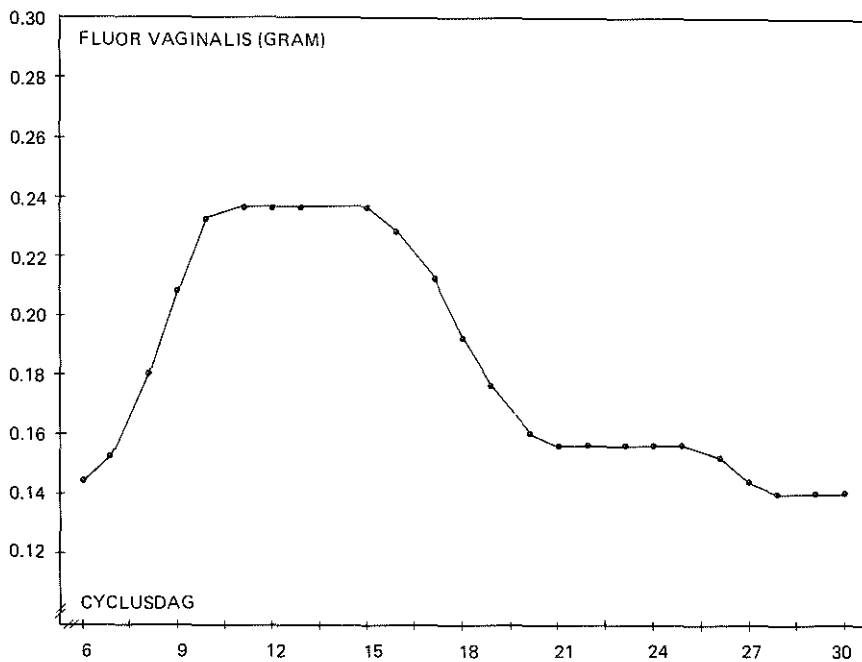
de hoeveelheid abrupt af tot een waarde als in het begin van de folliculaire fase en bleef tot het eind van de cyclus op dit niveau. Bij de overige 2 vrouwen is er geen toename in de peri-ovulatoire fase en is het niveau van de folliculaire fase gelijk aan de luteale fase.



Figuur 8. Het verloop van de hoeveelheid fluor vaginalis bij de 5 vrouwen van het longitudinaal onderzoek. Als cyclusreferentiepunt werd bij iedere vrouw de dag van de maximum oestradiolwaarde genomen.



Figuur 9. De hoeveelheid fluor vaginalis van 97 van de 100 vrouwen van het transversaal onderzoek, uitgezet tegen de cyclusedagen. Tengevolge van glasbreuk ontbreken de waarden van drie vrouwen.



Figuur 10. De relatie van de hoeveelheid fluor vaginalis t.o.v. de cyclusedagen na een smoothing of sequences bewerking van de gegevens uit figuur 9.

Transversaal onderzoek

In figuur 9 zijn de gewichtshoeveelheden fluor vaginalis weergegeven van de vrouwen, die opgenomen werden in het transversaal onderzoek. Na statistische bewerking hiervan (3R SSH3 plots, Tukey 1977) wordt de in figuur 10 afgebeelde curve verkregen. De hoeveelheid fluor vaginalis neemt gedurende folliculaire fase significant toe (Kendall correlatie coeff. < 0.05) tot een maximum in de peri-ovulatoire fase; hierna treedt een sterke vermindering op in de vroege luteale fase, gevolgd door een geringe daling in de late luteale en pre-menstruele fase. Het verloop van de curve is zoals bij de 3 vrouwen van het longitudinaal onderzoek gevonden werd.

HOOFDSTUK 5

HET DNA-gehalte van de fluor vaginalis

5.1. Literatuur

Een geschikte methode om in een celsuspensie als fluor vaginalis de verhouding vast te stellen tussen de cellulaire en de waterige component, lijkt het meten van de hoeveelheid DNA in een suspensie. Het gewicht van de hoeveelheid DNA per menselijk diploide celkern is bekend en tevens konstant. Deling van de hoeveelheid in een fluormonster bepaald DNA door het DNA getal van de diploide kern moet het aantal aanwezige cellen, de cellulaire component, van het monster opleveren.

Een beperking van de geldigheid van deze benadering is gelegen in de hierbij impliciet genomen veronderstelling dat alle kernen in de fluor vaginalis diploïed zullen zijn. Dat dit niet zonder meer voor de cellen van elk weefsel mag worden aangenomen toonden Leuchtenberger e.a. (1951) reeds aan bij hun onderzoek naar het DNA gehalte in levercellen van knaagdieren. De levercellen bleken onder te verdelen in heterogene groepen van opeenvolgende klassen van DNA gehalte: elke klasse bevatte de dubbele hoeveelheid DNA per kern van de voorgaande klasse, overeenkomend met de graad van polyploidie. Over het voorkomen van polyploidie in de epitheelcellen die het lumen van de menselijke vagina begrenzen, zijn ons geen literatuurgegevens bekend.

Voor de interpretatie van het DNA gehalte van de fluor vaginalis zal bovendien rekening gehouden moeten worden met daarin voorkomende leucocyten, met vaginale bacteriën en spermatozokernen, die over een andere DNA eenheid beschikken dan de vagina cellen. In de literatuur zijn geen gegevens gevonden over het DNA gehalte van de fluor vaginalis.

5.2. Eigen onderzoek

Onderzoek naar het voorkomen van polyploidie in vagina epitheel.

Voor het onderzoek naar het voorkomen van polyploidie werd bij 20 vrouwen m.b.v. een wattestokje een vaginawand afstrijkje gemaakt. Van deze afstrijkjes werd ten behoeve van het microscopisch onderzoek een zg. monolayer preparaat gemaakt. Deze preparaten werden gekleurd met een fluorescerende dubbelkleuring voor kern en cytoplasma (Cornelisse en Ploem 1976); na visuele screening werden cellen, die op grond van het fluorescentie beeld een hoger DNA gehalte zouden kunnen bevatten dan de dubbele diploide waarde, cytofluorometrisch onderzocht. In geen enkel preparaat werd een cel met meer dan de dubbele diploide waarde gevonden.

DNA-gehalte van de fluor vaginalis

Principe van de DNA-bepaling

Door toevoeging van perchloorzuur aan het monster fluor vaginalis slaan alle macromoleculen neer (DNA, RNA, eiwit). Door verhitting bij 90°C in de aanwezigheid van perchloorzuur wordt DNA vrijgemaakt uit de celkern; dit hydrolyseert daarna tot desoxyribose, fosfaat en de basen. De desoxyribose kan colorimetrisch worden bepaald, na kleuring door diphenylamine, door meting van de extinctie bij licht met een golflengte van 600 μ (Dische 1930).

De gevoeligheid van de bepaling kan worden vergroot door toevoeging van perchloorzuur en acetaldehyde en de kleurontwikkeling gedurende 17 uur bij 30°C te laten geschieden (Burton 1956).

Croft en Lubran (1957) stelden vast dat bij aanwezigheid van siaalzuur de extinctie bij 600 μ , veroorzaakt door DNA, verstoord wordt en modificeerden deze methode door de kleurontwikkeling bij lagere temperatuur (6-13°C) te laten geschieden. Wanneer echter de verhouding tussen de extinctie bij 600 μ en de extinctie bij 550 μ , veroorzaakt door siaalzuur, bij benadering 1.90 bedraagt, is de

siaalzuur verontreiniging verwaarloosbaar (Croft en Lubran 1957). Dit bleek bij de fluor monsters het geval te zijn.

Ter bepaling van het DNA gehalte in de fluor monsters kon daarom de methode volgens Burton (1956) worden gebruikt.

Methodiek

Aan het gewogen monster fluor vaginalis wordt 1 ml aqua destillata toegevoegd. Na centrifugeren wordt de bovenstaande vloeistof afgepipetteerd.

Het sediment wordt gesuspenderd in 1.5 ml aqua bidestillata d.m.v. mechanisch mengen en sonificeren. Vervolgens worden snel (de suspensie moet goed homogeen zijn) twee $500\mu\text{l}$ monsters genomen en gepipetteerd in Eppendorf plastic microcupjes.

Aan elk van deze monsters wordt $55\mu\text{l}$ 2.5 N HClO_4 toegevoegd en daarmee goed gemengd, waarna de microcupjes gedurende 30 minuten in een ijswaterbad van 0°C moet verblijven.

In een koude kamer wordt vervolgens in een Eppendorf 3200 centrifuge (10.000g) gedurende 4 minuten gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof wordt dan uit de cupjes afgezogen. Aan het sediment wordt 1 ml 0,5 N HClO_4 toegevoegd; het sediment wordt losgemaakt door sonificeren. Aansluitend aan 10 minuten incuberen bij 95°C worden de cupjes afgekoeld in een ijswaterbad en vervolgens 4 minuten gecentrifugeerd in een Eppendorf centrifuge. De bovenstaande vloeistof wordt in zijn geheel overgebracht in een glazen puntbuis.

Aan het sediment wordt weer 1 ml 0,5 N HClO_4 toegevoegd en vervolgens wordt geresuspenderd door sonificeren; na centrifugeren wordt de bovenstaande vloeistof in dezelfde glazen puntbuis overgebracht en gemengd.

Van vers gemengd diphenylamine reagens, bestaande uit:

1 gram diphenylamine	} ijszijn toevoegen tot 50 ml
40 ml ijszijn	
1 ml gec. H_2SO_4	
0,25 ml 1,6% acetaldehyde	

wordt 2 ml genomen en samen met $100\mu\text{l}$ 60% HClO_4 toegevoegd aan de glazen puntbuis. Deze wordt afgesloten en gedurende 16-18 uur bij 30°C (waterbad) geincubeerd.

Nauwkeurigheid van de bepaling

Alle bepalingen werden in duplo uitgevoerd; met elke bepalingssreeks liep een blanco in de gehele bepaling mee. Bovendien werd per bepalingssreeks een 50 en een 100 μ l monster van een 0,4 mg standaard DNA oplossing (0,4 mg kalfsthymus DNA/ml (British Drug House)) en een monster uit een fluor pool (met 65 μ g/500 μ l DNA), ter bepaling van de interassay variatie coëfficiënt, meegenomen. De interassay variatie coëfficiënt bleek 13% (n = 5) te zijn.

In tabel 5 is de precision van de bepaling voor drie verschillende DNA gehalten weergegeven. De recovery bedroeg 94.6%.

5.2.1. Resultaten van het onderzoek

Longitudinaal onderzoek

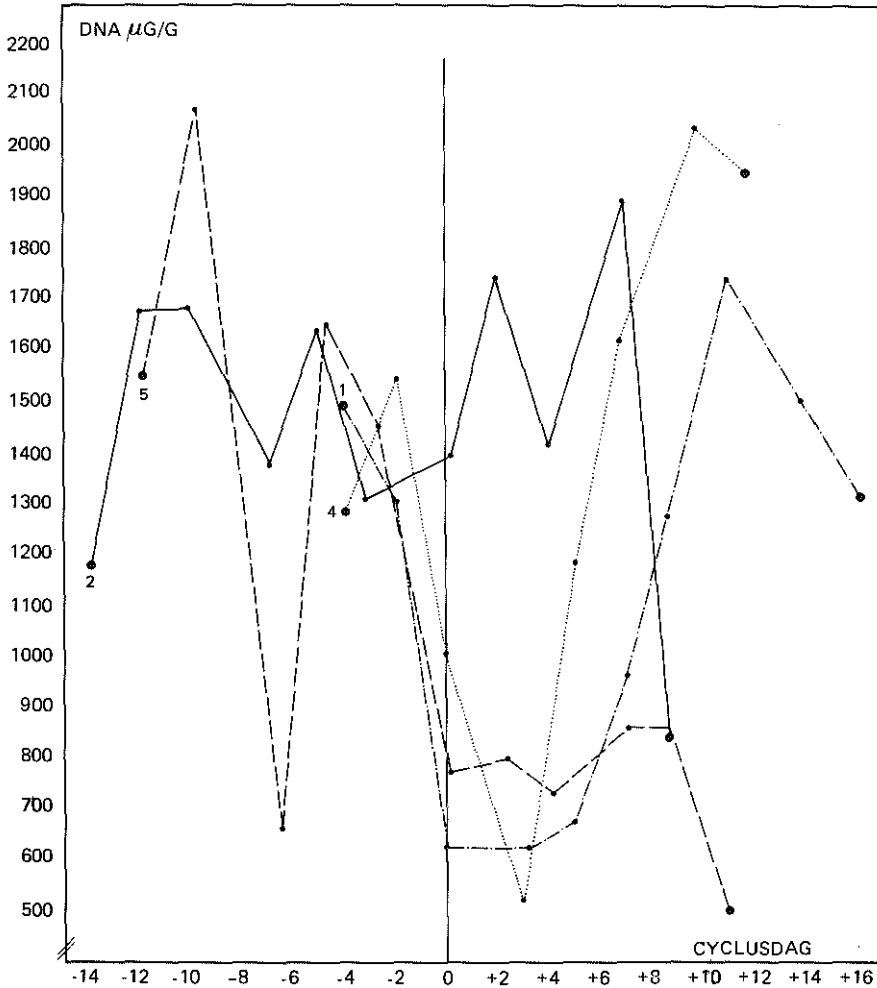
In figuur 11 zijn de DNA concentraties weergegeven gedurende de menstruele cyclus met de oestradiolpiek als referentiepunt. De waarden van slechts 4 van de 5 vrouwen zijn hier weergegeven, daar van een vrouw door glasbreuk enige bepalingen uitvielen. Bij casus

Tabel 5

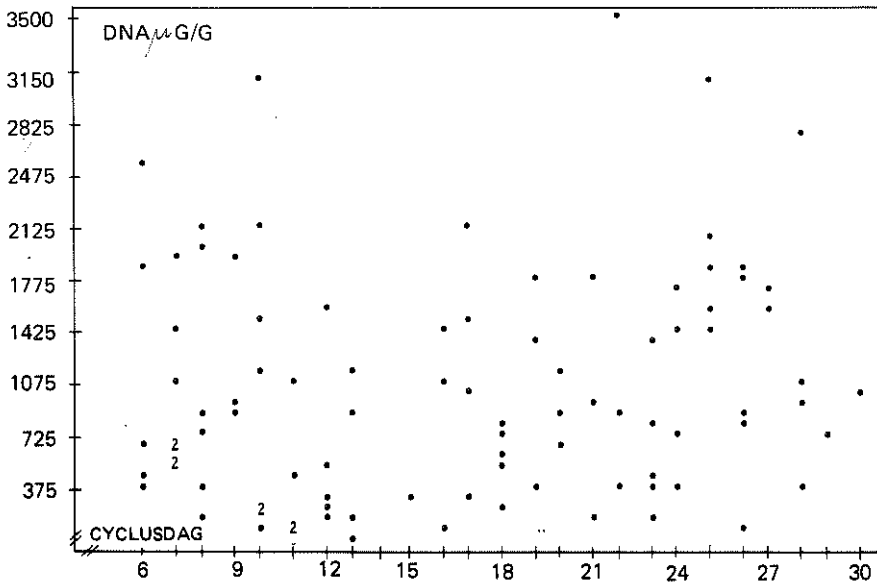
DNA gehalte g/500 μ l	aantal bepalingen	variatie coëfficiënt %
< 55	38	9.1
55 – 100	34	5.2
> 100	23	5.7

Precision van de DNA-bepaling, ingedeeld naar gevonden DNA-koncentratie in drie categorieën.

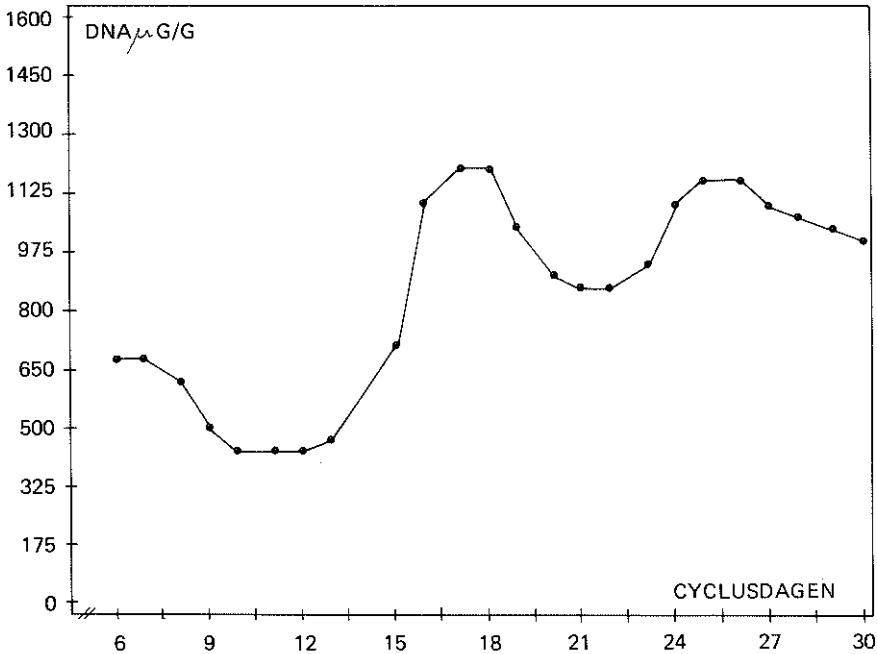
no. 1, 4, 5 treedt een daling op in de folliculaire fase. Casus no. 1 en 4 tonen een sterke stijging in de luteale fase, terwijl casus no. 2 en 5 op een konstant niveau gehandhaafd blijven. Bij alle vrouwen vertoont de DNA concentratie premenstrueel een daling.



Figuur 11. Het verloop van het DNA-gehalte van de fluor vaginalis bij de 4 van de 5 vrouwen van het longitudinaal onderzoek. Als cyclus referentiepunt werd bij iedere vrouw de dag van de maximum oestradiolwaarde genomen.



Figuur 12. De DNA-gehalten van de fluor vaginalis van 93 van de 100 vrouwen van het transversaal onderzoek uitgezet tegen de cyclusedagen. Tengevolge van glasbreuk ontbreken de waarden van 7 vrouwen.



Figuur 13. De relatie van het DNA-gehalte van de fluor vaginalis t.o.v. de cyclusedagen na een smoothing of sequences bewerking van de gegevens uit figuur 12.

Transversaal onderzoek

In figuur 12 zijn de gevonden fluor concentraties DNA van de in het transversaal onderzoek opgenomen vrouwen weergegeven.

Na statistische bewerking hiervan, (3R SSSH3 plots. Tukey 1977) wordt de in figuur 13 weergegeven curve verkregen.

In de folliculaire fase daalt de DNA concentratie significant (Kendall correlatie coëff. < 0.05) tot een minimum in de peri-ovulatoire fase, gevolgd door een stijging tot een maximum in de vroege luteale fase. Na een golvend verloop in de late luteale fase treedt in de premenstruele fase een daling op. Het niveau in de luteale en premenstruele fase is hoger dan in de folliculaire fase.

HOOFDSTUK 6

Het glycogeen gehalte van de fluor vaginalis

6.1. Literatuur

De vaginale fluor bevat glycogeen door exfoliatie van glycogeen bevattende cellen van de vaginawand. Naar de hoeveelheid glycogeen in de vaginale fluor zijn de laatste 40 jaar, voor zover ons bekend, geen onderzoeken gedaan. De voorhande zijnde literatuurgegevens hebben dus betrekking op ouderwetse bepalingmethoden.

Bepalingsmethoden

Voor het onderzoek naar het glycogeen gehalte van de fluor vaginalis zijn in de loop der tijd meerdere technieken beschreven:

1. De colorimetrische methode

Deze methode berust op de mate van bruinkleuring van een lugol oplossing, waarmee de vagina gespoeld werd (Geller 1925) of op de mate van bruinkleuring na toevoeging van een lugol oplossing aan een hoeveelheid verzamelde fluor (Schröder e.a., 1926).

2. De micro-glycogeenbepaling volgens von Embden (Schröder e.a., 1926)

Hierbij wordt de hoeveelheid glycogeen berekend uit de hoeveelheid glucose, die na hydrolyse van het glycogeen te bepalen is.

Aangezien alleen de methode volgens von Embden enigszins exakt het glycogeen gehalte weergeeft, worden hieronder alleen de in de literatuur vermelde resultaten van deze bepalingmethode weergegeven.

Schröder e.a. (1926) vonden een gemiddelde hoeveelheid glycogeen van 33.7 mg/g vaginale fluor bij een onderzoek van 17 patienten, van wie 8 zwanger waren; de spreiding van de gevonden waarden was groot: 8-90 mg/g.

Zowel Schröder e.a. (1926) als Demme en Baltzer (1927) stelden, dat het glycogeen gehalte van de vaginale fluor in geval van vaginale infectie relatief laag is. Zij vonden bij vrouwen met een vaginale infectie, zonder rekening te houden met mogelijke verschillen in de loop van de cyclus, voor het glycogeen gehalte van de fluor resp. 2-12 mg/g (n = 13) en 2-10 mg/g (n = 22).

Voor het beoordelen van het bestaan van een vaginale infectie onderzochten deze onderzoekers de fluor op de zgn. reinheidsgraden volgens Schröder e.a. (1926). Bij reinheidsgraad I worden alleen Döderleinse staafjes gevonden, bij reinheidsgraad II zowel gram negatieve als gram positieve staafjes en een klein aantal leucocyten. Bij reinheidsgraad III is er een bonte mengflora en een groot aantal leucocyten in de fluor aanwezig; soms toont de vaginawand ook tekenen van ontsteking. Fluor met reinheidsgraad I of II werd als fysiologisch aangemerkt. Een microbiologisch onderzoek van de fluor werd door Schröder e.a. (1926) en Demme en Baltzer (1927) niet uitgevoerd.

Alleen Demme en Baltzer (1927) verrichtten een onderzoek, waarbij rekening gehouden werd met de fase in de menstruele cyclus. Bij elk van een groep van 46 poliklinische patienten (waarvoor geen selectie criteria werden vermeld) werd gedurende een of twee menstruele cycli in totaal viermaal fluor afgenomen voor een glycogeenbepaling. In de menstruele fase (1-5e dag) werd het laagste glycogeen gehalte gevonden (0-10 mg/g); in de folliculaire fase (5-10e dag) varieerden de hoeveelheden van 0-20 mg/g fluor, in de ovulatie periode en in de luteale fase van 2-30 mg/g fluor.

Al met al zijn in de literatuur geen bruikbare gegevens te vinden over het glycogeen gehalte van fysiologische fluor. Steeds werd niet of onvoldoende aangegeven in hoeverre het onderzoek fysiologische fluor betraf dan wel onvoldoende of geen rekening gehouden met de fasen van de menstruele cyclus. Geen enkel onderzoek van het fluor

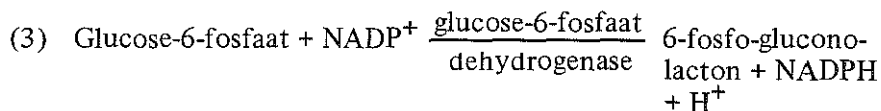
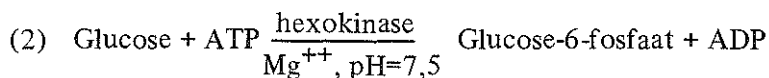
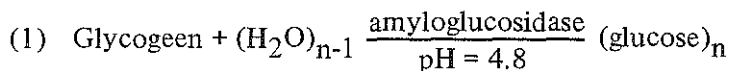
glycogeengehalte werd nog, zover ons bekend, verricht met de moderne enzymatische glycogeenbepaling, die nauwkeuriger uitkomsten geeft dan de verouderde methode volgens von Embden.

6.2. Eigen onderzoek

Principe van de glycogeen-bepaling

Het glycogeengehalte van de vaginale fluor werd enzymatisch bepaald. De reactie is weergegeven in schema 1 en verloopt in drie etappes.

Het principe van de bepaling is dat door hydrolyse het glycogeen volledig wordt omgezet tot glucose. De glucose wordt enzymatisch via glucose-6-fosfaat kwantitatief omgezet tot 6-fosfo-gluconolacton, onder vorming van gereduceerd NADP. De concentratie hiervan, te bepalen door extinctie meting bij 340 nm, is een directe maat voor de gevormde hoeveelheid glucose en dus ook voor de hoeveelheid glycogeen die aanwezig was.



Schema 1: Schema van de omzetting van de glycogeen in 6-fosfo-gluconolacton

Methodiek

Aan de verzamelde hoeveelheid fluor vaginalis wordt 1 ml aqua destillata toegevoegd, waarna gedurende 10 minuten gecentrifugeerd wordt en de bovenstaande vloeistof afgepipetteerd. Aan 0,1 ml van deze vloeistof wordt 0,5 cc acetaat buffer (pH 4,8) en amyloglucosidase volgens voorschrift (Keppler en Decker 1970) toegevoegd. Dit mengsel wordt twee uur in een waterbad van 37°C geplaatst. Vervolgens wordt onteiwit door toevoeging van 0,05 cc 3N perchloorzuur en 10 minuten afcentrifugeren (het onteiwitten wordt na de hydrolyse verricht, omdat de hydrolyse een pH 4.8 vereist). Aan het onteiwitte monster wordt ATP, triaethanolamine buffer (pH 7.5), NADP en glucose-6-fosfaat dehydrogenase volgens voorschrift toegevoegd (Keppler en Decker 1970). De eventueel reeds aanwezige hoeveelheid glucose-6-fosfaat blijkt uit de nu bepaalde extinctie (E_1); hierna wordt hexokinase toegevoegd en nogmaals de extinctie bepaald (E_2).

Voor het maken van een blanco wordt eveneens 0,1 ml van het supernatant afgepipetteerd, waarna wel 0,2 ml 3N perchloorzuur maar geen amyloglucosidase en acetaatbuffer wordt toegevoegd, om de eventuele reeds in het monster aanwezige glucose te bepalen; deze hoeveelheid moet in mindering worden gebracht op de uitkomst van boven beschreven glucosebepaling na hydrolyse van het glycogeen.

Nauwkeurigheid van de bepaling

Alle bepalingen werden in duplo uitgevoerd. Ter vergelijking werd een standaard oplossing glycogeen van 250 mg% in water in elke bepalingensreeks meegenomen. Voor het bepalen van de inter-assay variatie coefficient werd aan elke bepalingensreeks bovendien een monster uit eenzelfde fluorpool toegevoegd. De interassay en de intra-assay variatie coefficient van de gebruikte fluorpool, die 107 mg% glycogeen bevat, bleek respectievelijk 1,7% en 3.4%. De recovery bedroeg 95.3%. In tabel 6 is de precision weergegeven voor drie verschillende concentraties van glycogeen.

6.2.1. Resultaten van het onderzoek

Longitudinaal onderzoek

In figuur 14 zijn de glycogeen concentraties weergegeven van 5 vrouwen met oestradiolpiek als referentiepunt. De glycogeen concentratie daalt in de late folliculaire fase tot een minimum in de peri-ovulatoire fase of vroege luteale fase, uitgezonderd de waarden van casus no. 5. Bij casus no. 1, 3 en 4 treedt in de late luteale fase een stijging op.

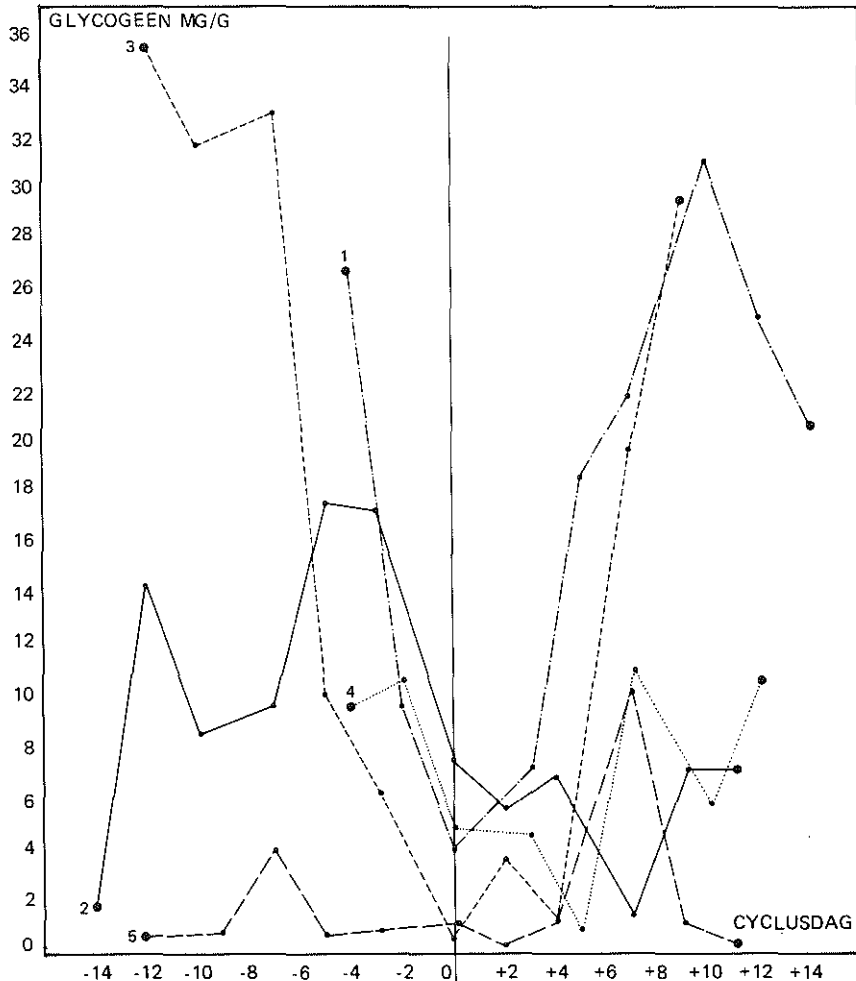
Tabel 6

Glycogeengehalte mg%	aantal bepalingen	variatie coëfficiënt %
< 100	15	8.6
100 – 300	15	4.6
> 300	15	2.7

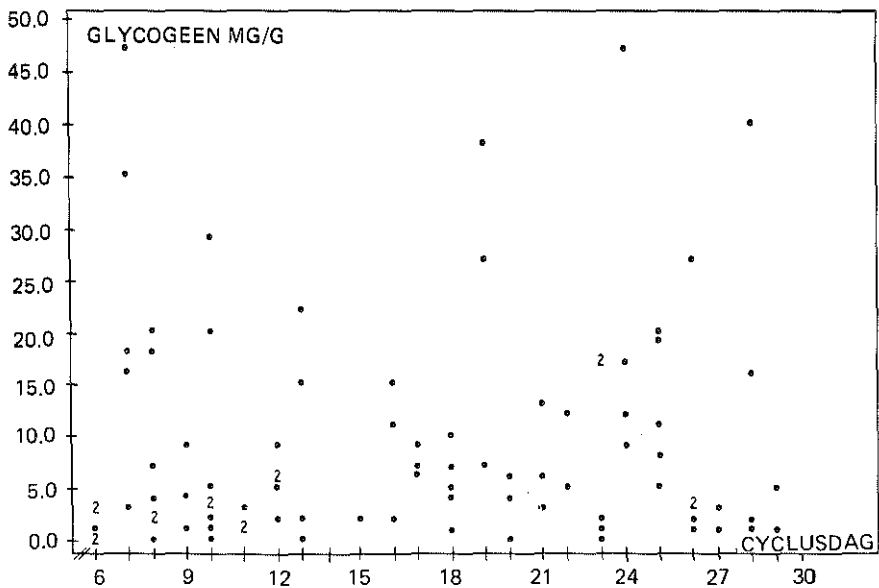
Precision van de glycogeen bepaling, ingedeeld naar gevonden glycogeen-koncentratie in drie categorieën.

Transversaal onderzoek

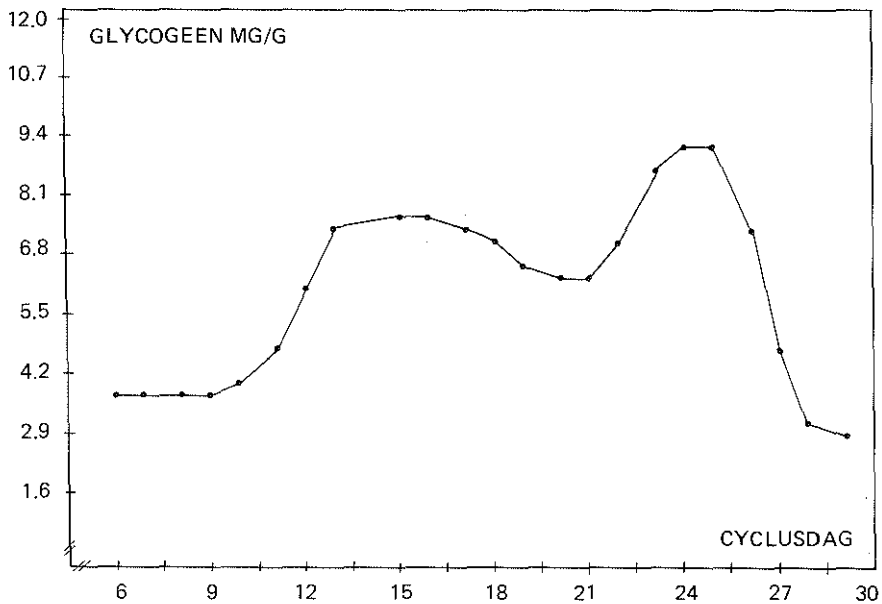
In figuur 15 zijn de concentraties glycogeen (mg/g fluor vaginalis) weergegeven van de vrouwen die opgenomen zijn in het transversaal onderzoek. Na statistische bewerking hiervan. (3R SSH3 plots, Tukey 1977) wordt de in figuur 16 afgebeelde curve verkregen. Hieruit blijkt dat het verloop van de curve veel overeenkomst vertoont met die van het oestradiol. De hoogste concentratie van glycogeen treedt op in de periovlatoire periode en de late luteale fase.



Figuur 14. Het verloop van het glycogeen gehalte van de fluor vaginalis bij de 5 vrouwen van het longitudinale onderzoek. Als cyclus referentiepunt werd bij iedere vrouw de dag van de maximum oestradiolwaarde genomen.



Figuur 15. De glyco-geehaltes van de fluor vaginalis van 90 van de 100 vrouwen van het transversaal onderzoek, uitgezet tegen de cyclusdagen. Tengevolge van glas-breuk ontbreken de waarden van 10 vrouwen.



Figuur 16. De relatie van het glyco-geehalte van de fluor vaginalis t.o.v. de cyclusdagen, na smoothing of sequences bewerking van de gegevens uit figuur 15.

HOOFDSTUK 7

Het lactaatgehalte van de fluor vaginalis

7.1. Literatuur

Reeds in 1908 meende Zweifel, op grond van karakteristieke kristalvorming, kwalitatief melkzuur in de vaginale fluor te kunnen aantonen.

Döderlein (1892) titreerde de vaginale fluor – verzameld door spoeling van de vagina met 30-50 cc gedestilleerd water – en vond een hoeveelheid titreerbaar zuur, die omgerekend met 6-18 mg melkzuur overeenkwam. Een vergelijkbare bevinding deed Kienlin (1926), die 3-4 ösen vaginale fluor van neonaten in 1 ml aqua destillata suspenderde en in deze vloeistof 10-25 mg% melkzuur vaststelde.

Eisa (1950) bepaalde het melkzuurgehalte van de fluor in de rattevagina en vond een sterke stijging gedurende de dioestrus en een tweede piek omstreeks de ovulatie. Ten aanzien van de mens vonden wij in de literatuur geen gegevens over het melkzuurgehalte van de vaginale fluor in de loop van de cyclus.

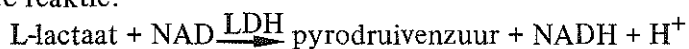
De colorimetrische bepalingmethoden voor het bepalen van melkzuur volgens Mendel en Goldscheider (1925), die door Kienlin werd toegepast en de methode volgens Barker en Summerson (1941), die door Eisa (1950) werd gebruikt, zijn meer onderhevig aan storingen en minder specifiek dan de moderne enzymatische bepalingmethode.

7.2. Eigen onderzoek

Principe van de lactaat-bepaling

Het melkzuur, alsook het lactaat, werd enzymatisch bepaald volgens de methode van Gutmann en Wahlefeld (1974).

Het principe van de bepaling kan weergegeven worden door de volgende reactie:



De gevormde hoeveelheid NADH als maat voor de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid lactaat, wordt in het reactiemengsel gemeten met behulp van de optredende extinctie verandering bij 340 nm. De specificiteit van de methode wordt bepaald door het toegevoegde LDH; er wordt een uit spierweefsel afkomstig LDH preparaat gebruikt, dat vrijwel alleen L-lactaat kan omzetten.

Methodiek

Aan de verzamelde hoeveelheid fluor vaginalis wordt 1 ml aqua destillata toegevoegd. Vervolgens wordt, na goede menging, gedurende 10 minuten gecentrifugeerd.

Van bovenstaande heldere vloeistof wordt 0,1 ml overgebracht in een andere buis en ter onteiwitting gemengd met 1,4 ml 0,6 N perchloorzuur (4°C). Hierna wordt gedurende 10 minuten gecentrifugeerd. In het zo verkregen heldere, eiwitloze centrifugaat wordt de lactaatbepaling uitgevoerd met de in de handel verkrijgbare voor deze reactie benodigde chemicaliën, volgens voorschrift van de fabrikant.*

Reaktiemengsel	blanko	bepaling
Glycine-hydrazine buffer pH 9,0	2,00 ml	2,00 ml
centrifugaat	-	0,10 ml
perchloorzuur 0,6 N	0,20 ml	0,10 ml
NAD 27 mmol/l	0,20 ml	0,20 ml
LDH susp. (650 U/ml)	0,02 ml	0,02 ml

Berekening lactaat concentratie:

$$(\text{ext.} \cdot \text{bep.} - \text{ext.} \cdot \text{blanko}) \times 499 = X \text{ mg\%}$$

Berekening van de totale hoeveelheid lactaat (in μg) per fluormonster: $X \times \frac{1}{100} \times 1000 = y \mu\text{g}$ lactaat.

* De chemicaliën zijn afkomstig van Boehringer, Mannheim GmbH (cat.no. 15972).

Nauwkeurigheid van de bepaling

Alle bepalingen werden in duplo uitgevoerd.

Behalve de blanco werd bij iedere bepalingssreeks ter controle een standaard lactaat oplossing van 4,5 mg% meebepaald (0,1 ml oplossing + 1,4 ml perchloorzuur 0,6 N; hiervan werd 0,2 ml gebruikt in het reaktiemengsel). Ter bepaling van de interassay variatie coëfficiënt werd bovendien aan iedere bepalingssreeks een monster uit de fluor pool toegevoegd. De interassay en de intra-assay variatie coëfficiënt van de gebruikte fluor pool, die 1,59 mg% lactaat bevatte, bedroeg respectievelijk 1.4% en 1.3%. De recovery bedroeg 97.5%.

In tabel 7 is de precision weergegeven voor drie verschillende concentraties van lactaat.

7.2.1. Resultaten van het onderzoek

Longitudinaal onderzoek

In figuur 17 is het verloop van de lactaat concentratie in de fluor vaginalis gedurende menstruele cyclus weergegeven met de oestradiol-piek als referentiepunt.

Bij casus no. 3 en 4 treedt een daling op in de folliculaire fase en bij casus no. 1, 2 en 5 blijft een konstant laag niveau gehandhaafd. In de late luteale fase treedt bij alle vrouwen een geringe stijging op.

Tabel 7

Lactaatgehalte mg%	aantal bepalingen	variatie coëfficiënt %
< 25	10	1.3
25 – 65	10	4.8
> 65	10	4.3

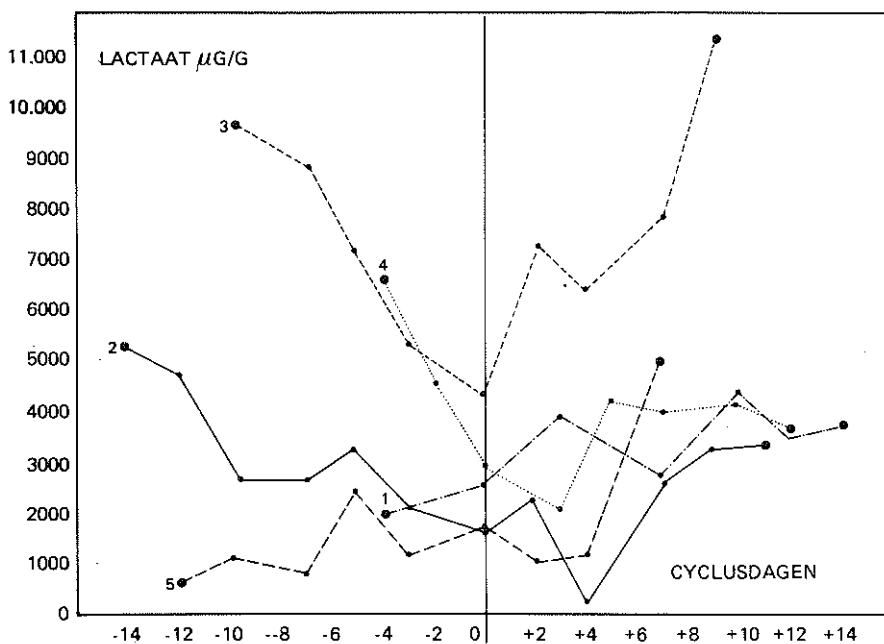
Precision van de lactaat bepaling, ingedeeld naar gevonden lactaat-concentratie in drie categorieën.

Transversaal onderzoek

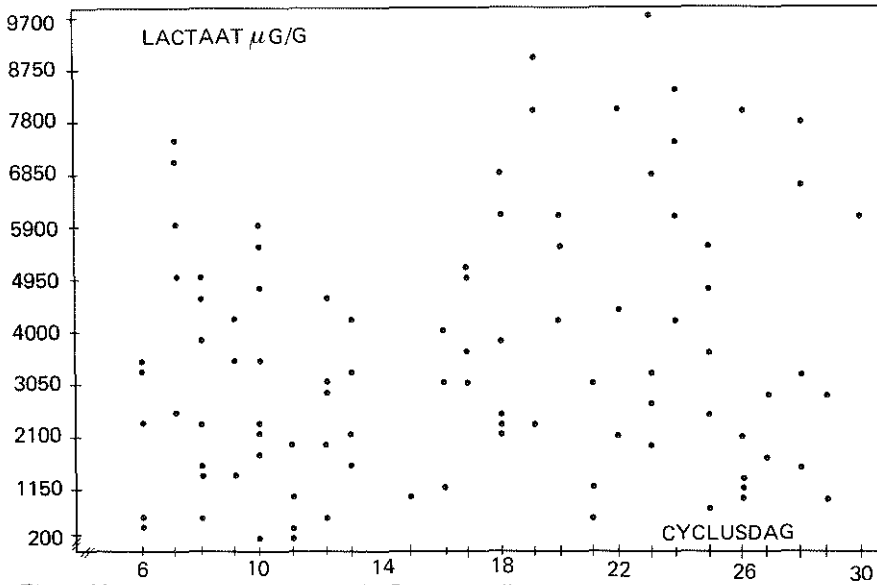
In figuur 18 zijn de lactaat concentraties weergegeven van de vrouwen die opgenomen werden in het transversaal onderzoek.

Na statistische bewerking van deze uitkomsten (3 RSSH 3 plots, Tukey 1977) wordt een curve verkregen zoals afgebeeld in figuur 19.

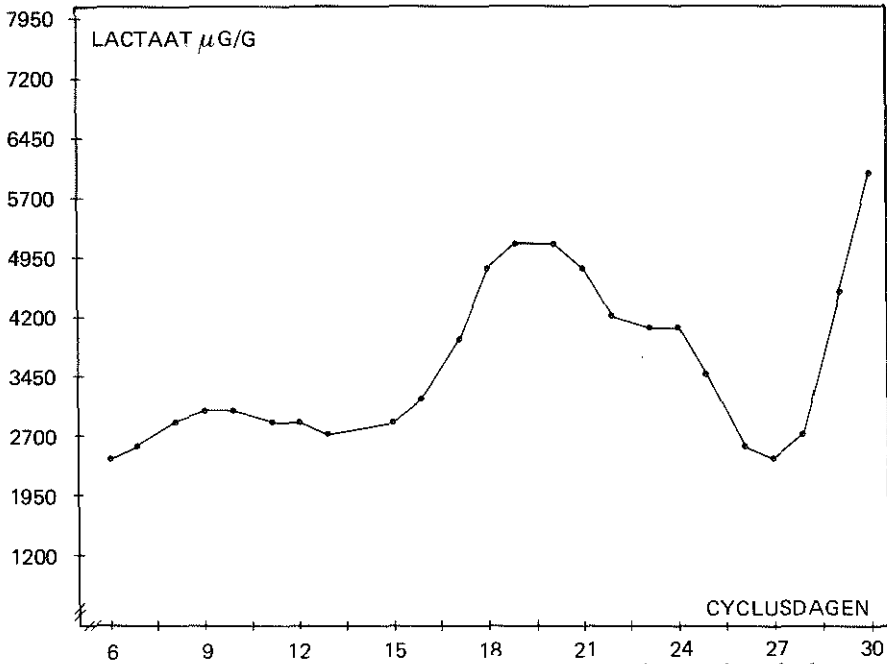
Overeenkomstig het longitudinaal onderzoek van casus no. 1, 2 en 5 blijkt het niveau gedurende de folliculaire fase konstant laag t.a.v. de luteale fase. In het begin van de late luteale fase worden de hoogste lactaat concentraties gevonden, waarna een daling optreedt, gevolgd door een premenstruele stijging.



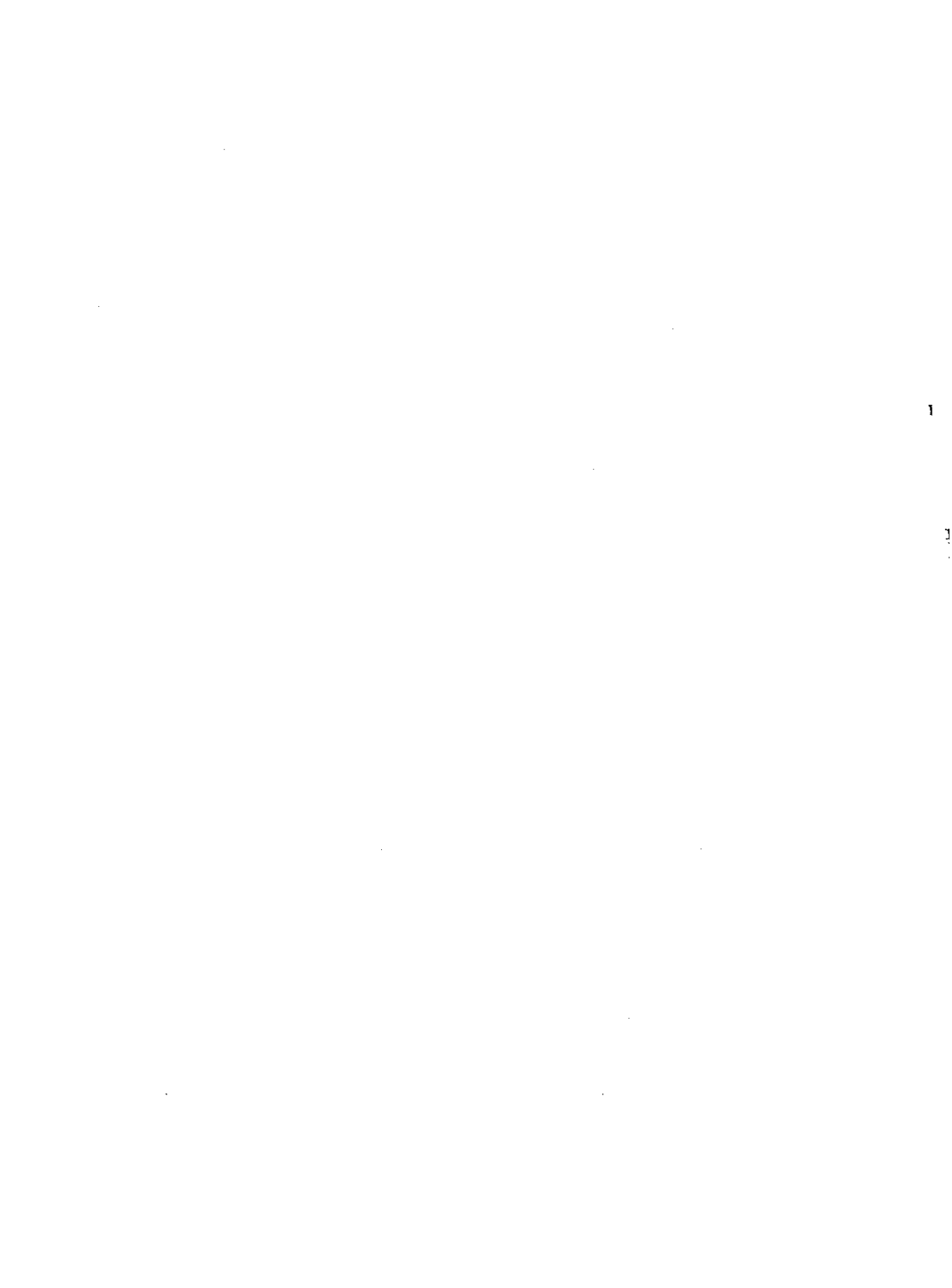
Figuur 17. Het verloop van het lactaat gehalte van de fluor vaginalis bij de 5 vrouwen van het longitudinaal onderzoek. Als cyclus referentiepunt werd bij iedere vrouw de dag van de maximum oestradiolwaarde genomen.



Figuur 18. De lactaatgehalten van de fluor vaginalis van 97 van de 100 vrouwen van het transversaal onderzoek, uitgezet tegen de cyclusedagen. Tengevolge van glasbreuk ontbreken de waarden van 3 vrouwen.



Figuur 19. De relatie van het lactaat-gehalte van de fluor vaginalis t.o.v. de cyclusedagen na smoothing of sequences bewerking van de gegevens uit fig. 18.



HOOFDSTUK 8

pH bepaling van de fluor vaginalis

8.1. Literatuur

Toegepaste methoden voor de pH meting van de fluor vaginalis

De voor het onderzoek van de vagina toegepaste methoden ter bepaling van de zuurgraad, zijn onder te verdelen in colorimetrische en elektrometrische methoden.

Colorimetrische methode

Gänssle (1925), Gragert (1924) en Schultheisz (1929) gebruikten de indicatoren methode volgens Michaelis (1920); hierbij worden 4 indicatoren gebruikt, die hun omslagpunt bij verschillende pH hebben.

Door kleurvergelijking kan de pH van de vaginale fluor worden bepaald. Deze bepaling kan uiteraard alleen in vitro worden uitgevoerd; troebeling van de vloeistof bemoeilijkt de bepaling.

Guthmann en Koch (1932) en Bock en Wolff (1933) maakten gebruik van indicatorpapier met verschillende meetbereik: pH 2.6-5.0, pH 5.0-7.2, pH 7.0-9.0. Een voordeel van deze methode is, dat de bepaling in vivo kan worden uitgevoerd door het indicatorpapiertje enige minuten in de vagina te leggen. De nauwkeurigheid van deze meetmethode is matig: $\pm 0,3$ pH (Bock en Wolff 1933); dit is o.a. te verklaren door het feit, dat de aanwezige electrolyten en eiwitten eveneens kleurverandering teweeg kunnen brengen.

Elektrometrische methode

De elektrometrische pH bepaling van de vaginale fluor was eerst alleen in vitro mogelijk. Schröder (1926) gebruikte hiervoor een waterstof elektrode; deze elektrode is voor praktisch gebruik zeer ongeschikt, o.a. door de lange tijdsduur van de bepaling. Oberst en v.d. Plass (1936) gebruikten een chinhydron elektrode; ook deze is voor meting in vivo ongeschikt: t.b.v. de meting moet chinhydron aan het te meten milieu worden toegevoegd.

De meeste moderne methode tot pH meting maakt gebruik van een glasmembraan waarvan de elektrische weerstand verandert onder invloed van de pH in het aangrenzende milieu. Doorslaggevende voordelen van de glaselektrode t.o.v. de andere elektrode zijn, dat snel en nauwkeurig en in vivo gemeten kan worden. De verschillen zijn dusdanig, dat sinds de komst van de glaselektrode de overige pH-elektrodes als obsoleet zijn aan te merken.

In de volgende paragraaf wordt de – ook door ons gebruikte – glaselektrode wat uitvoeriger beschreven.

Het principe van de glaselektrode

Het systeem bevat een kathode (referentie elektrode) en een anode (glaselektrode), die beiden als een zgn. halfcel zijn uitgevoerd om elk voor zich een konstante potentiaal te voeren t.o.v. het milieu, een zoutbrug van een verzadigde KCl oplossing. De kathode bestaat uit een platina draad bedekt met kwik calomelpasta (Hg/HgCl); de anode uit een platina draad bedekt met Ag/AgCl stift. De anode is van de kathode gescheiden door een pH gevoelige glazen mantel. De uitvoering van de elektrode is zodanig dat het te onderzoeken milieu middels een verbinding met de zoutbrug, het zgn. uitstroomdiafragma, wordt opgenomen in de elektrische stroomketen, die het signaal voor de meting moet vormen. De glaselektrode werd het eerste toegepast door Trussel en Mac Dougal (1944) en is verbeterd door Rakoff e.a. (1944) en door Müller (1960), die de referentie elektrode dichter bij de meetelektrode plaatste, waardoor nauwkeurigere metingen in kleinere hoeveelheid vloeistof mogelijk werden.

De geschiktheid van de glaselektrode voor het onderzoek van de vaginale pH is duidelijk: de meting is eenvoudig uit te voeren door de elektrode tegen de vagina-wand te plaatsen.

Literatuurgegevens over de vaginale pH meting

In het navolgende zullen literatuurgegevens worden besproken over vaginale pH metingen. Hierbij zullen wij ons beperken tot gegevens die met metingen d.m.v. de glaselektrode verkregen zijn. Het onderzoek van de vaginale pH omvat drie aspecten:

- eventuele verschillen in pH als gevolg van al of niet geïnfecteerd zijn van de vagina;
- het verloop van de pH in de menstruele cyclus;
- de pH gradient van introïtus tot fornices.

De vaginale pH bij fysiologische en geïnfecteerde fluor vaginalis

Om te kunnen vaststellen wat de vaginale pH is bij vrouwen met een fysiologische fluor en om na te gaan in hoeverre vaginale infecties van invloed zijn op de pH, dient duidelijk omschreven te worden op grond van welke criteria een onderscheid gemaakt wordt tussen fysiologische en geïnfecteerde fluor vaginalis.

Door de verschillende auteurs werden hiervoor verschillende criteria aangelegd betrekking hebbend op de beoordeling van het directe fluor preparaat of op het al dan niet aanwezig zijn van klinische symptomen. De beoordeling van het directe fluor preparaat vond steeds plaats d.m.v. de drie reinheidsgraden volgens Schröder (Schröder e.a. 1926).

Bij selectie op grond van klinische symptomen werd gelet op sterk vermeerderde vaginale afscheiding, jeuk, irritatie en zichtbare afwijkingen van de vaginawand. Hunter en Long (1958) vergeleken deze criteria met de reinheidsgraden volgens Schröder en stelden vast, dat er geen statistisch significant verschil was in het voorkomen van de reinheidsgraden I, II of III bij vrouwen met en zonder klinische symptomen van colpitis.

In tabel 8 zijn de literatuurgegevens over vaginale pH metingen bij vrouwen met als fysiologisch beschouwde fluor samengevat.

Tabel 8

Auteur	aantal vrouwen	aantal metingen	pH gemiddelde	uiterste waarde
Rakoff e.a. (1944)	210	210	4.6	3.0-6.0
Hunter en Long (1958)	51	51	4.9	3.7-6.3
Donat en Bernoth (1972)	46	307	—	4.7-5.1

De vaginale zuurgraad bij vrouwen met een fysiologische fluor.

Het verloop van de vaginale pH gedurende menstruele cyclus

Om een cyclisch verloop van de pH gedurende de menstruele cyclus te kunnen vaststellen, zal het onderzoek verricht moeten worden bij vrouwen met een ovulatoire cyclus en moet de pH frekwent op verschillende tijdstippen van de cyclus bepaald worden. Bovendien moeten gevallen met pathologische fluor worden uitgesloten en dient rekening gehouden te worden met de pH gradient in de vagina.

Een cyclisch verloop van de vaginale pH werd gevonden door Rakoff e.a. (1944) en Hunter en Long (1958); gedurende de menstruatie was de vaginale pH hoog ($\text{pH} > 5$); direkt na de menstruatie daalde de pH beneden 5. De laagste pH werd omstreeks het midden van de menstruele cyclus gevonden. In de luteale fase bleef de pH op een laag niveau gehandhaafd en premenstrueel trad een stijging op. Geen van de auteurs vermeldde het aantal metingen per patienten ende verdeling hiervan over de cyclus.

Müller (1960) en Donat en Bernoth (1972) vonden geen verandering van de vaginale pH gedurende de menstruele cyclus. De laatste verrichten pH metingen op meerdere plaatsen in de vagina. Een vagina-wand strijkje werd verricht ter bepaling van het ovulatie tijdstip, maar noch het aantal metingen per patiente noch de verdeling hiervan over de cyclus wordt vermeld. Bovendien gaven zij geen selectie criteria voor wat zij pathologische fluor noemden. Alleen Müller (1960) benaderde de genoemde eisen voor een bruikbaar onderzoek. Bij 21 gezonde vrouwen met een regulaire cyclus werd dagelijks een pH meting verricht. Het ovulatie tijdstip werd vastgesteld door beoordeling van dagelijks gemaakte vagina-wand strijkjes en van de basaal temperatuurcurve. De pH werd op drie plaatsen in de vagina gemeten. Helaas vermeldden zij geen selectie criteria voor het begrip fysiologische fluor vaginalis.

De pH gradient in de vagina

Rakoff e.a. (1944) en Trussel en Mac Dougal (1940) vonden een hogere pH bij de introitus vaginae dan in de fornix anterior.

Het verschil bedroeg maximaal 1,01 pH.

Het tegenovergestelde werd gevonden door Donat en Bernoth (1972); nadere gegevens over de grootte van het verschil ontbreken echter.

Rakoff e.a. (1944) maakten gebruik van de reinheidsgraden volgens Schröder en Hunter en Long (1958) van al of niet aanwezig zijn van klinische symptomen voor de selectie van de onderzochte vrouwen.

Donat en Bernoth (1972) onderzochten het aantal bacteriën in het directe preparaat, maar vermeldden niet welke criteria hierbij werden aangelegd. De auteurs stemmen overeen in de bevinding, dat de vaginale pH steeds in het zure gebied ligt. Wat de mate van interindividuele variatie in de vaginale pH aangaat, verschillen hun bevindingen nogal.

In tabel 9 zijn de literatuurgegevens van de vaginale pH metingen bij vrouwen met pathologische fluor weergegeven. Vergelijking van deze tabel met de voorgaande laat zien, dat zowel bij reinheidsgraad III als bij symptomen van colpitis gemiddeld een hogere pH in de vagina werd gevonden dan in geval het vaginale milieu als fysiologisch werd aangemerkt.

Tabel 9

Auteur	aantal vrouwen	aantal metingen	pH gemiddelde	uiterste waarde
Rakoff e.a. (1944)	323	323	5.54	4.0-9.0
Hunter en Long (1958)	47	47	5.40	4.2-6.4

De vaginale zuurgraad bij vrouwen met fluor reinheidsgraad III.

Rakoff e.a. (1944) stelden vast dat slechts bij 16% van de vrouwen met reinheidsgraad III de vaginale pH hoger was dan de uiterste waarde van de normale groep. Dit komt overeen met de bevindingen van Peeters e.a. (1972), die een statistisch significant hoger gemiddelde pH bij 58 patienten met een candida infectie ten opzichte van een, in leeftijd en predisponerende factoren (diabetes) vergelijkbare controlegroep van 26 patienten vonden. Bij de controlegroep bedroeg de gemiddelde pH $4.42 \pm \text{S.D. } 0,62$; dit hoge gemiddelde werd veroorzaakt door een erg hoge pH bij slechts een klein aantal patienten.

Wij vonden in de literatuur geen onderzoek naar de vaginale pH met behulp van de glaselektrode, waarin rekening gehouden werd met de mogelijke invloed van de cyclus en met het bestaan van een pH gradient in de vagina.

8.2. Eigen onderzoek

Methodiek

a. Beschrijving elektrode

De elektrode werd ontwikkeld door Electrofact en heeft een glasmem-

braan met een diameter van 3.5 mm; de referentie calomel-elektrode heeft een uitstroomdiafragma naast de glasmembraan, waardoor nauwkeurige metingen in kleine hoeveelheden mogelijk zijn. De binnen-buffer is gegeleerd, waardoor de stand van de elektrode geen invloed heeft op de meting. Om de meting op de laterale vaginawand te vergemakkelijken, werd speciaal voor dit onderzoek de glaselektrode aan het einde 90° gebogen (figuur 20 en 21). De elektrode is verbonden met een digitale Millivoltmeter (electrofact).

De opgegeven nauwkeurigheid van het systeem bedraagt 0.02 pH.

b. Uitvoering en nauwkeurigheid van de meting

De elektrode wordt ontsmet met een oplossing van benzalkoniumchloride en geijkt met een verse bufferoplossing van pH 7.00 en pH 4.00 (Radiometer type S 1326 en type S 1316). Voor iedere meting wordt de elektrode afgespoeld met gedestilleerd water en drooggeveegd met een steriel gaasje. De patiënte bevindt zich bij het uitvoeren van de meting in steensnede ligging; de vaginawand wordt met een eendenbek speculum ingesteld. De meting wordt halverwege de vagina op de laterale wand uitgevoerd.

Bij 60 patienten werd een tweede meting op dezelfde plaats in de vagina uitgevoerd. De nauwkeurigheid van de meting bleek te zijn: $\text{pH} \pm 0.07$ (S.D.)

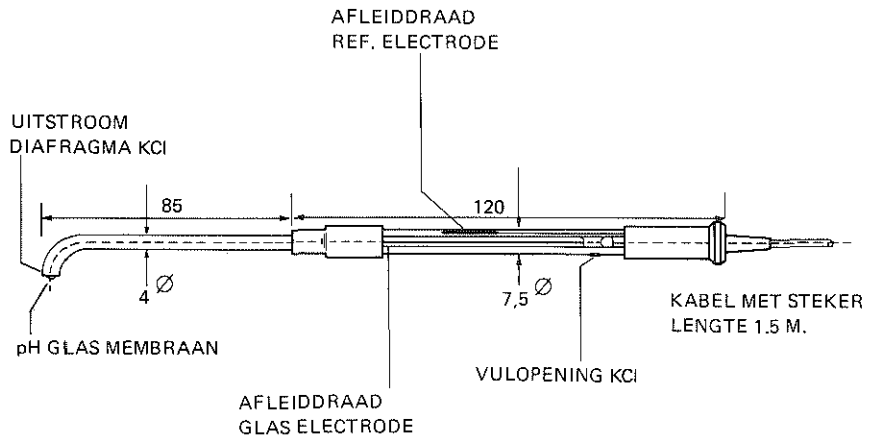
8.2.1. Resultaten eigen onderzoek

Longitudinaal onderzoek

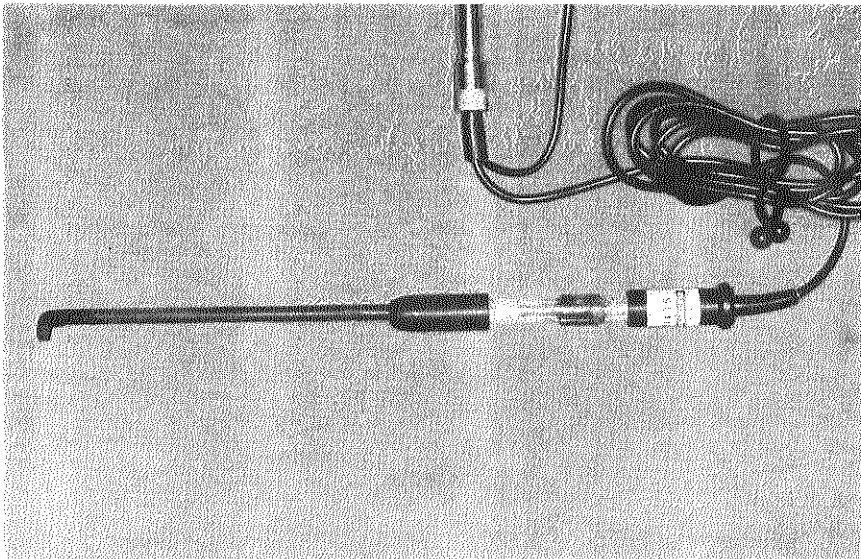
In figuur 22 is het verloop van de pH gedurende de menstruele cyclus weergegeven met de oestradiolpiek als referentiepunt.

Bij alle vrouwen is een duidelijke pH daling in de folliculaire fase aanwezig.

Bij casus no. 1, 2, 3 en 4 valt de laagst gemeten pH samen met de oes-



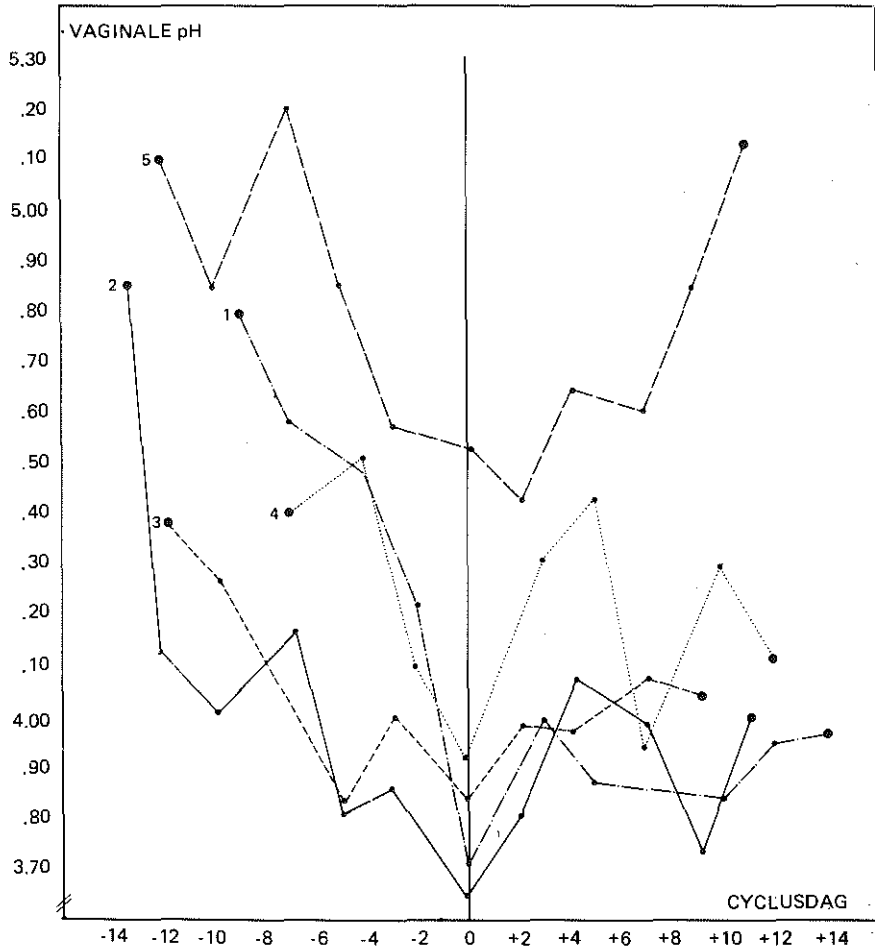
Figuur 20: Schematische voorstelling van de voor onderzoek gebruikte pH elektrode.



Figuur 21. De voor het onderzoek gebruikte pH elektrode.

tradiolpiek en bij casus no. 5 wordt de laagste pH waarde 2 dagen daarna gemeten.

In de luteale fase is er weinig verandering in de pH en blijft een laag niveau t.a.v. de vroege proliferatie fase gehandhaafd: premenstrueel treedt alleen bij casus no. 5 een duidelijke stijging van de pH op

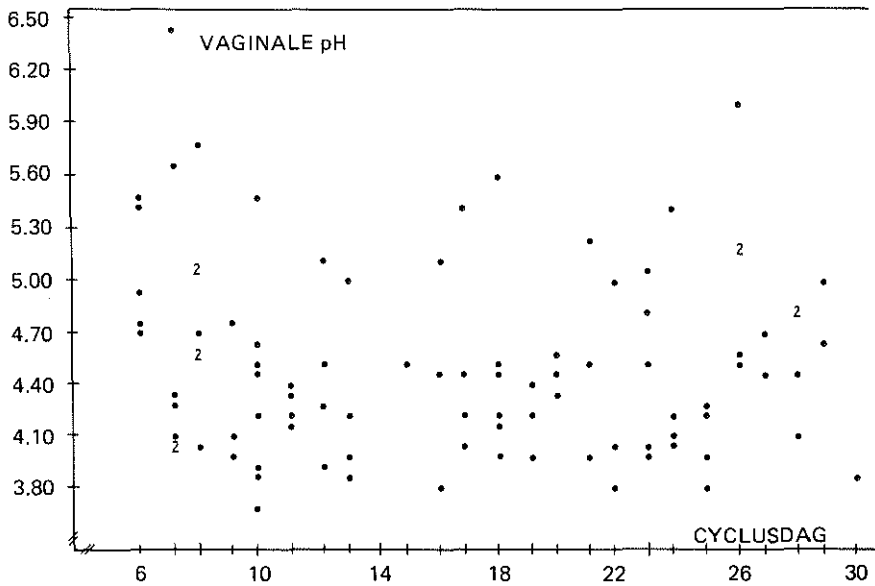


Figuur 22. Het verloop van de vaginale pH bij de 5 vrouwen van het longitudinaal onderzoek. Als cyclus referentiepunt werd bij iedere vrouw de dag van de maximum oestradiolwaarde genomen.

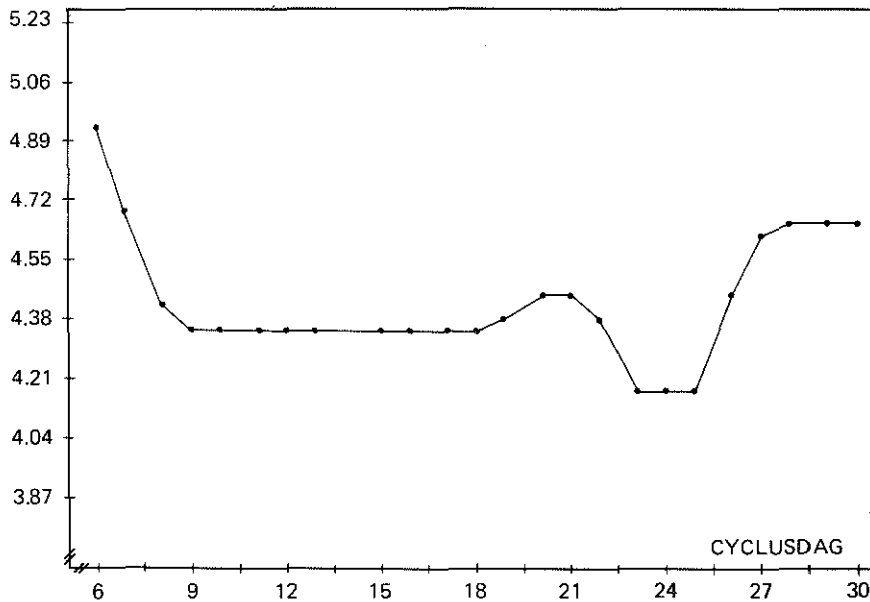
Tabel 10

	hoogste pH	cyclusdag	laagste pH	cyclusdag	verschil hoogste- laagste pH (amplitudo)	niveau	duur menstruele cyclus
no. 1	4.52	9e	3.74	13e	0.78	4.12 ± 0.40	30 dagen
no. 2	4.17	12e	3.64	19e	0.53	3.90 ± 0.25	30 dagen
no. 3	4.07	25e	3.84	13 = 18e	0.23	3.15 ± 0.12	29 dagen
no. 4	4.43	17e	3.90	12 = 19e	0.53	4.20 ± 0.25	26 dagen
no. 5	5.21	10e	4.42	19e	0.79	4.80 ± 0.40	30 dagen

De hoogste en laagste gemeten pH, amplitudo en pH niveau voor de 5 vrouwen voor het longitudinaal onderzoek



Figuur 23. De vaginale pH waarde van 95 van de 100 vrouwen van het transversaal onderzoek, uitgezet tegen de cyclusedagen. De waarde van 5 vrouwen werden geëlimineerd wegens foute ijking van de pH meter.



Figuur 24. De relatie van de vaginale pH t.o.v. de cyclusedagen na smoothing of sequences bewerking van de gegevens uit figuur 23.

In tabel 10 zijn de hoogst en laagst gemeten pH waarden weergegeven en het pH niveau per patiente. Hieruit blijkt dat er zowel wat betreft niveau als amplitudo een vrij groot verschil per patiente bestaat.

Transversaal onderzoek

In figuur 23 zijn de gevonden vaginale pH waarden weergegeven van de vrouwen die opgenomen werden in het transversaal onderzoek.

Na statistische bewerking van deze waarden, (3 R SSH3 plots, Tukey 1977) ontstaat de curve zoals weergegeven in figuur 24.

Overeenkomstig het longitudinaal onderzoek treedt een significante daling op van de pH in de folliculaire fase (Kendall correlatie coëff. < 0.05) in de luteale fase blijft een laag niveau gehandhaafd t.a.v. de folliculaire fase; premenstrueel treedt een stijging van de pH op.

HOOFDSTUK 9

De vaginale flora

9.1. Literatuur

De samenstelling van de vaginale bakteriële flora wordt bepaald door de aanwezigheid van veel glycogeen en een lage pH van het milieu, welke factoren beide afhankelijk zijn van de ovariële activiteit.

Voor de puberteit en in de post-menopauze is er t.g.v. een geringe ovariële activiteit een gevarieerde bakteriële flora, die vnl. bestaat uit niet-haemolytische streptococci en difteroiden. In de fertiele fase wordt de bakteriële flora vooral gekenmerkt door lactobacillus (Rakoff e.a. 1944). Uit de literatuur blijkt verder dat de vaginale flora bij vrouwen in de fertiele fase een bonte mengeling van bacteriën omvat, waarin naast lactobacillen vaak andere bacteriën aanwezig zijn een lactobacillen niet zelden geheel ontbreken. In tabel 11 zijn literatuur gegevens over de aerobe vaginale flora samengevat.

In de anaerobe vaginale flora van vrouwen in de fertiele fase zijn, ook nadat betrouwbare kweken mogelijk waren geworden (sedert 1970) eveneens grote verschillen vastgesteld (Tashjian e.a. 1976, Bartlett e.a. 1977). In de anaerobe flora zijn niet lactobacillen maar *Bacteroides* spp. en anaerobe cocci de overheersende micro-organismen; daarnaast kan een bonte mengeling van andere anaerobe micro-organismen aangetroffen worden. Van al deze vaginale anaeroben kan alleen de bifidobacterie (Bartlett e.a. 1977) glycogeen in melkzuur omzetten. De anderen vormen wel diverse metabole zuren als produkt van hun anaerobe stofwisseling, w.o. melkzuur, maar uit een ander substraat dan glycogeen.

De door vermelde onderzoekers gevonden individuele verschillen in de vaginale flora zijn mogelijk te verklaren doordat geen onderscheid gemaakt is tussen de verschillende plaatsen in de vagina, waar

Tabel 11.

Auteur	Tashjian (1976)	Morris (1967)	Hunter (1958)	eigen onder- zoek
aantal vrouwen	25	187	48	100
	%	%	%	%
Gram pos. staven				
Lactobacillus sp.	88	47	95	75
Difteroiden	-	-	-	18
Corynebakt. vaginala	76	22.4	-	-
Gram positieve staven (miscellaneous)	-	-	2	-
Gram neg. staven				
Escherichia coli	28	6.9	-	14
Enterobacter sp	-	-	-	1
Proteus mirabilis	-	3.7	-	2
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	1
Gram negatieve staven	-	-	20	10
Acinetobacter	4	-	-	0
Gram pos. coccen				
Staphylococcus aureus (DNA-ase pos.)	8	-	-	6
Staphylococcus epidermidis (DNA-ase neg.)	100	-	-	39
Staphylococcus pyogenes	-	1.6	-	-
Micrococcus sp	-	45	-	9
Staphylococci + micrococci	-	37.4	-	-
α -haemolytische streptococci	36	-	-	5
β -haemolytische streptococci	20	11.8	28	5
Streptococcus faecalis	32	10.7	-	11
Indifferente streptococci	-	-	-	14
Ongroepbare streptococci	-	-	-	5
Schimmels en gisten				
Candida	-	9.1	-	17
Fungi	-	-	12	-
Gisten	-	8.5	-	2

De fysiologische vaginale aerobe microbiële flora bij vrouwen in de fertile periode.

een kweek zo al kan worden afgenomen, m.n. de introitus vaginae fornix en ostium externum cervicis. Tashjian e.a. (1976) namen de kweek af in het achterste deel van de vagina, Hunter en Long (1958) in de achterste fornix en het cervicale ostium, met hetzelfde kweekvatje; Morris (1967) vermeldde zelfs niet de exakte plaats van het afnemen. Keith e.a. (1972) vonden dat de overheersende micro-organismen in het milieu van het ostium externum uteri verschillen van die in de vagina. Verschil in pH (Cohen 1969), cellulair glycogeen gehalte en biochemische eigenschappen van het cervicaal sekreet (Edmund 1962) kunnen een rol spelen in het verschil in aantal en type van de micro-organismen op de verschillende plaatsen in de vagina.

Op nog andere wijzen zouden wellicht de gevonden verschillen in de vaginale flora verklaard kunnen worden.

Gezien de invloed van de ovariële activiteit op de samenstelling van de bacteriële flora, kan het tijdstip in de menstruele cyclus, waarop de kweek wordt afgenomen van belang zijn. Ook het verschil in gehandhaafde criteria ter onderscheiding van fysiologische en pathologische fluor zal invloed hebben gehad op het verschil in de kweekresultaten.

Op grond van het voorgaande diende (ook) naar de samenstelling van de vaginale flora een nader onderzoek ingesteld te worden; en wel in drie richtingen:

1. Is de vaginale flora inter- en/of intra-individueel konstant dan wel gevarieerd?
2. Is de ovariële cyclus van invloed op de samenstelling van de vaginale flora?
3. Is er een relatie tussen pH en flora in de vagina?

Op punt 3 zal nader ingegaan worden bij de bespreking van de onderlinge relaties van de door ons onderzochte fluor factoren.

9.2. Eigen onderzoek van de vaginale bacteriële flora

Methodiek

De patiente bevindt zich voor het onderzoek in steensnede ligging; de vaginawand wordt met een eendenbek speculum ingesteld.

Uit de laterale fornix wordt d.m.v. een steriel wattenstokje materiaal voor microbiel onderzoek afgenomen, dat vervolgens in een Stuart transport medium wordt geplaatst.

De volgende media werden beënt:

1. Bloedagar (oxid CM55 + 5% schapebloed)
2. Mc Conkey (oxid CM76)
3. Chocolate agar (oxid CM55 + gekookt schapebloed 10%)
4. Sabouraud medium (oxid CM41)
5. DNA'se agar (oxid)
6. Aesculine (Merck)
7. Waterstof peroxide (Merck)

De gram negatieve staven werden geïdentificeerd volgens het A.P.I. systeem.

Het was de opzet zowel aerob als anaerob te kweken. In de loop van het onderzoek bleek echter de toegepaste anaerobe kweekmethode niet te voldoen; daardoor verviel het deel van het onderzoek dat op de anaerobe vaginale fluor betrekking had.

Resultaten

Longitudinaal onderzoek

In tabel 12 zijn de resultaten weergegeven van het longitudinaal onderzoek van 5 vrouwen met de oestradiolpiek als referentiepunt.

De wisselende samenstelling van de bacteriële flora toont geen relatie met de fase van de menstruele cyclus.

Transversaal onderzoek

In tabel 11 zijn de kweekresultaten weergegeven van de vrouwen die opgenomen werden in het transversaal onderzoek.

Overeenkomstig de bevindingen van Tashjian (1976), Morris (1967) en Hunter (1958) werden de lactobacillen het meest frekwent gekweekt; de overige species tonen zeer grote verschillen in frekwentie. Aangezien reeds bij het longitudinaal onderzoek bleek dat de bacteriële populatie in het verloop van de menstruele cyclus niet stabiel is, was ook bij het transversaal onderzoek een grote variatie in de samenstelling van de bacteriële flora te verwachten. Bij slechts 20 vrouwen werd één species per kweek gevonden (tabel 13); dit betrof in 13 gevallen een lactobacillus (tabel 14). De gevarieerde samenstelling van de bacteriële flora is onafhankelijk van de fase van de menstruele cyclus (tabel 15).

Tabel 13.

aantal verschillende species per kweek	vroege proliferatie fase	late proliferatie fase	periovulatoire fase	vroege luteale fase	late luteale fase	prem. fase	totaal
0	1	0	1	0	0	0	2
1	2	5	0	4	8	1	20
2	6	9	2	7	11	2	37
3	6	3	2	3	10	0	24
4	4	3	0	2	3	1	13
5	0	1	0	0	2	0	3
6	0	0	0	0	1	0	1
							<hr/> 100

Frekwentie van het aantal verschillende species per kweek bij het transversaal onderzoek, met de verdeling over de verschillende fasen van de cyclus.

Tabel 14

	Aantal vrouwen
Lactobacillus sp.	13
Staphylococcus epidermidis (DNA'-se neg).	3
Streptococcus faecalis	1
Gist	1
Gram negatieve staven	1
Candida krusei	<u>1</u>
	20

Frekwentie en aard van de aerobe micro-organismen, die bij het transversale onderzoek in reïncultuur gevonden werden.

Tabel 15.	vroege prolifera- tie fase	late prolifera- tie fase	peri- ovulatoire fase	vroege luteale fase	late luteale fase	prae- menstruele fase
Aantal vrouwen	19	21	5	16	30	9
% pos. bact. kweken	%	%	%	%	%	%
Gram pos. staven						
Lactobacillen	73	81	75	81	77	66
Difteroiden	5	24	0	6	20	11
Gram neg. staven						
E coli	21	9	-	19	13	11
Enterobacter	-	-	-	-	3	-
Proteus mirabilis	-	-	-	6	3	-
Pseudomonas aeruginosa	-	19	-	6	-	-
Gram neg. staven	16	-	-	13	7	-
Gram pos. coccen						
Staphylococcus aureus (DNA'se-pos.) -		9	20	-	7	-
Staphylococcus epidermis						
(DNA'se-neg.)	31	33	60	19	50	67
Micrococcus sp.	11	5	-	6	10	22
α -haemolytische streptococcen	11	-	-	-	7	11
β -haemolytische streptococcen	15	-	-	-	7	-
Streptococcus faecalis	5	5	20	25	17	-
Indifferente streptococcen	15	19	20	12	13	11
Ongroepbare streptococcen	11	9	-	-	3	-
Schimmels en gisten						
Candida albicans	-	9	20	-	13	-
Candida krusei	-	-	-	19	10	11
Gisten - geen candida species	5	5	-	-	-	-

HOOFDSTUK 10

De onderlinge relatie van de fluor variabelen. Konklusies

Fysiologische fluor vaginalis bestaat uit een suspensie van afgeschilferde epitheelcellen gemengd met een bacteriële flora van gevarieerde samenstelling waaronder met als meest konstant aanwezige de lactobacillus. Zoals in de inleiding gesteld lijkt het voor de hand liggend dat de fluor sterk zuur is, doordat de epitheelcellen, intact dan wel gedesintegreerd, hun voorraad glycogeen gedeeltelijk omzetten in melkzuur, daartoe gedwongen door het in de vagina heersende zuurstofgebrek. Als dit juist is (epitheelcellen en niet bacteriën spelen een dominante rol) mag men verwachten hier iets van weerspiegeld te vinden in de wijze waarop de betrokken componenten van de fluor zich ten opzichte van elkaar verhouden. In het navolgende worden daarom enkele van deze relaties nagegaan in de verkregen waarden van het transversale onderzoek. De bewerking van de gegevens en de weergave daarvan in figuren is op dezelfde wijze gedaan als bij de evaluatie van de onderzoekresultaten m.b.t. de cyclus, beschreven in hoofdstuk 2.

Achtereenvolgens is in de figuren weergegeven welke relatie de pH heeft met de concentratie lactaat, en welke relatie de concentratie lactaat heeft met die van het glycogeen enerzijds en die van het DNA (als maat voor het aantal vaginale epitheelcellen) anderzijds. Bovendien is geëvalueerd hoe de relatie is van de fluor lactaat-, DNA- en glycogeen-concentratie met de plasma oestradiol concentratie en met de plasma progesteron concentratie.

Voor het nagaan van de invloed van het oestradiol op deze drie fluor factoren werden alleen de waarden verwerkt van vrouwen die blijkens hun laag plasma progesteron gehalte ($< 0,20$ ng/ml) niet onder luteale invloed van betekenis stonden. Voor het nagaan van de invloed van het progesteron werden juist alleen de waarden verwerkt

van de vrouwen die wel duidelijk onder luteale invloed waren (plasma progesteron concentratie $> 0,20$ ng/ml).

In figuur 25 is de vaginale pH uitgezet als functie van het fluor lactaatgehalte. Globaal genomen lijkt de pH lager naarmate de fluor meer lactaat bevat. Dit past bij de veronderstelling dat de pH van de fluor tenminste mede bepaald wordt door het in de fluor aanwezige melkzuur.

In figuur 26 is het fluor lactaatgehalte weergegeven als functie van de hoeveelheid glycogeen in de fluor.

Tot op zekere hoogte korreleert de aanwezige hoeveelheid lactaat positief met de aanwezige hoeveelheid glycogeen. Boven een zekere concentratie (12 mg/g.fluor) neemt de concentratie lactaat niet veel meer toe. Blijkbaar is het betrokken enzymstelsel dan vrijwel maximaal belast, zodat een grotere voorraad geen hogere produktie meer betekent.

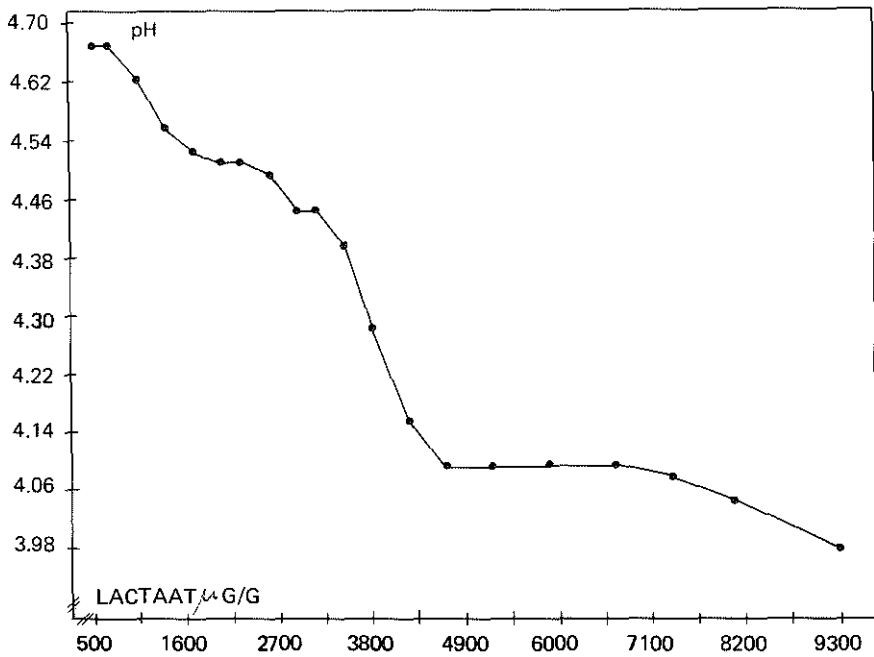
In figuur 27 is het fluor lactaatgehalte beschreven als functie van het fluor DNA-gehalte dat als maat dient voor het celgehalte van de fluor.

Tot een zeker maximum (± 300 μ g/gram fluor DNA) korreleert de concentratie lactaat positief met het aantal aanwezige cellen. Boven dat maximum lijkt dit verband er in het geheel niet meer. Blijkbaar remt het lactaat middels pH verlaging de celstofwisseling bij een gegeven concentratie (± 3500 μ g/fluor) zodanig, dat verdere melkzuur produktie uitblijft.

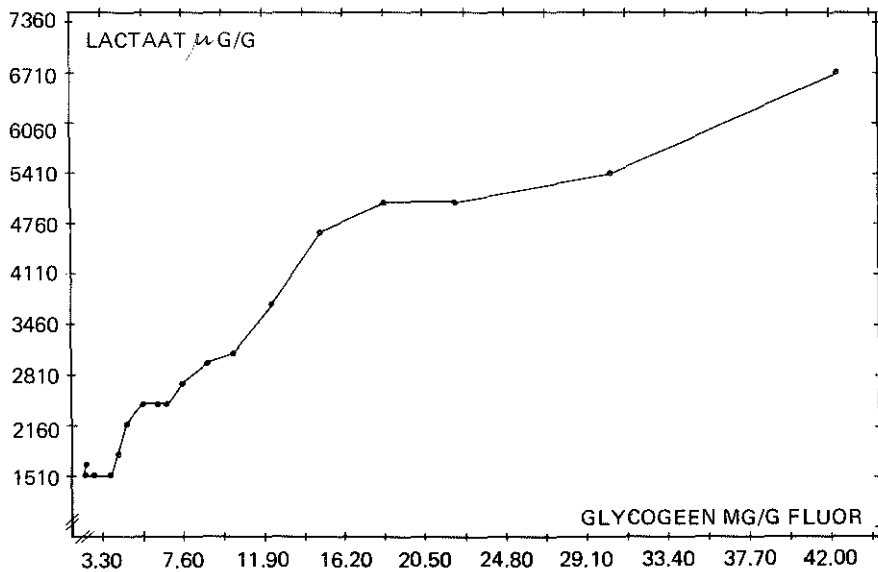
De relaties zoals ze in de figuren 25, 26 en 27 tot uitdrukking komen zijn goed te rijmen met de conceptie dat het vaginale milieu zuur is doordat het vagina epitheelcellen anaeroob stofwisselend een deel van zijn glycogeen voorraad in melkzuur omzetten.

In de folliculaire – en de peri-ovulatoire fase van de cyclus, waarin het plasma oestradiol gehalte toeneemt, neemt de hoeveelheid fluor en de zuurgraad toe, neemt de concentratie DNA af, en blijft de concentratie glycogeen en lactaat in de fluor op vrijwel hetzelfde niveau (hoofdstuk 4, 5, 6, 7 en 8).

Uitgezet tegen het plasma oestradiol gehalte, als funktionele faktor van de folliculaire fase, blijken, boven een oestradiolgehalte van 100-150 pg/ml, deze variabelen een overeenkomstig verloop te heb-



Figuur 25. De relatie van de pH t.o.v. het lactaatgehalte van de fluor vaginalis na median traces bewerking.

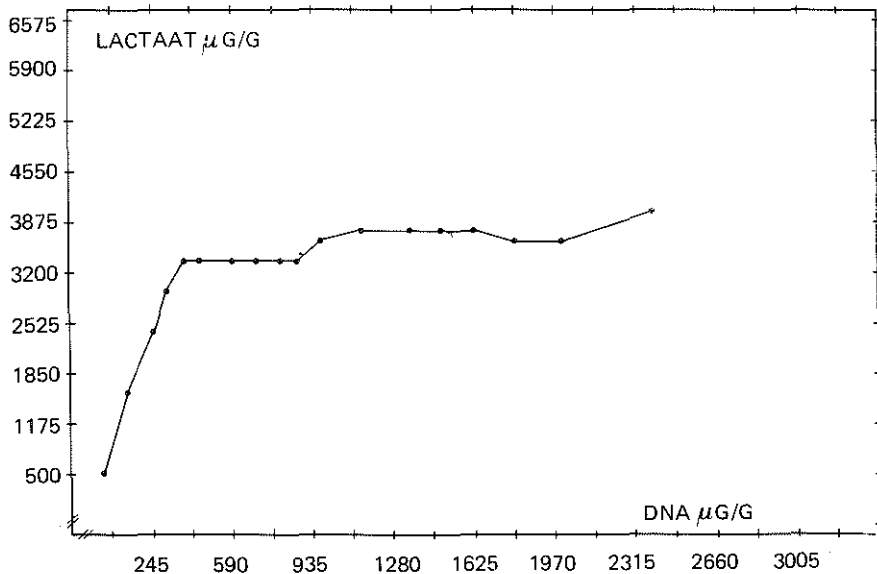


Figuur 26. De relatie van het lactaatgehalte t.o.v. het glycogeengehalte van de fluor vaginalis na median traces bewerking.

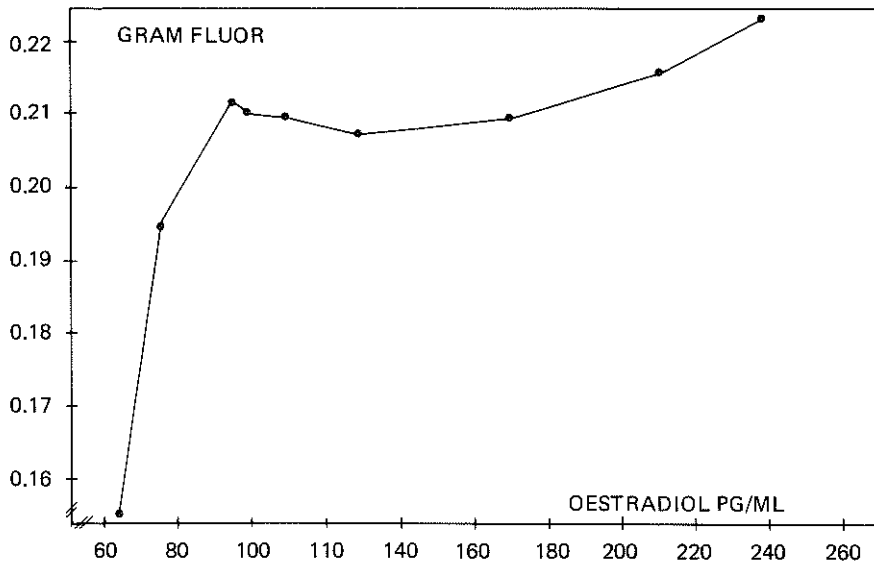
ben (figuur 28 t/m 32). Bij een lager oestradiolgehalte dan 100 pg/ml is er een negatieve correlatie met de pH en de DNA, glycogeen en lactaat concentraties en een positieve correlatie met de hoeveelheid fluor. Dit is mogelijk te verklaren doordat in het begin van de folliculaire fase een verandering optreedt in de transsudatie van weefselvocht door de vaginawand, die toevoeging van méér water en minder bufferstoffen betekent. Het blijft echter opmerkelijk dat de pH van de fluor in dit kader niet stijgt of desnoods gelijk blijft maar zelfs daalt, gezien het dalend verloop van de lactaatconcentratie.

Verschillende factoren kunnen aan de verklaring van dit gebrek aan overeenkomst bijdragen, ook als men aanneemt dat de veronderstelde relatie er wél is:

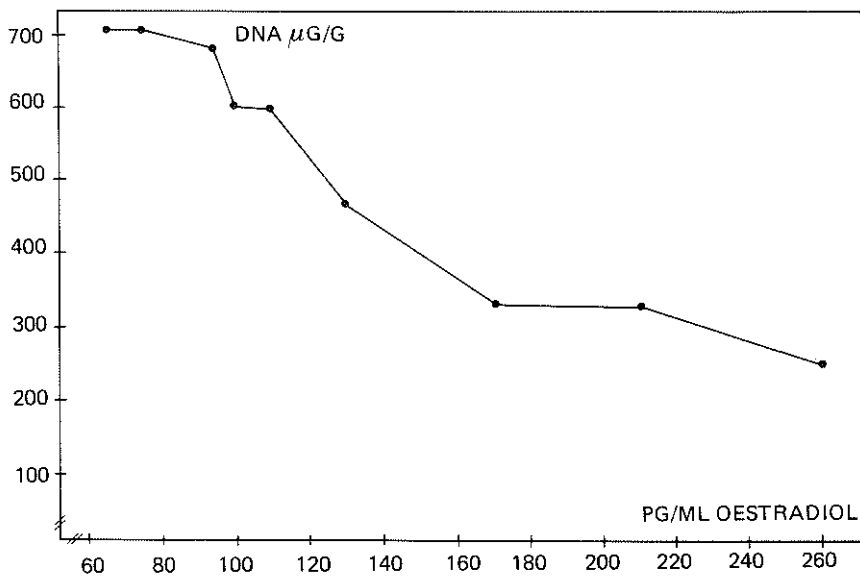
- de grote individuele variatie in waarden per variabele, geeft ook grote onzekerheid bij het te verwachten effect dat voortvloeit uit de bewerking van de waarden.
- als van tweevariabelen hun proces in de tijd verschillend snel verloopt dan zal hun onderlinge relatie verschillen kunnen tonen al naar de lengte van het tijdvak, dat men voor hun vergelijking kiest.



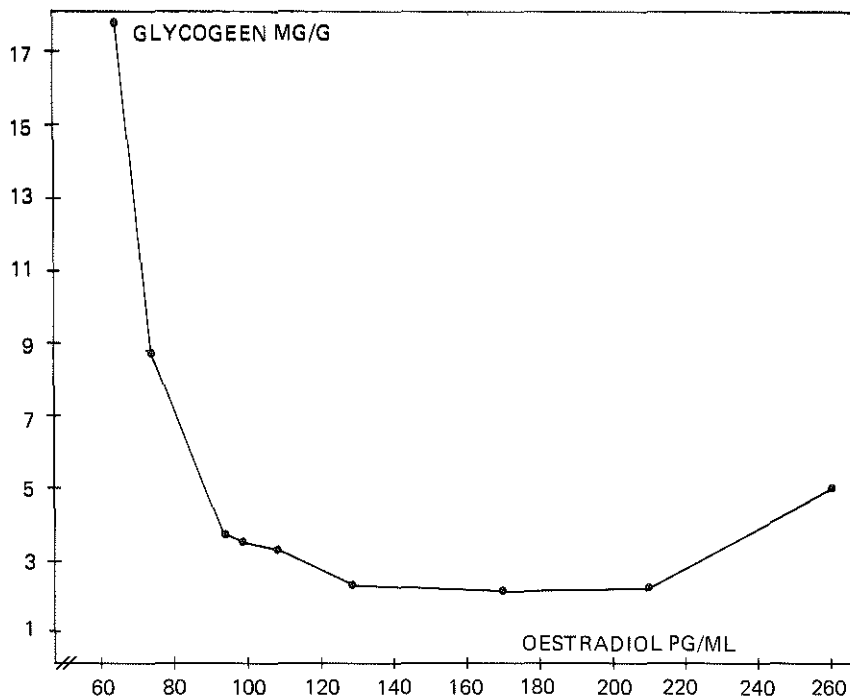
Figuur 27. De relatie van het lactaatgehalte t.o.v. het DNA-gehalte van de fluor vaginalis na median traces bewerking.



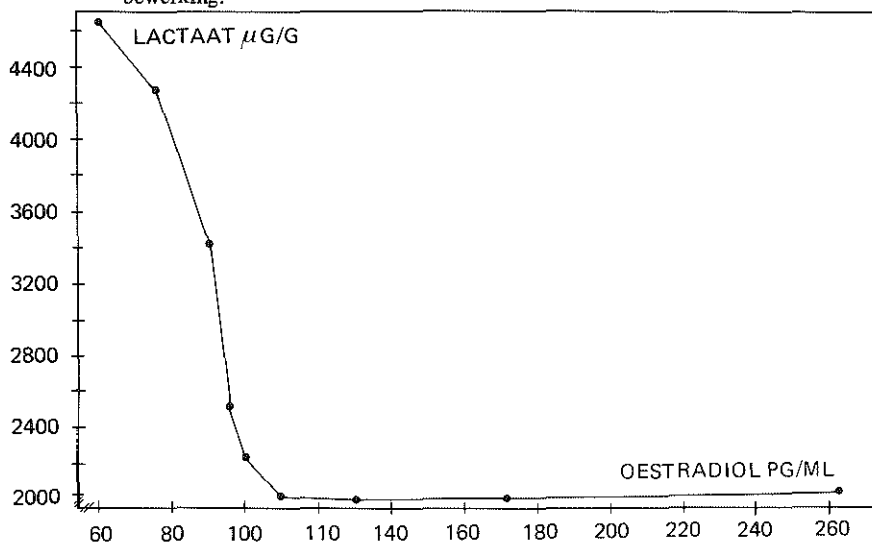
Figuur 28. De relatie van de hoeveelheid fluor vaginalis t.o.v. het plasma oestradiol gehalte in de folliculaire en peri-ovulatoire fase van de cyclus na median traces bewerking.



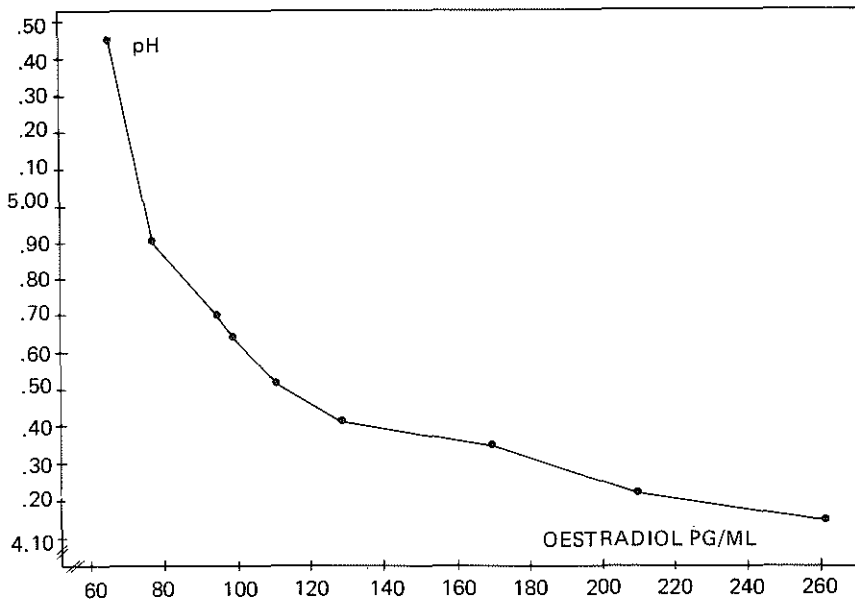
Figuur 29. Relatie van het DNA-gehalte van de fluor vaginalis t.o.v. het plasma oestradiol gehalte van de folliculaire en de peri-ovulatoire fase na median traces bewerking.



Figuur 30. Relatie van het glycogeengehalte van de fluor vaginalis t.o.v. het plasma oestradiol gehalte van de folliculaire en de peri-ovulatoire fase na median traces bewerking.

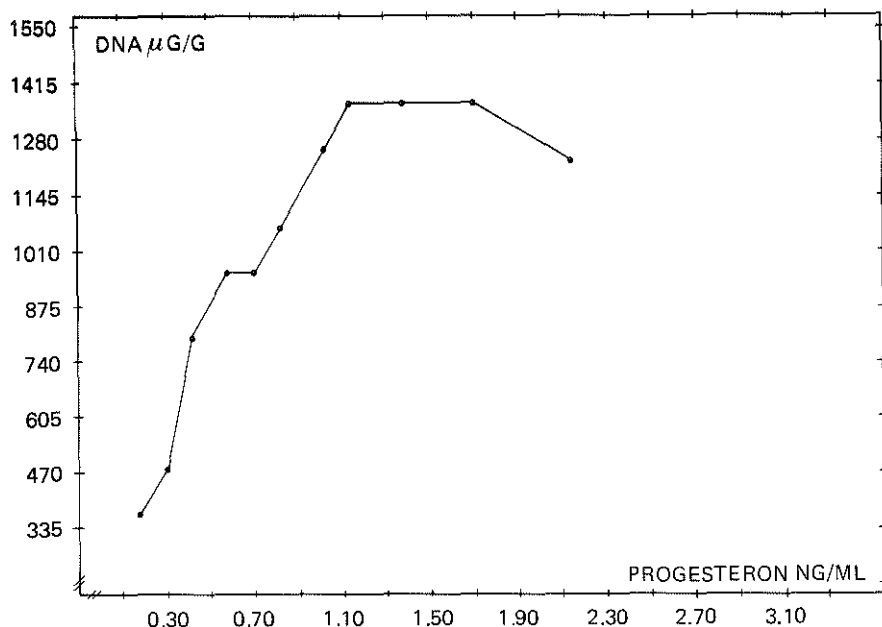


Figuur 31. De relatie van het lactaatgehalte van de fluor vaginalis t.o.v. het plasma oestradiol gehalte in de folliculaire en peri-ovulatoire fase van de cyclus na median traces bewerking.

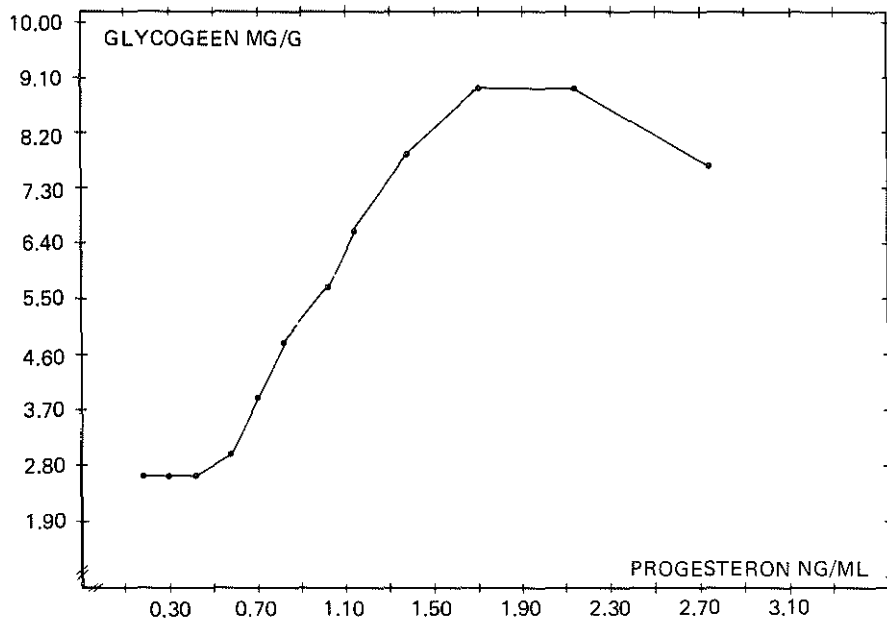


Figuur 32. De relatie van de vaginale pH t.o.v. het plasma oestradiol gehalte in de folliculaire en peri-ovulatoire fase van de cyclus na median traces bewerking.

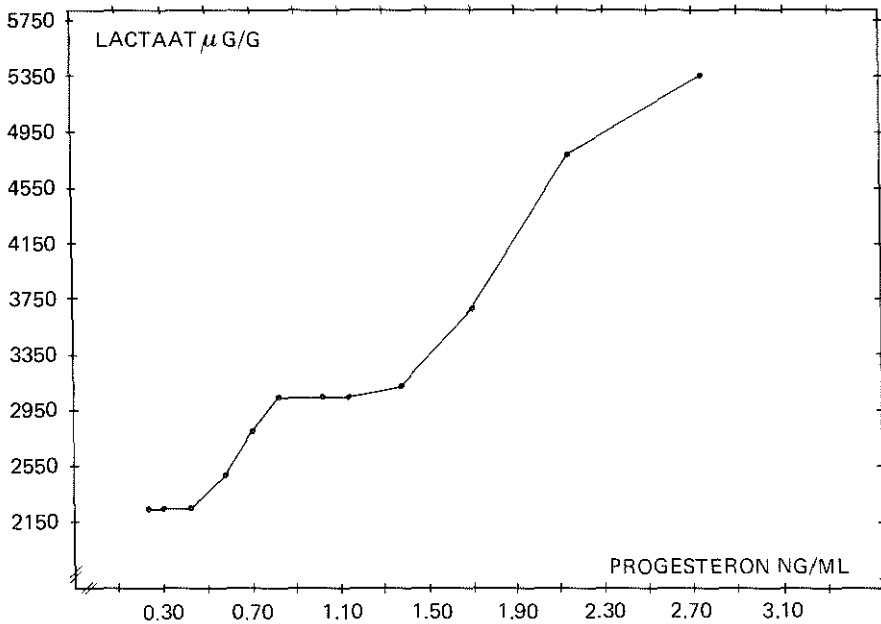
In het begin van de luteale fase stijgt het progesteron gehalte en komt een desquamatie van het vagina epitheel tot stand die cel- en glycogeen gehalte van de fluor opvoert. (zie fig. korrelaties met cyclusverloop, hoofdstuk 5-7). In overeenstemming hiermee is er een fraaie positieve korrelatie tussen de plasma progesteron concentratie enerzijds en DNA-, glycogeen- en lactaatgehalte van de fluor anderzijds. (figuur 33 t/m 35). Zoals te verwachten uit de negatieve korrelatie van pH en lactaatgehalte onderling is de korrelatie van een stijgende plasma progesteron concentratie met de pH ook negatief, (fig. no. 36). De bevindingen en relaties met betrekking tot de luteale fase kunnen worden verklaard door aan te nemen dat na de ovulatie een versterkte desquamatie van vagina epitheel optreedt. Daardoor zal de fluor meer cellen, glycogeen en lactaat kunnen gaan bevatten en in pH eventueel nog dalen. Dat de hoeveelheid fluor ondanks de desquamatie niet toeneemt maar juist afneemt zou kunnen worden toegeschreven aan het tegengaan door progesteron van het effect van oestradiol: de waterige verdunning neemt dan af.



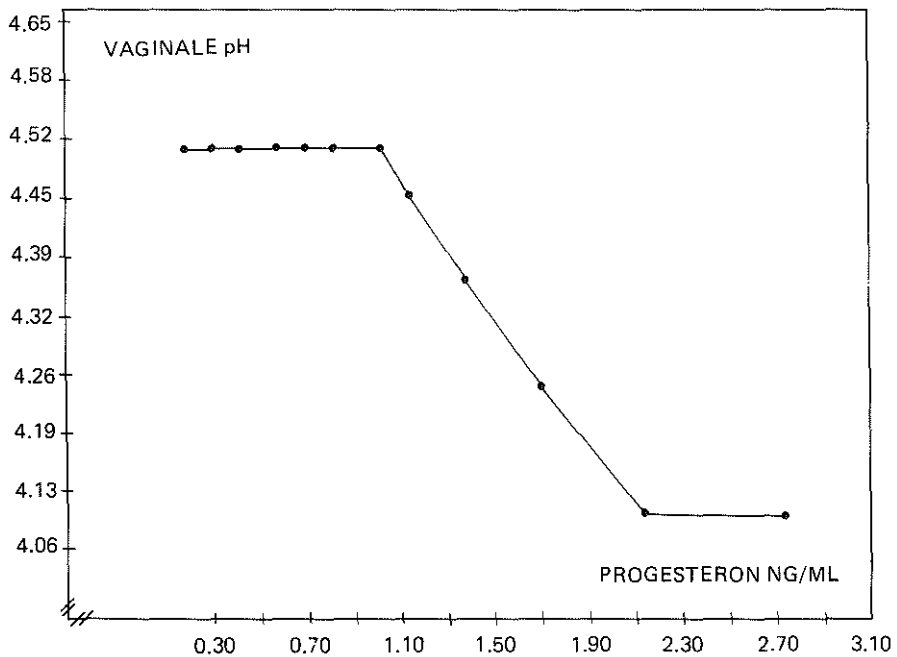
Figuur 33. Relatie van het DNA-gehalte van de fluor vaginalis t.o.v. het plasma progesteron gehalte van de luteale fase na median traces bewerking.



Figuur 34. Relatie van het glycoegehalte van de fluor vaginalis t.o.v. het plasma progesteron gehalte van de luteale fase na median traces bewerking.



Figuur 35. Relatie van het lactaatgehalte van de fluor vaginalis t.o.v. het plasma progesteron gehalte van de luteale fase na median traces bewerking.



Figuur 36. De relatie van de pH t.o.v. het plasma progesteron gehalte van de luteale fase, na median traces bewerking.

T.a.v. de relatie tussen de vaginale pH en de aerobe bacteriële flora blijkt het volgende. In het longitudinaal onderzoek werd bij casus no. 5 in 10 van de 11 afgenomen kweken *E coli* gevonden. De pH varieerde tussen 4.42 en 5.21 en lag op een hoger niveau dan bij de andere 4 vrouwen (hoofdstuk 8). In het transversaal onderzoek werd bij 6 vrouwen *E coli* gekweekt; de gemiddelde pH bedroeg 5.29 (4.20 – 6.47). Bij 13 vrouwen werden lactobacillen in reïncultuur gekweekt. De gemiddelde pH bij deze vrouwen bedroeg 4.38 (3.68 – 5.79); van de 7 vrouwen bij wie andere dan lactobacillen als reïncultuur werden gekweekt bedroeg de gemiddelde pH 4.06 (3.90 – 4.25). Bij aanwezigheid van *E coli* lijkt de pH op een relatief hoog niveau te liggen; anderzijds blijkt de vaginale pH laag te kunnen zijn zonder aanwezigheid van aerobe lactobacillen. Bij aanwezigheid van alleen aerobe lactobacillen verschilt de pH gemiddeld niet van die bij solitaire aanwezigheid van enkele andere aerobe bacteriesoorten. Dit alles pas geheel bij de veronderstelling dat de vagina zijn lage pH niet ontleent aan de aanwezigheid van een lactobacillus flora, maar zelf een lage pH vormt en door dit milieu zijn bacteriële flora selekteert.

Konklusies

De bevindingen van ons onderzoek bevestigen de elementaire aspecten van de normale fluor vaginalis, die uit de literatuur sinds lang naar voren komen: fluor vaginalis is een waterige suspensie van epitheelcellen en diverse soorten bacteriën, is rijk aan glycogeen en lactaat en, buiten de menstruele fase van de cyclus althans, sterk zuur.

Ons onderzoek maakt duidelijk, dat de interindividuele variatie in de waarden van de (onderzochte) samenstellende delen van de fluor groot is, ook wanneer rekening gehouden wordt met de invloed van de cyclus en van de lokatie van de fluor in de vagina ten opzichte van cervix en introitus en wanneer het materiaal geselekteerd is op criteria, die het fysiologisch karakter van het vaginale milieu bepalen.

De grote spreiding in de bepalingsuitkomsten mag niet alleen

worden toegeschreven aan de meer of minder grote variatiecoëfficiënt van de toegepaste verzamel- en bepalingstechnieken. Ook van invloed zal zijn een grote endogene biologische variatie in de fluor als (eind)produkt van het totaal aan afscheidingen van en via de tractus genitilis en van de chemische reacties die in dit mengsel plaatsvinden. En tenslotte wordt op het vaginale milieu een fysiologisch te achten exogene invloed uitgeoefend door de nabijheid van de twee excretie-openingen van het lichaam en door handelingen die te maken hebben met de persoonlijk hygiëne en het sexueel gedrag.

Wat betreft eventuele veranderingen in de samenstelling van de fluor in de loop van de menstruele cyclus – waarover geen enkel betrouwbaar gegeven tot heden bekend was – kon worden vastgesteld, dat in de folliculaire fase de hoeveelheid fluor en de zuurgraad beide toenemen, terwijl de concentratie cellen afneemt, en de concentraties glycogeen en lactaat gelijk blijven.

Betrokken op het plasma oestradiol, als functionele faktor van de folliculaire fase, blijkt het oestradiol slechts tot een plasma gehalte van 100 pg/ml een negatieve korrelatie te hebben met pH, DNA-, glycogeen- en lactaat-koncentraties en een positieve korrelatie met de hoeveelheid fluor. Mogelijk is dit zo te interpreteren, dat in het begin van de folliculaire fase een verandering optreedt in de transudatie van weefselvocht door de vaginawand, die toevoeging van méér water en minder bufferstoffen betekent. Overigens is over de aard en de kwantiteit der in fluor aanwezige bufferstoffen niets anders bekend dan de aanwezigheid van het maar matig bufferende melkzuur-lactaat systeem.

In de luteale fase blijft de zuurgraad ongeveer even laag (tot aan het premenstruum), neemt de hoeveelheid fluor af en de concentratiecellen glycogeen en lactaat vermoedelijk juist toe. Het ligt voor de hand hierin een eventueel tweeledig effect van het progesteron te zien: het tegengaan van het oestrogene transsudatie effect in de vaginawand en het op gang brengen van een sterkere desquamatie van het epitheel.

De door de gegevens van ons onderzoek gesuggereerde invloed van de menstruele cyclus op de samenstelling van de fluor is goed te rij-

men met wat bekend is over de invloed van de vrouwelijke geslachtshormonen op de vaginawand die toch goeddeels de bron van de fluor is. Onder invloed van de oestrogenen neemt de bloeddorstrooming toe, prolifereert het epitheel en neemt de glycogeenopslag in de cellen toe; onder invloed van het progesteron is er in de luteale fase een versterkte desquamatie van het zo voorbereide epitheel.

Er zijn geen gegevens in de literatuur noch in de resultaten van ons onderzoek die ervoor pleiten dat de samenstelling van de bacteriële flora primair van invloed is op het tot stand komen van het sterk zure karakter van het vaginale milieu. Alle gegevens voegen zich daarentegen moeiteloos in de conceptie dat de vaginale flora de bacteriën omvat die daar terecht komen en zich in het door de vagina zelf bepaalde milieu zozeer thuis voelen of aanpassen dat ze zich vermenigvuldigen. Het vaginale milieu is waarschijnlijk primair zuur door het anaeroob karakter van de stofwisseling der epitheelcellen in de oppervlakkige lagen van de wand en – na afschilfering – in de fluor.

SAMENVATTING

In hoofdstuk 1 wordt het doel van het onderzoek aangegeven. In navolging van Döderlein (1892) wordt algemeen aangenomen dat het vaginale milieu zuur is doordat lactobacillen het vaginale glycogeen omzetten in melkzuur. Stewart-Tull (1964) en Wylie en Henderson (1969) toonden echter aan dat de vaginale lactobacillen niet als regel maar bij hoge uitzondering glycogeen als substraat kunnen gebruiken. Blijkbaar gaat de aloude theorie over de oorzaak van het sterk zure karakter van het vaginale milieu niet op.

Meer voor de hand ligt dat de vaginaholte zuur is door een anaerobe stofwisseling van de epitheelcellen in de wand en in de fluor. Om meer inzicht te krijgen in het fysiologische vaginale milieu werd een onderzoek opgezet naar enkele vooral met het oog op het karakter van het vaginale milieu belangrijke componenten van de vaginale fluor.

In hoofdstuk 2 wordt de opzet, uitvoering en bewerking van het onderzoek beschreven.

De opzet van het onderzoek was om bij vrouwen in de fertiele levensfase met normaal vaginaal milieu vast te stellen hoe de vaginale pH en de fluor vaginalis, wat betreft de hoeveelheid, celgehalte, lactaat concentratie en de samenstelling van de bacteriële flora is in het verloop van de cyclus. Aangenomen werd dat het vaginale milieu als normaal kan worden aangemerkt wanneer de vrouw geen fluorklachten heeft en de fluor macroscopisch normaal van aspect is. Teneinde de onderzochte fluor variabelen te kunnen relateren aan de hormonale status werden bij de vrouwen van het fluor onderzoek tevens de plasma oestradiol- en progesterongehalten bepaald. Om een indruk te krijgen over het cyclisch verloop der fluor factoren werd een longitudinaal onderzoek verricht bij een 5-tal vrouwen. Ter nadere evaluatie werd bij een veel groter aantal vrouwen (137) een transversaal onderzoek verricht.

Aleen de gegevens van het transversaal onderzoek konden statistisch bewerkt worden. Om voor elke variabele het verloop in de cyclus zichtbaar te maken werd gebruik gemaakt van "smoothing of sequences" (Tukey 1977). Om de onderlinge relatie tussen de variabelen zichtbaar te maken werd gebruik gemaakt van de "median traces" methode (Tukey 1977).

In hoofdstuk 3 wordt het verloop van het plasma oestradiol- en progesteron-gehalte in de menstruele cyclus beschreven, zoals dit uit de literatuur bekend is. De gegevens van het eigen onderzoek blijken overeen te komen met dit beeld.

Voor het longitudinaal onderzoek werden de plasma oestradiol en progesteron waarden als functie van de menstruele cyclus weergegeven met de oestradiolpiek als referentiepunt.

Bij de vrouwen van het transversaal onderzoek werd op grond van hun plasma progesteron gehalte beoordeeld in hoeverre zij, mede gegeven het rangnummer van de cyclusdag waarop zij onderzocht werden, ondergebracht mochten worden in de fasen van de cyclus: folliculaire fase, periovlatoire fase, luteale fase. Van de 137 vrouwen werden van de nadere evaluatie 37 vrouwen uitgesloten, bij wie het gevonden progesterongehalte niet paste in het kader van een ovulatoire cyclus van maximaal 30 dagen.

Hoofdstuk 4 beschrijft het onderzoek naar de in de loop van de cyclus aanwezige hoeveelheid fluor vaginalis. De aanwezige hoeveelheid fluor werd d.m.v. een speciaal voor het onderzoek ontworpen apparaatje door afzuigen in een cupje verzameld. Blijkens de resultaten van het onderzoek neemt de hoeveelheid fluor in de folliculaire fase significant toe tot een maximum dat in de peri-ovulatoire fase bereikt wordt. Na de ovulatie daalt de hoeveelheid fluor vrij snel tot een niveau als in het begin van de folliculaire fase en handhaaft zich daar in de rest van de luteale fase.

Hoofdstuk 5 omvat het onderzoek naar het DNA-gehalte van de fluor, dat als maatstaf voor het fluor cel-gehalte kan dienen. Het bleek dat de fluor DNA-koncentratie in de folliculaire fase significant daalt tot een minimum dat pas in de peri-ovulatoire fase bereikt wordt.

Daarna treedt een stijging op tot een maximum reeds vroeg in de luteale fase.

Hoofdstuk 6 handelt over het onderzoek naar het glycogeengehalte van de fluor. De enzymatische methode, die voor de bepaling van het fluor glycogeengehalte werd gebruikt, wordt beschreven.

Intra- en inter-individueel bleek het fluor glycogeengehalte te variëren van 2 tot 50 mg/g.

Het verloop van het fluor glycogeengehalte gedurende de menstruele cyclus vertoonde een opmerkelijke gelijkenis met dat van het plasma oestradiolgehalte: stijging in de folliculaire fase, een top in de periovulatoire fase en een tweede top in de loop van de luteale fase.

Hoofdstuk 7 geeft het onderzoek weer naar het lactaatgehalte van de fluor. De enzymatische methode, die ter bepaling van het fluor lactaatgehalte werd toegepast, wordt beschreven.

Inter- en intra-individueel werd een variatie van het fluor lactaatgehalte gevonden van 1 tot 10 mg/g.

In de folliculaire fase bleek het lactaatgehalte relatief laag en konstant; vroeg in de luteale fase leek er een stijging van het lactaatgehalte te zijn, laat in de luteale fase een daling.

Hoofdstuk 8 bespreekt de vaginale pH en ons onderzoek daarnaar. Wij bepaalden de vaginale pH elektrometrisch m.b.v. een glaselektrode in een voor dit onderzoek speciale uitvoering: de referentie elektrode is vlak naast de meetelektrode geplaatst zodat zeer lokaal nauwkeurig meten mogelijk is.

Wij vonden dat de pH, door ons gemeten halverwege de vagina zijwand, varieert rond 4.5 met uiterste waarden van 3.0 en 5.2. Uit ons onderzoek bleek dat de pH in de folliculaire fase daalt, peri-ovulatoir en luteaal min of meer konstant blijft en premenstrueel stijgt.

In hoofdstuk 9 wordt de bacteriële flora van het normale vaginale milieu besproken.

Overeenkomstig de literatuurgegevens blijkt uit eigen onderzoek van de aerobe vaginale flora dat er een grote inter- en intra-individuele variatie in de vaginale bacteriële populatie bestaat. De ovariële cyclus

bleek niet van invloed op de samenstelling van de aerobe bacteriële flora.

In hoofdstuk 10 worden de onderlinge relaties van de onderzochte fluor variabelen nagegaan en konklusies getrokken.

De vaginale pH blijkt lager naarmate de fluor meer lactaat bevat. Er is een positieve korrelatie van de hoeveelheid cellen en glycogeen in de fluor met het lactaatgehalte, Dit past bij de conceptie dat het vaginale milieu zuur is doordat het vaginale epitheel anaeroob stofwisselend zijn glycogeen voorraad deels in melkzuur omzet.

Om inzicht te verkrijgen in de invloed van de ovariële cyclus op de fluor werden voor alle onderzochte relaties de verwerkte waarden onderscheiden al naar ze betrekking hebben op de folliculaire fase of op de luteale fase.

In de folliculaire fase neemt de hoeveelheid fluor en de vaginale zuurgraad toe, blijft de fluor glycogeen- en lactaatconcentratie gelijk en daalt de fluor DNA-concentratie. Het plasma oestradiolgehalte blijkt, tot een niveau van 100 pg/ml, in negatieve korrelatie te staan met de vaginale pH en de fluor DNA- glycogeen- en lactaatconcentraties en in positieve korrelatie met de hoeveelheid fluor. De overeenstemming tussen de gevonden relaties bezien vanuit de tijd in de cyclus en vanuit het plasma oestradiolgehalte, versterkt hun waarschijnlijkheid. De bevindingen passen bij de veronderstelling dat in de folliculaire fase onder invloed van het effect van oestradiol op de vagina wand het vaginale milieu zuurder en waterig verdund wordt.

In de luteale fase blijft de zuurgraad ongeveer even laag, neemt de hoeveelheid fluor af en de concentratie cellen, glycogeen en lactaat juist toe. Goed in overeenstemming hiermee zijn de relaties van de verschillende fluor variabelen met het plasma progesteron-gehalte. De bevindingen passen bij de veronderstelling dat o.i.v. het progesteron de desquamatie van het vagina-epitheel toeneemt en het proces van waterige verdunning van de fluor, tot stand gekomen o.i.v. het oestradiol, afneemt.

Wat betreft de relatie tussen de vaginale zuurgraad en de aanwezige aerobe bacteriële flora; de gemiddelde pH van fluor met lactobacillen reïncultuur is niet lager dan die van fluor met reïncultuur van andere bacteriën. Ook zonder de aanwezigheid van lactobacillen werd een lage

pH gevonden. Alle bevindingen passen bij de veronderstelling dat de vagina zijn lage pH niet ontleent aan de aanwezigheid van lactobacillen maar zelf een lage pH vormt en daarmee zijn bacteriële flora selekteert.

SUMMARY

In chapter 1 the object of the study is described. According to Döderlein (1892) the acidity of the vaginal environment is determined by the lactobacilli which catalyze the conversion of glycogen to lactic acid. However, Stewart-Tull (1964) and Wylie and Henderson (1969) were able to demonstrate that vaginal lactobacilli only very rarely employ glycogen as a substrate. This would put Döderlein's theory in a very doubtful light. An association between vaginal acidity and anaerobic metabolism in epithelial cells both from the vaginal lining and in vaginal secretion seems more likely. To increase our understanding of the physiological aspect of the vaginal environment, a study was designed to examine those components in vaginal secretion which are of direct physiological importance with regard to the nature of the vaginal environment.

In chapter 2, the design and methodology of the study is presented. The set-up of the study was to investigate vaginal pH and vaginal secretion as reflected by quantity, number of epithelial cells, lactate concentration and nature of bacterial flora in the course of the menstrual cycle. It is appropriate to consider the vaginal environment as being normal when no complaint of vaginal discharge has been expressed and vaginal secretion was found to be macroscopically normal. Plasma oestradiol and progesterone estimations were done in order to relate the different variables of vaginal secretion to the endocrinological status of the woman.

Cyclic changes in the various factors of the vaginal secretion were assessed in a longitudinal study in 5 women and in cross-sectional study in 137 women; statistical analysis was only permitted in the cross-sectional data.

Statistical smoothing of sequences (Tukey 1977) was carried-out for each variable in order to identify its trend during the menstrual cycle.

Interrelationships between the variables were studied using the method of median traces (Tukey 1977).

In chapter 3 the oestradiol and progesterone pattern in the normal menstrual cycle is presented. Our data seemed to be in agreement with those in literature. In the longitudinal study the plasma oestradiol and progesterone values were expressed as a function of the menstrual cycle, the midcycle oestradiol peak acting as a reference.

In the cross-sectional study women were considered as being follicular, periovulator or luteal phase on the basis of the day of the menstrual cycle and the plasma progesterone level. In 37 of the 137 women the plasma progesterone level indicated a menstrual cycle of more than 30 days. These cases were dropped from further study.

Chapter 4 presents data on the changes in vaginal secretion in the course of the menstrual cycle. Vaginal secretion was aspirated by means of a specially developed suction device and collected in a small cup. During the follicular phase, a significant increase in the amount of vaginal secretion reaching a maximum in the periovulatory phase was observed. After ovulation a reduction in quantity to early follicular levels followed by a more consistent pattern during the remainder of the luteal phase was seen.

Chapter 5 discusses the cellular fraction of vaginal secretion as reflected by the DNA-concentration within the epithelial cell. DNA levels show a significant decrease in the follicular phase reaching minimum levels in the periovulatory phase, followed by a rise early in the luteal phase.

Chapter 6 deals with the glycogen concentration in vaginal secretion. A description of the enzymatic procedure for measuring glycogen level is given. Intra and inter-individual glycogen concentrations varied from 2 to 50 mg. per g. of vaginal secretion. The glycogen pattern during the menstrual cycle is very similar to that of plasma oestradiol: a rise during the follicular phase reaching a maximum during the periovulatory phase and a second rise in the luteal phase.

Chapter 7 presents the lactate levels in vaginal secretion and the enzymatic method employed. Intra and inter-individual variations in lactate concentration from 1 – 10 mg. per g. of vaginal secretion were found. During the follicular phase, the lactate level was relatively low and constant; a rise was observed in the early luteal phase followed by a decrease in the luteal phase.

Chapter 8 discusses data on vaginal pH. Measurement of vaginal pH was carried-out electrometrically, using a specially designed glass electrode. The reference electrode is closely situated to the measuring electrode, thus enabling us to perform accurate local measurements. The pH in the middle one-third of the vagina was approximately 4.5 with an upper and lower limit of 5.2 and 3.0. The pH showed a decrease during the follicular phase, a stable pattern during the periovulatory and luteal phase and a rise prior to the next menstrual period.

Chapter 9 presents data on the bacterial flora in normal vaginal secretion. According to data in literature, the aerobic vaginal flora demonstrates a marked intra and inter-individual variation in bacterial population. The menstrual cycle did not appear to have any effect on the composition of the aerobic bacterial flora.

In chapter 10 the relationships between the various factors in the vaginal secretion are assessed and conclusions are drawn. A low vaginal pH corresponds with a high lactate level and vice versa. There is a positive correlation between the number of cells and glycogen level in vaginal secretion on the one hand and lactate level on the other hand. This fits in with the concept that the acidity of the vaginal environment is determined by the anaerobic conversion of glycogen to lactic acid within the vaginal epithelial cell. The influence of the menstrual cycle on vaginal secretion was assessed by analyzing data from the follicular and luteal phase separately. In the follicular phase, vaginal secretion is characterized by: an increase in quantity and acidity, a stable glycogen and lactate level and a decrease in DNA-level. Up to a level of 100 pg/ml, oestradiol is inversely related to vaginal pH, DNA, glycogen and lactate concentrations and positively related

to the amount of vaginal secretion. The findings support the hypothesis that during the follicular phase the effect of oestradiol on the vaginal lining results in the vaginal environment becoming increasingly acid and watery.

The luteal phase is characterised by a constant pH, a reduction in the amount of vaginal secretion and a rise in glycogen and lactate. This is in agreement with the correlations found between the different variables in vaginal secretion and plasma progesterone level.

This data supports the supposition that progesterone promotes the desquamation of vaginal epithelium and inhibits the dilution of vaginal secretion brought about by oestradiol.

As far as the relationship between vaginal pH and aerobic bacterial flora is concerned, the mean pH in vaginal secretion containing a pure culture of lactobacilli is not lower than that in vaginal secretion containing a culture of other microorganisms.

Even in the absence of lactobacilli a low pH was found. All data presented in this study indicate that, rather than the lactobacillus, the vaginal environment is of crucial importance in the establishment of a low pH and subsequent selection of the bacterial flora.

LITERATUURLIJST

- BARKER, S.B., SUMMERSON, W.H. (1941): Kolorimetrische Milchsäurebestimmung in biologischem Material, *J. biol. Chem.* 138 : p. 535.
- BARTLETT, J.G., ONDERDONK, A.B., DRUDE, E., GOLDSTEIN, C., ANDERKA, M., ALPERT, S., Mc. CORMACK, W.H. (1977): Quantitative Bacteriology of the vaginal flora. *J. of Infections Dis.* 136, 2 : p. 271.
- BOCK, A., WOLFF, L. (1933): Untersuchungen über die Säurestufe des vaginalen und cervicalen Sekretes. *Arch. Gynäkol.* 152 : p. 501.
- BURTON, K. (1956): A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62 : p. 315.
- COHEN, L. (1969): The influence of pH on vaginal discharge Brith. *J. Vener. Dis.*, 45 : p. 241.
- CORNELISSE, C.J., PLOEM, J.S. (1976): A new type of two colour fluorescence staining for cytology specimens. *J. Histochem. cytochem.* 24 : p. 72.
- CROFT, D.N., LUBRAN, M. (1965): The estimation of deoxyribonucleic acid in the presence of sialic acid: application to analysis of human gastric washings. *Biochem. J.* 95 : p. 612.
- CRUICKSHANK, R., SHARMAN, A. (1934): The biology of the vagina in the human subject. *J. Obstet. Gynecol. Brit. Emp.* 41 : p. 190.
- DEMME, R., BALTZER, V. (1927): Biologisch chemische und bakteriologische Studien des Scheidensekretes im Verhältnis zur Menstruation. *Arch. Gynäkol.* 128 : p. 900.
- DISCHE, Z. (1930): Über einige neue charakteristische Farbeaktionen der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen. *Mikrochemie* 8 : p. 4.
- DÖDERLEIN, A. (1892): Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. Verlag von E. Besold. Leipzig.
- DONAT, H., BERNOTH, E. (1972): H-Ionenkonzentration im uterovaginalen Bereich. *Zentralblatt f. Gynäkol.* 37 : p. 1222.
- EDMUNDS, P.N. (1962): The biochemical, serological and haemagglutinating reactions of "haemophilus vaginalis". *J. Path. Bact.* 83 : p. 411.
- EISA, E.A. (1950): The formation of lactic acid in the vagina of the adult rat. *Acta Endocrinol.* 4 : p. 285.
- GÄNSSLE, H. (1918): Die Wasserstoffionenkonzentration im Scheidensekret. *Arch. Gynäkol.* 123 : p. 602.
- GELLER, F.C. (1925): Untersuchungen zur Biologie der Vagina. *Arch. Gynäkol.* 125 : p. 408.
- GÖTTINGER, E., HAGMULLER, K., HELLAUER, H. (1959): Zur Sekretion der Vaginalwand. *Zeitschr. f. Geburtshilfe und Gynäkologie* 153 : p. 4.
- GRAGERT, O. (1932): Zur Biologie der Vagina des Menschen. *Arch. Gynäkol* 150 : p. 57.
- GREGOIRE, A.T., KANDIL, O., LEDGER, W.J. (1971): The glycogen content of human vaginal epithelial tissue. *Fertility and Sterility* 22,1 : p. 64.

- GUTHMANN, T., WAHLFELD, A. (1974): Determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: Methoden der enzymatische Analyse Band II H. v. Bergmeyer 2^o ed. Verlag Chemie.
- GUTHMANN, H., KOCH, M. (1932): Der Säuregrad des Vaginalsekretes. Arch. Gynäkol 150 : p. 57.
- HUNTER, C.A., LONG, K.R. (1958): A study of the microbiological flora of the vagina. Amer. J. Obstet. Gynec. 75 : p. 865.
- KEPPLER, D., DECKER, K. (1970): Glykogen Bestimmung mit Amyloglucosidase. In: Methoden der enzymatische Analyse Band II H. v. Bergmeyer Verlag Chemie 1970.
- KIENLIN, H. (1927): Die Reaktion des Vaginalsekrets Neugeborener. Zentralblatt Gynäkol. 11 : p. 664.
- JONG, F.H. de, HEY, A.H., MOLEN, H.J. van der (1973): Effect of gonadotrophins on the secretion of oestradiol-17 β and testosterone by the rat testis. J. Endocr. 57 : p. 277.
- JONG, F.H. de, BAIRD, D.T., MOLEN, H.J. van der (1974): Ovarian secretion rates of oestrogens, androgens and progesterone in normal women and in women with persistent ovarian follicles. Acta Endocrinol. 77 : p. 575.
- LEUCHTENBERG, C., VENDRELY, R., VENDRELY, C. (1951): A comparison of the content of deoxyribonucleic acid (DNA) in isolated animal nuclei by citochemical and chemical methods. Proc. Nat. Acad. Sc. 37 [1] : p. 33.
- MATTER, R. (1955): Über histochemische Untersuchungen der Vaginalschleimhaut. Gynaecologia (Basel) 139 : p. 227.
- MENDEL, B., GOLDSCHIEDER, I. (1925): Kolorimetrische Mikromethode zur Milchsäurebestimmung im Blut. Klinische Wochenschr. Jahrg. IV. Nr. 12 : p. 17.
- MICHAELIS, L., GEYMANT, A. (1920): Die Bestimmung der Wasserstoffzahl durch Indikatoren. Deutsch Med. Wochenschr. 45 : p. 165.
- MISHELL, D.R., NAKAMURA, R.M., CROSIGNANI, P.J., STONE, S., KHARMA, K., NAGATA, Y., THORNEYCROFT, I.H. (1971): Serum gonadotrophin and steroid patterns during the normal menstrual cycle. Amer. J. Obstet. Gynec. 111, 1 : p. 60.
- MORRIS, C.A., MORRIS, D.F. (1967): "Normal" vaginal microbiology of women of child-bearing age in relation to the use of oral contraceptives and vaginal tampons. J. clin. Path. 20 : p. 636.
- MÜLLER, D. (1960): Die pH Werte von Zervix und Vagina in ihrer Beziehung zur Ovarialfunktion und Konzeption. Z. Geburtsh. Gynäkol. 155 : p. 272.
- OBERTS, E.W., PLASS, E.D. (1936): Human vaginal discharge. Amer. J. Obstet, Gynec. 32 : p. 22.
- PEETERS, F., SNAUWAERT, R., SEGERS, J., CUSTEM, J. van, AMERY, W. (1972): Observations on candidal vaginitis. Amer. J. Obstet. Gynec. 112, 1 : p. 80.
- RAKOFF, A.E., FEO, L.G., GOLDSTEIN, L. (1944): The biologic characteristics of the normal vagina. Amer. J. Obstet. Gynec. 47 : p. 467.
- SCHRÖDER, R. (1925): Ergebnisse scheiden biologischer Forschungen. Arch. Gynäkol. 125 : p. 403.
- SCHRÖDER, R., HINRICHS, R., KESSLER, R. (1926): Uterus und Scheide der Quelle als Fluor genitalis. Arch. Gynäkol 128 : p. 94.
- SCHULTHEISZ, H. (1929): Beiträge zur Biologie der Scheide. Arch. Gynäkol. 136 : p. 66.
- SHAABAN, M.M., KLOPPER, A. (1973): Plasma oestradiol and progesterone concentration in the normal menstrual cycle. The J. of Obstet. and Gynecol of the Br. Comm. 80 : p. 776.

- STEWART-TULL, B.A. (1964): Evidence that vaginal lactobacilli do not ferment glycogen. Amer. J. Obstet. Gynec. 88,5 : p. 676.
- STONE, A., GAMBLE, C.J. (1959): The quantity of vaginal fluid. Am. J. Obstet. Gynec. 78 : p. 281.
- TASHJIAN, J.H., COULAM, C.B., WASHINGTON, J.A. (1976): Vaginal flora in asymptomatic women. Mayo Clinic. Proc. 51 : p. 557.
- TRUSSEL, R.E., DOUGAL, M. (1940): Vaginal acidity (in vivo glass electrode measurements) in late pregnancy and its relation to the vaginal flora. Amer. J. Obstet. Gynec. 39 : p. 77.
- TUKEY, J.W. (1977): Exploratory data analysis. Addison-Wesley Publishing Company-London.
- WYLIE, J.G., HENDERSON, A. (1969): Identity and glycogenfermenting ability of lactobacilli isolated from the vagina of pregnant woman. J. Med. Microbiol. 2 : p. 363.
- ZWEIFEL, R. (1908): Der Scheideninhalt Schwangerer. Arch. Gynakol. 86 : p. 564.

Curriculum vitae

De schrijver van dit proefschrift werd op 20 januari 1941 in Rotterdam geboren; alwaar hij in 1960 het eindexamen gymnasium^β deed.

In Utrecht begon hij zijn studie medicijnen en behaalde in 1966 zijn doctoraalexamen; zijn artsexamen volgde in 1969 in Rotterdam; hierna vervulde hij zijn dienstplicht.

In april 1971 ving hij zijn specialisatie tot vrouwenarts aan in het Sint Franciscus Gasthuis te Rotterdam o.l.v. Dr H.P.C.M. Hoyneck van Papendrecht en Dr A.J.M. Duyzings; van april 1975-1976 voltooide hij deze opleiding in het A.Z.R.-Dijkzigt o.l.v. Prof. Dr. A.C. Drogendijk

Thans is hij als gynaecoloog werkzaam in samenwerking met Dr. H.P.C.M. Hoyneck van Papendrecht en H.P. Cremers in het Sint Franciscus Gasthuis.

