

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

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese

**Nachweis von Candida – Spezies, Bewertung von Risikofaktoren für eine
Vulvovaginalcandidose und Bestimmung der Zytokine Interleukin-1 β ,
Interleukin-4, Interleukin-6, Interleukin-8 sowie des Leukämie inhibierenden
Faktors LIF im Vaginalsekret von schwangeren Frauen mit Verdacht auf eine
Vulvovaginalcandidose**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Kristin Daniela Rauch

aus

München

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Frank Ebel

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. habil. H. Spitzbart

Dr. rer. nat. G. Anton

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2010

Meinem Mann, meinen Töchtern, meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1. Vulvovaginalcandidose	9
1.2. Therapie	13
1.3. Immunantwort	15
2. Fragestellung	18
3. Material und Methode	19
3.1. Material	19
3.1.1. Patientengut	19
3.1.2. Proben	20
3.1.3. Bestimmung des Reinheitsgrades	20
3.1.4. Kultur	20
3.1.5. PCR	21
3.1.6. ELISA	25
3.1.7. Sonstiges Material	26
3.2. Methode	27
3.2.1. Vaginalabstriche	27
3.2.2. Vaginallavage	27
3.2.3. Reinheitsgrad	28
3.2.4. Kulturelle Anzüchtung	28
3.2.5. Kulturelle Differenzierung	29
3.2.6. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	29
3.2.7. Zytokinbestimmung mittels ELISA	36
3.2.8. Statistische Methoden	41
4. Ergebnisse	43
4.1. Patientendaten	43
4.1.1. Alter	43
4.1.2. Schwangerschaftswoche	45
4.1.3. Anzahl der Schwangerschaften	46
4.1.4. Aborte	48
4.1.5. Risiken	50
4.1.6. Allergien	53

4.1.7. Nikotinabusus	56
4.2. Beschreibung der Candidose	57
4.2.1. Reinheitsgrad	57
4.2.2. Kultur	59
4.2.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	61
4.2.4. Vergleich PCR – Kultur	63
4.3. Analyse der Interleukine und LIF	65
4.3.1. IL-1β	65
4.3.2. IL-4	67
4.3.3. IL-6	69
4.3.4. IL-8	71
4.3.5. LIF	73
5. Diskussion	75
6. Zusammenfassung	86
7. Literaturverzeichnis	89
8. Anhang	97
8.1. Rohdaten	97
8.2. Danksagung	101
8.3. Curriculum Vitae	102

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Acetylcholin
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle
Aqua a.i.	Aqua ad iniectabilia
bp	Basenpaare
Candida spp.	Candida-Spezies
CD	Cluster of differentiation
CMI	Zellvermittelte Immunität
CRVVC	Chronisch rezidivierende Vulvovaginalcandidose
df	Freiheitsgrad (degree of freedom)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent- assay
EDTA	Ethylendiamintetraacid
HILDA	Human interleucine for DA cells
HAE III	Typ III Restriktionsenzym aus dem Bakterium Haemophilus aegyptius
hIL	Humanes Interleukin
HRP	Horseradish-Peroxidase= Streptavidinperoxidase
IG	Immunglobulin

Il-1 β	Interleukin 1 beta
Il-4	Interleukin-4
Il-6	Interleukin-6
Il-8	Interleukin-8
ITS Primer	Internal transcribed spacer region primer
kDa	Kilodalton
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
MHC	Major Histocompatibility Complex
mM	Millimol
NID Puffer	Nonionic Detergent Puffer
NK Zellen	Nichtkiller-Zellen
NTP	Nukleotidtriphosphate
OD	Optische Dichte
PBS- Puffer	Phosphate-Borate-Saline-Puffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG E2	Prostaglandin E2
RG	Reinheitsgrad
rpm	Rounds per minute
RVVC	Rezidivierende Vulvovaginalcandidose
SD	Standardabweichung
SSW	Schwangerschaftswoche
Taq	Thermus aquaticus

TBE	Tris Boric EDTA
TE	Tris HCL EDTA
TGF- beta 1	Transforming growth factor beta 1
TH-1, TH-2	T- Helferzelle 1, T- Helferzelle 2
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
U/m	Umdrehungen pro Minute
VVC	Vulvovaginalcandidose

1. Einleitung

1.1. Vulvovaginalcandidose

Infektionen mit Hefepilzen der Gattung *Candida* sind in allen Fachgebieten der Medizin häufig. Im Fachgebiet der Gynäkologie und Geburtshilfe ist die chronisch rezidivierende Vulvovaginalcandidose (VVC) für die betroffenen Patientinnen meist mit hohem Leidensdruck verbunden und hat daher in Diagnostik und Therapie einen hohen Stellenwert.

Candida ist ein Spross- bzw. Hefepilz, dem rund 155 verschiedene Arten angehören (91). Nur wenige der zahlreichen Arten sind humanpathogen, darunter *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, und *Candida parapsilosis* (26). Die weniger pathogenen Hefen wie *Candida tropicalis*, *krusei*, *parapsilosis* führen nur bei zellulärer Immunsuppression vereinzelt zu Infektionen (48).

Die Sprosse ist die einfachste Form von *Candida*. Der gesamte von einer Sprosse abstammende Zellverband (Thallus) besteht aus verzweigten Pilzfäden (Hyphen), die durch Wachstum ohne Teilung zustande kommen. Ein Myzel besteht aus mehreren verzweigten Hyphen. Als Pseudomyzel bezeichnet man die Myzelbildung aus Längenwachstum der ursprünglichen Sprosszelle (52, 76) (Abbildung 1). Die Unterscheidung zwischen Pseudomyzelien und echten Myzelien ist deshalb wichtig, weil die Bildung von echten Myzelien auf einen invasiven Verlauf der Erkrankung hinweist. Die Fähigkeit zur Invasion in Schleimhautepithelien erlangt *Candida albicans* bei der Umwandlung von der Sprosszellform zur Hyphenform. Die Fähigkeit von *Candida* als Sprosspilz oder Hyphe wachsen zu können, bezeichnet man als Dimorphismus (52, 76, 115).

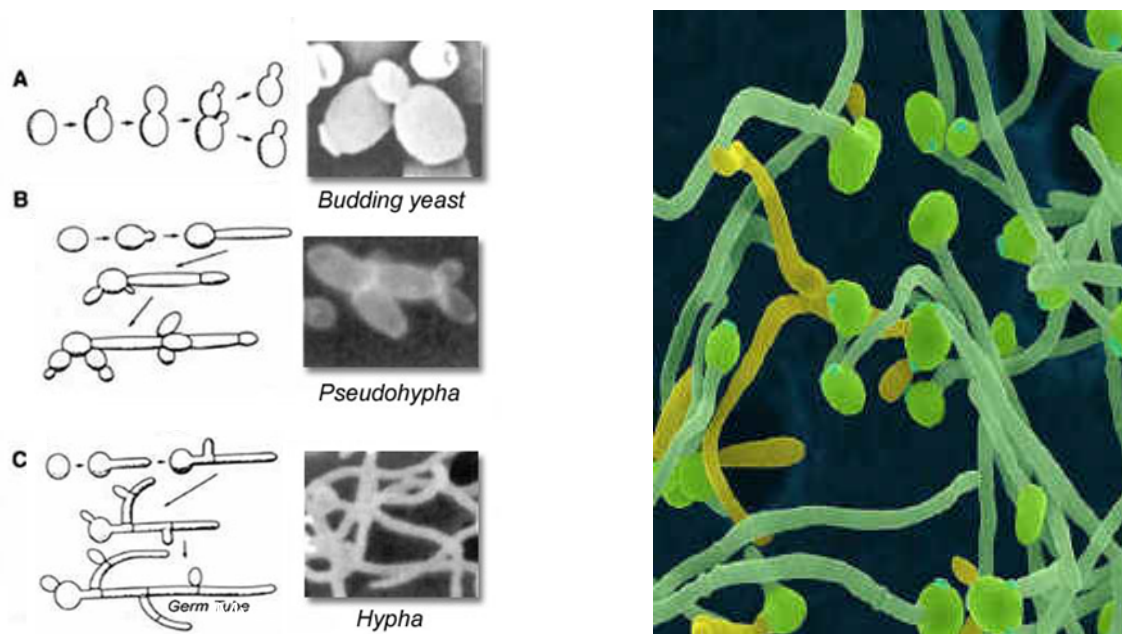


Abb. 1: Verschiedene Wachstumsformen von Candida (78)

Unterschiede der Candida spezies zeigen sich unter anderem in der mikroskopisch (echtes Myzel, Dimorphismus), morphologischen (Ligand-, Rezeptorinteraktion, phänotypisches switching, kontakt sensing) und biochemischen (sekretorische Aspartat Proteinasen) Differenzierung (9, 44, 75). Diese Adhäsions- und Virulenzfaktoren sind maßgeblich an der Entwicklung der symptomatischen und asymptomatischen Form beteiligt. Candida mit hoher Virulenz sind häufiger an der Chronifizierung einer Candidose beteiligt, wobei die Fähigkeit zur Adhäsion von Candida albicans von Patient zu Patient different ist (99).

Candida spezies sind fakultativ pathogene Pilze, welche die Haut und Schleimhäute besiedeln und bei Störungen der lokalen und systemischen Immunabwehr Infektionen der Haut und Schleimhäute verursachen können (71). Das Risiko, eine symptomatische Infektion der Scheide zu entwickeln, ist durch einen Selektionsvorteil der Pilze bei Einnahme von Antibiotika erhöht. Ferner ist es bei Immunschwäche, Endokrinopathien, Medikamenten wie Zytostatika oder Immunsuppressiva erhöht, und schließlich auch bei Krankheiten wie z.B. bei Diabetes mellitus, oder einer Störung der lokalen vaginalen Schleimhautflora

bedingt durch Östrogenmangel oder eine Verminderung der Döderlein Stäbchen. (6, 18, 22, 56, 57, 80, 88, 114, 117, 118).

Etwa 80% aller menschlichen Candidosen werden durch *Candida albicans* verursacht (110), ca. 5% durch *Candida glabrata* und etwa 3% durch *Candida krusei* sowie den selteneren Spezies *Candida parapsilosis* und *Candida tropicalis* (6, 13, 30, 35, 56, 59, 100). In der Schwangerschaft liegt der Anteil der Vulvovaginalcandidosen sogar bei etwa 90% (36). Der hohe Anteil an durch *Candida albicans* verursachter Vulvovaginalcandidose erklärt sich durch deren Fähigkeit zur Adhäsion, welche bei *Candida albicans* verglichen mit anderen *Candida* spezies am stärksten ausgeprägt ist (3, 50). Die Bezeichnung *Candida albicans* entstand durch die weißlichen Kolonien, die auf Nährböden wachsen.

Bei etwa 70% der gesunden Bevölkerung lässt sich eine Kolonisation der Schleimhäute mit dem Hefepilz der Gattung *Candida* nachweisen. Die vaginale Kolonisation weist bei gesunden, prämenopausalen, nicht schwangeren Frauen eine Häufigkeit von etwa 20-30% auf (7, 60). Die Prävalenz, während der Schwangerschaft eine Vulvovaginalcandidose zu bekommen, liegt bei 38%, wovon 27% symptomatisch und 11% asymptomatisch sind (79). 75% aller Frauen im gebärfähigen Alter leiden mindestens einmal in ihrem Leben unter einer Candidainfektion. Bei ca. 40-45% der Betroffenen kommt es zu einer wiederholten Infektion (6, 8, 58, 67, 88). 5% der Vulvovaginalcandidosen werden chronisch-rezidivierend (definitionsgemäß 4 Rezidive/Jahr) (58).

Häufig wird *Candida* durch Autoinokulation aus dem Darm in den Genitalbereich übertragen (65), und vor allem durch Geschlechtsverkehr, wobei nicht jede Kontaktperson symptomatisch erkrankt, sondern asymptomatischer Träger bleiben kann.

Der Sexualpartner sollte ebenfalls untersucht und mitbehandelt werden, um eine erneute gegenseitige Ansteckung zu vermeiden (48).

In der Schwangerschaft begünstigt zum Einen ein verändertes Scheidenmilieu eine Vulvovaginalcandidose, zum Anderen der in der Schwangerschaft erhöhte Östrogenspiegel, da *Candida albicans* Östrogenrezeptoren besitzt (6, 20, 65).

Im Falle einer symptomatischen Infektion kommt es dann zu einem Auftreten von subjektiven Beschwerden sowie zu einer sichtbar veränderten Haut oder Schleimhaut. Die wesentlichen Symptome sind Jucken, Brennen, eine Rötung der Scheide, Dyspareunie, sowie der typische weißliche, geruchsarme, bröckelige Fluor. Im Gegensatz zu einer Infektion mit *Candida albicans* kann *Candida glabrata* relativ symptomarm verlaufen (25, 59, 62, 98, 117, 118).

Die häufigsten Ursachen für den Symptomkomplex Vaginose/Vaginitis sind neben den *Candida* spezies auch verschiedene anaerobe Bakterien. Dies zu unterscheiden ist häufig schwierig, da sich die subjektiven Symptome bei den verschiedenen Formen der Vaginose/Vaginitis sehr ähneln (94).

Die alleinige Durchführung von Anamnese und makroskopischer Evaluierung mittels Spekulumuntersuchung kann die Ätiologie der vaginalen Infektion nicht bestimmen. Diese Art der Untersuchung führt häufig zu Fehldiagnosen und daraus resultierend zu falschen Therapien. Vor allem bei akuten Beschwerden ist die eindeutige Diagnose unabdingbar.

Nach der bakteriellen Vaginose ist die vulvovaginale Candidose die zweithäufigste Vaginalinfektion mit einer Inzidenzrate von 10% bei Nichtschwangeren und von 30% bei Schwangeren (59, 60). Man sollte mittels Kultur oder Polymerasekettenreaktion (PCR) differentialdiagnostisch vorgehen, da eine Therapie auch in der Schwangerschaft bei symptomlosen vaginalen Candidosen zu überlegen ist. Eine erste Orientierung kann die mikroskopische Betrachtung des Fluor-Nativpräparates geben, obwohl mehr als die Hälfte der mikroskopisch positiven Befunde in der Kultur oder PCR nicht bestätigt werden können (2, 55, 111). Patientinnen mit einer chronisch rezidivierende Vulvovaginalcandidose (CRVVC) haben meist einen langen Leidensweg hinter sich, da Rezidive einer CRVVC meist als akute VVC verkannt und behandelt werden, jedoch ist die Unterscheidung zwischen akutem und chronischem Verlauf bei einer VVC für den Erfolg der Behandlung entscheidend (110).

1.2. Therapie

Die akute Vaginalcandidose ist mit den beschriebenen Methoden diagnostizierbar, mit einer 14 tägigen topischen Therapie mit Antimykotika der Imidazol - Klasse wie z. B. Clotrimazol (Canesten[®] oder Kadefungin[®]), Nystatin oder Amphotericin B therapierbar und klingt in 80-90% der Fälle (35, 60) rasch ab. Die Vaginaltabletten oder Ovula sind an 1, 3 oder 6 aufeinanderfolgenden Tagen (in Abhängigkeit vom Pharmakon) tief in die Scheide einzuführen. (34). Zugunsten einer besseren Compliance werden auch bei akuter Candidose orale Antimykotika bevorzugt. In 10-20% der Fälle lässt sich der Pilz durch eine topische Anwendung nicht eradizieren, so dass eine systemische antimykotische Therapie angezeigt ist, z. B. mit Fluconazol 150 mg als Einmaldosis (15, 60, 96). Vorteile der systemischen Medikation sind die optimale Penetration ins Gewebe und der nützliche Medikamentenspiegel über mehr als 3 Tage. Frauen bevorzugen häufig eine orale Applikationsform. Diese systemische Therapie ist in der Schwangerschaft und Stillzeit kontraindiziert, so dass in der Schwangerschaft und Stillzeit eine topische Therapie z. B. mit Clotrimazol über 3 Tage zur Anwendung kommt (1, 65, 66, 83). In 78% der Fälle ist eine einmalige vaginale Applikation von 500 mg Clotrimazol ausreichend (23, 24, 120). Diese Therapie ist im ersten Trimenon nur unter strengster Indikationsstellung angezeigt (1).

Bei der chronisch-rezidivierenden Vulvovaginalcandidose wird für einen Zeitraum von 6 bis 12 Monaten oral 200mg Fluconazol (z.B. Diflucan[®]) zweimal wöchentlich verordnet. Eine Mitbehandlung des Sexualpartners ist für 4 Wochen nach äquivalentem Schema notwendig, um einen langfristigen Therapieerfolg zu gewährleisten. In der Schwangerschaft werden akute Phasen der CRVVC mit lokalen Applikationen von Clotrimazol (z.B. Kadefungin[®]) als Kombipackung (Creme und Vaginaltabletten) über 3 Tage hinweg therapiert (27, 65, 84, 100, 106, 110). Eine Therapie im ersten Trimenon ist auch hier nur unter strengster Indikationsstellung einzuleiten (1). Ein neues Behandlungsregime während des dritten Trimenons ist die einmalige lokale Applikation von 2%iger Gynazole[®] Creme (Wirkstoff: Butoconazol) mit einer Erfolgsquote von 90% (72). In der Hälfte der Fälle kommt es trotz Therapie erneut zu Rezidiven. Ursache dafür könnte eine Resistenzentwicklung einzelner Candida albicans Stämme sein. Eine

Resistenztestung in einem qualifizierten mykologischen Labor wäre anzudenken (53). Therapieversuche auf immunologischer Ebene, vor allem hinsichtlich der chronisch rezidivierenden Vulvovaginalcandidose wurden in einigen Studien beschrieben (29, 63). Jedoch sind die Daten diesbezüglich nicht gesichert. Unterstützend können Laktobazillusvakzine (Gynatren[®]) zur Anwendung kommen (110). Die routinemäßige Mitbehandlung des asymptomatischen Sexualpartners bei der RVVC wird von einigen Autoren kontrovers diskutiert (25, 92). Ob Alternativmedizin (Pilzdiät, Homöopathie, Akupunktur u.a.) eine wirksame Ergänzung darstellt, ist nicht ausreichend belegt. Eine zuckerfreie Diät beeinflusst vermutlich die Candidabesiedelung im Dickdarm nicht, da Mono- und Disaccharide bereits im Dünndarm resorbiert werden (10). Auch kommt die Datenlage darüber nicht überein, ob der Orointestinaltrakt als Rezidivquelle anzusehen ist und eine dortige Candidabesiedelung medikamentös behandelt werden sollte. Bei einer CRVVC vermag eine Stimulation der lokalen Abwehr durch eine Immuntherapie Rezidive zu verhindern. Diese Erkenntnis basiert auf einer Pilotstudie mit 90 Patienten an der Vivantes- Frauenklinik in Berlin, wobei die Betroffenen entweder mit einer Heliotherapie (über 6 Wochen hinweg dreimal pro Woche Lichttherapie mit UV- B haltigem Spektrum), einer antimykotischen Therapie (10 Tage Ciclopiroxolamin als Vaginalzäpfchen oder – creme) oder mit der Lactobacillus - Vakzine Gynatren (3x1 Injektion i. m. alle 2 Wochen) behandelt wurden (109).

Candida glabrata stellt eine besondere therapeutische Herausforderung dar, weil er sich oft gegenüber den meisten Pilzmedikamenten resistent zeigt (112). Eine lokale Therapie mit Borsäure Suppositorien oder die lokale Applikation von Flucytosin über 14 Tage hat eine Erfolgsquote von ca. 70 bis 90% (84, 97), sie ist im 1. Trimenon der Schwangerschaft jedoch kontraindiziert, strenge Indikationsstellung im 2. und 3. Trimenon (1).

Blaschke-Hellmessen et al. und Hoppe et al. haben beschrieben, dass es bei der vaginalen Geburt mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 80% zur Übertragung des Hefepilzes auf die Haut des Neugeborenen kommt. Infizierte Neugeborene entwickeln in ca. 90 % der Fälle im 1. Lebensjahr eine Mykose mit einem Häufigkeitsgipfel von 10 - 15 % in der 2. - 4. Lebenswoche, wobei Mund- und Anogenitalcandidose etwa gleich häufig auftreten (11, 42, 43). Aus diesem Grund sprechen Leitlinien die dringende Empfehlung zur Therapie einer VVC in der

Schwangerschaft aus (64). Mendling et al. gaben die Empfehlungen, in der Schwangerschaft ab der 34. SSW eine Pilzkultur anzulegen und bei positivem Ergebnis eine intravaginale Therapie wie oben beschrieben unabhängig von den klinischen Beschwerden einzuleiten (65).

1.3. Immunantwort

Die exakten Abläufe der Immunantwort auf eine vaginale Infektion mit *Candida* spp. sind bis dato nicht ausreichend erforscht. Bekannt ist, dass in der Abwehr dieser Erreger die zelluläre und humorale Immunantwort eine bedeutende Funktion haben. Der humoralen Immunantwort, darunter den Antikörpern Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin M (IgM) und Immunglobulin A (IgA) wird eine untergeordnete Rolle in der Abwehr zugesprochen, da diese nur kurzzeitig wirken und für einen natürlichen Schutz im Vaginalsekret in nicht ausreichender Menge sezerniert werden (14, 67). Eine entscheidende Rolle hingegen spielt die zelluläre Immunantwort (4), die durch T-Lymphozyten erfolgt, welche sich in T-Helferzellen, T-Suppressorzellen und zytotoxische T-Zellen untergliedern lassen. Diese unterscheiden sich durch Ausprägung verschiedener Oberflächenantigene, sog. Clusters of Differentiation (CD). T-Helferzellen sind durch CD-4 charakterisiert, CD-8 findet sich auf T-Lymphozyten vom zytotoxischen Typ. CD-4 T-Helferzellen erkennen mit ihren Rezeptoren Antigenfragmente, die an einen MHC-Klasse II Rezeptor gebunden sind und interagieren mit den Zellen, die diese Rezeptoren besitzen, u. a. dendritische Zellen, aktivierte Makrophagen und B-Lymphozyten. CD8 T-Lymphozyten interagieren mit Zellen, die einen MHC-Klasse I Rezeptor aufweisen, d. h. mit allen kernhaltigen Zellen (56). Erkennt ein Helfer-T-Lymphozyt sein Antigen auf einem Makrophagen, so schüttet er Zytokine aus. Anhand des spezifisch ausgeschütteten Zytokin-Musters können die T-Zellen in die Untergruppen TH1 und TH2 differenziert werden (4, 46, 51). Zytokine sind Peptidwirkstoffe, welche besonders von aktivierten Immunzellen (Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten, Eosinophile, Basophile), aber auch von anderen Zellen (Endothel- und Epithelzellen, Fibroblasten) produziert werden. Sie wirken über spezifische Zytokinrezeptoren, ähnlich den Hormonen und Neurotransmittern, als Signalstoffe zwischen Zellen und vermitteln in der Zielzelle

u.a. pro- oder anti-entzündliche Effekte, somit sind sie essentiell für infektionsbedingte Immunreaktionen (51). Interleukine zählen zu den Zytokinen. Nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung werden Interleukine in mehrere Untergruppen unterteilt, die durch Zahlen gekennzeichnet werden (IL-1 bis IL-32).

Folgende Interleukine werden in vorliegender Arbeit behandelt:

IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin der Akute-Phase Reaktion. Es wird von Monozyten, Makrophagen, T-, B- und NK Zellen, Granulozyten, Epithelzellen und Fibroblasten ausgeschüttet. Es induziert die Transduktion von Cyclooxygenase-2 und führt darüber zu einer vermehrten Bildung von Prostaglandin-E2. Es induziert ferner die Bildung von CD14, ein Oberflächenprotein auf Monozyten und Makrophagen, das bei Kontakt mit Lipopolysacchariden seine Zelle zur Ausschüttung von TNF- α und IL-1 β aktiviert und so eine entsprechende Entzündungsreaktion vermittelt. Zudem ist IL-1 β ein Stimulator der Neurone, die im Hypothalamus Corticotropin Releasing Hormone ausschütten und führt darüber zu einer Stimulation von ACTH und der Kortisonausschüttung in den Nebennieren bei Entzündungsreaktionen. Ferner besitzt IL-1 β die Fähigkeit, die Expression des IL-8 zu steigern (46).

IL-4 agiert als antiinflammatorisches Zytokin, indem es überschießende Entzündungsreaktionen verhindert und somit für die Homöostase des Immunsystems von zentraler Bedeutung ist. Es wird von T Zellen sezerniert. Es hat die Aufgabe, B-Zellen zu aktivieren, die Expression von IgG1 und IgE zu verstärken, die Expression von CD23 auf Zellen und Monozyten zu regulieren, eine TH2 Antwort zu induzieren und als Wachstumsfaktor für Mastzellen zu fungieren (45, 46).

IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin und als Botenstoff des Immunsystems Hauptmediator der Akute- Phase- Reaktion bei Traumen und Entzündungen. Es wird sowohl von Zellen des Immunsystems, d. h. von B- und T- Zellen, aber auch von Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Tumorzellen etc. gebildet. Es hat Effekte auf Zellwachstum, Differenzierung und Aktivierung (46, 86).

Interleukin-8 (IL-8) ist ein Chemokin der CXC Familie und wird unter anderem durch Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten produziert. Ein wichtiger Angriffspunkt des Chemokins sind neutrophile Granulozyten. Die

wesentlichen biologischen Wirkungen von IL-8 auf Granulozyten beinhalten die Förderung der Chemotaxis, die Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen und die Aktivierung mit Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Granula (46).

LIF/HILDA (Leukemia Inhibitory Factor/Human Interleukin for DA cells) ist ein von aktivierten Lymphozyten und Makrophagen produziertes Glykoprotein mit einem Gewicht von 32-45 kDa. Die basale LIF-Expression ist gering (12, 39). Durch proinflammatorische Agenzien wie Lipopolysaccharide, Interleukin-1, Interleukin-17 und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) wird die LIF-Expression induziert und durch antiinflammatorische Agenzien wie Glukokortikoide, Interleukin-4 und Interleukin-13 inhibiert (5). Der Leukämie-Inhibierende-Faktor (LIF) wurde anfangs dadurch charakterisiert, dass er die Fähigkeit zur Proliferationshemmung von Leukämie-Zellen in vitro besitzt sowie die Fähigkeit, Zellen zu einem Makrophagen-ähnlichen Zelltyp zu differenzieren (37). LIF stimuliert die hypophysär adrenale Achse über die Regulation des Wachstums vieler Zellen, hat Einfluss auf die Energiehomöostase und wirkt auf die reproduktiven Funktionen wie z.B. die Implantation des Blastozysts (5). Darüberhinaus beeinflusst LIF die neuronale Zelldifferenzierung. Diese Funktion hat auch IL-6. Es hemmt die Differenzierung von embryonalen Stammzellen, die Lipase Aktivität der Adipozyten, das Zellwachstum von Endothelzellen und die Bildung von Akute Phase Protein durch Hepatozyten. Ferner spielt es eine Rolle im Stoffwechsel der Knochen und der Muskelzellen (119).

2. Fragestellung

Es wurde untersucht, ob die Kolonisation der Vagina mit *Candida* spp. eine Immunantwort in Form einer Änderung des Interleukin-Spiegel auslöst. Um diesen Zusammenhang zu verifizieren, wurden in unserer Studie mittels Elisa und photometrischer Messung die Konzentrationen der Interleukine IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 sowie des Leukämie- inhibierenden Faktors LIF bestimmt.

Weiter wurde mit der Zielvorgabe, durch eine frühe und sichere diagnostische Methode eine Infektion der Scheide mit *Candida* spp. rechtzeitig erkennen und behandeln zu können und damit auch eine Chronifizierung, die insbesondere in der Schwangerschaft Risiken für Mutter und Kind birgt, abwenden zu können, in vorliegender Arbeit untersucht, welche diagnostische Methode (Reinheitsgrad, kulturelle Anzucht, PCR) den besten Vorhersagewert für eine in der Schwangerschaft zu behandelnde Vulvovaginalcandidose liefert.

Es wurden Nebenfaktoren wie Allergie, Risiken, Aborte in der Vorgeschichte, Anzahl der Schwangerschaften oder Nikotinabusus hinsichtlich Ihres Risikopotentials, in der Schwangerschaft eine Vulvovaginalcandidose zu begünstigen, bewertet.

3. Material und Methode

3.1. Material

3.1.1. Patientengut

Diese Studie wurde in der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München Großhadern durchgeführt. Es wurden schwangere Patientinnen rekrutiert, die zur Schwangerenvorsorge in die Sprechstunde kamen. Insgesamt wurden 249 Patientinnen in die Studie eingeschlossen. Alle Patientinnen wurden ausführlich über die Studie und deren Zweck aufgeklärt und haben Ihr Einverständnis zur Durchführung der Untersuchung und zur Verwendung Ihrer Probe, Ihrer personenbezogenen Daten und Ihrer Gesundheitsdaten gegeben. Von jeder Patientin wurde eine Candida-PCR angefertigt. 61 Candida-PCR-Positive wurden in die Gruppe „krank“ eingeschlossen, 188 Patientinnen waren Candida-PCR-negativ und wurden der Kontrollgruppe „gesund“ zugeordnet.

Es wurden folgende Ausschlusskriterien definiert, um Störfaktoren zu vermeiden, welche das Ergebnis verfälschen könnten:

- Klinische oder anamnestische Hinweise auf Infektionen in den vorausgegangenen 14 Tagen
- Schwangere, die aktuell oder in den letzten vier Wochen eine antibakterielle oder antimykotische Therapie erhalten hatten
- Immundefekte in der Anamnese
- Maligne Erkrankungen in der Anamnese
- Behandlung mit Medikamenten, die das Immunsystem beeinflussen wie Kortikosteroide, Zytostatika oder Interferone.

Anamnestisch wurden Alter und Schwangerschaftswoche, bisheriger Schwangerschaftsverlauf und aktuelle Beschwerden erfragt. Darüber hinaus wurde dokumentiert, ob Gegebenheiten zutrafen, die den Ausschlusskriterien entsprachen, ob es frühere Schwangerschaften (Aborte) gab und ob Allergien, Krankheiten und Nikotinabusus bestanden.

3.1.2. Proben

Von jeder Patientin wurden 3 vaginalabstriche benötigt. Die Abnahme erfolgte wie unter 3.2.1. beschrieben.

3.1.3. Bestimmung des Reinheitsgrades

Material / Geräte	Hersteller
Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel Danz GmbH, Wetter, Deutschland
Objektträger und Deckglas 23,8x50 mm	Menzel-Gläser, Deutschland
0,9%ige Natriumchloridlösung zu 50 ml	Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland
Mikroskop	Leitz, Wetzlar, Deutschland

3.1.4. Kultur

Material/Geräte	Hersteller
Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel Danz GmbH, Wetter, Deutschland
Sabouraud Flüssig Agar	Biomérieux®, Frankreich
Sabouraud-Agarplatten	Biomérieux®, Frankreich
Brutschrank, Typ 2770	Köttermann, Deutschland
Impföse und Bunsenbrenner	n.n.
Chromagarplatten	Becton Dickinson, Sparks / USA BBL Chromagar™ Candida

3.1.5. PCR

3.1.5.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Gelelektrophoreseapparatur, Typ HE 33	Hoefer, San Francisco, CA /USA
Spannungsquelle, Typ EPS 500/400	Pharmacia LKB, San Francisco, CA / USA
Pipetten, Filter-Tips PE/PP	Nerbe plus GmbH, Winsen / Luhe, Deutschland
Thermocycler, Typ 9600	Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut USA
Tischzentrifuge, Typ Z 230 MR	Hermle, Deutschland
Polaroidkamera, Typ GelCam	UniEquip, München-Martinsried, Deutschland
UV-Leuchtkasten, Typ N 90	UniEquip, München-Martinsried, Deutschland
Vortexgerät, G-560 E	Scientific Industries, Inc. Bohemia. N.Y. USA
Wasserbad, Typ B3	Haake B3/C10
Mikrowellengerät, Typ MC 653	Udo Classen GmbH, Kempen, Deutschland
Plattenvortexgerät, Vibromix Typ 301 EVT	A-B Laborsysteme Osvath, Greiling Deutschland
Gefriertruhe -70° C	Revco, Thermo Scientific, Deutschland
Photometer	Anthos labtec instruments GmbH, Wals-Siezenheim, Österreich

3.1.5.2. Reagenzien

Reagenzien

Hersteller

Lytikaselösung

0,5 M EDTA

Sigma, St. Louis, Missouri/USA

PBS 1,6 ml

Life Technologies, Paisley/Scotland

2% Mercaptoethanol

Sigma, St. Louis, Missouri/USA

Lytikase 1 mg

Sigma, St. Louis, Missouri/USA

Nonionic Detergent Puffer (NID Puffer)

KCl 50 mM

Sigma, St. Louis, Missouri/USA

Tris-HCl 10 mM

Sigma, St. Louis, Missouri/USA

MgCl₂ 2,5 mM

Sigma, St. Louis, Missouri/USA

Polyoxyethylenlaurylether 0,4g

Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe,
Deutschland

Aqua a.i.

Boehringer, Mannheim

Deutschland

CT/NG Lysis

Roche Diagnostics, Branchburg,
New Jersey/USA

Mineralöl

Applied Biosystems

Proteinase K 5,0 mg/ml

Sigma, St. Louis, Missouri/USA

Reagenzien

Hersteller

DNA-Polymerisationsmix

MgCl₂ 25mM

Perkin Elmer, Branchburg,
New Jersey / USA

Desoxynukleosidtriphosphate 10mM
(dNTP),

Perkin Elmer, Branchburg,
New Jersey, USA

Zusammensetzung des dNTP-Mixes:
(dATP, aTTP, dGTP und dCTP)

10X PCR-Puffer (pH 8,3)

Perkin Elmer, Branchburg,
New Jersey, USA

KCl 500mM

Tris-HCl 100mM

MgCl 15mM

Taq-Polymerase: 5 U/μl

Perkin Elmer, Branchburg,
New Jersey / USA

PCR Primer

Life Technologies, Paisley,
Scotland

ITS3 5` und ITS4 3`

mit den folgenden Sequenzen:

ITS3 5`Primer: Sequenzen (5`-3`) GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC

ITS4 3`Primer: Sequenzen (5`-3`) TCC TCC GTC TAT TGA TAT GC

Die als Trockensubstanz gelieferten Primer mussten zunächst durch Zugabe von sterilem Aqua gebrauchsfertig gemacht werden, wobei im Verhältnis 1:10 verdünnt wurde.

3.1.5.3. Reagenzien für die Gelelektrophorese

Reagenzien	Hersteller
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<u>10XTBE (Tris Boric EDTA) 25ml</u>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Borat (pH 8,3) 1 M EDTA 20mM Deionisiertes Wasser	
<u>1XTE</u>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl 5ml EDTA 1ml Aqua a.i. 494 ml	
DNA-Auftragspuffer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Färbelösung Ethidiumbromid 1%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Längenstandard Hae III Digest	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus, Deutschland

3.1.6. ELISA

3.1.6.1. Geräte

Geräte	Hersteller
Spektralphotometer	Anthos Labtec Instruments GmbH, Wals-Siezenheim, Österreich
Vortexgerät, Typ VF 2	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Deutschland
Präzisionspipette Typ Gilson® für 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml und 10 ml. Einmal Pipettenspitzen Typ Gilson®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Eppendorf Gefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Destilliertes Wasser	
Spritzflasche	
Aluminiumfolie	
Horizontal microtiter plate shaker	Lab-line Instruments, IL, USA

3.1.6.2. Reagenzien

Die für die Durchführung des Interleukin ELISAs benötigten Reagenzien wurden komplett und auf die nachzuweisenden Interleukine abgestimmt, von der Firma BioSource Europe S.A., Nivelles, Belgien zugeschickt. Das Kit enthält:

- Mikrotiterplatten, die mit Antikörpern der hIL-1 β , hIL-4, hIL-6 und hIL-8 beschichtet waren.
- Standard in Pulverform
- Standard Puffer für hIL-1 β , hIL-4, hIL-6 und IL-8 zur Herstellung des gebrauchsfertigen Standards
- Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- Lösung zur Verdünnung der Streptavidin-Peroxidase (HRP)

- Biotin Konjugat als Farbindikator
- Gepufferte Waschlösung (25 x Konzentrat)
- Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung
- Stopplösung
- Abdeckfolie

Der LIF Kit der Firma BioSource Europe S.A., Nivelles, Belgien enthielt folgende Reagenzien:

- Mikrotiterplatte mit 96 anti- LIF/HILDA beschichteten Kavitäten
- Standard 0 in humanem Plasma versetzt mit Konservierungsstoffen
- Standard 1 – 5 in humanem Plasma versetzt mit Konservierungsstoffen
- Solution B – Puffer
- Anti-LIF/HILDA-HRP Konjugat
- Kontrolle 1 und 2
- Waschlösung
- Chromogenlösung (TMB)
- Substrat Puffer in Acetat/Citrat Puffer
- Stopplösung

3.1.7. Sonstiges Material

- Destilliertes Wasser
- Spezialtransportmedium (Medical Wire & Equipment co.Ltd., Corsham, Vaginalabstrich Wilts./England)
- Erlenmeyer Kolben
- Gefriertruhe -70°C
- Zellstoff
- Kühlschrank
- PC
- SYSTAT Programm
- SPSS Programm
- Drucker

3.2. Methode

3.2.1. Vaginalabstriche

Zunächst wurden von jeder Patientin 3 Vaginalabstriche entnommen:

- Für die kulturelle Anreicherung von Hefepilzzellen wurde eines der drei Watteträger in ein Röhrchen mit Sabouraud- Flüssigagar gegeben.
- Der zweite Abstrich für die mikrobiologische Untersuchung auf pathogene Keime wurde in ein Spezialmedium gegeben und im infektiologischen Labor der Klinik aufgearbeitet. Dies diente zum Ausschluss einer bakteriellen Infektion.
- Der dritte Abstrich diente der Bestimmung des Reinheitsgrades im Nativpräparat unter dem Mikroskop. Dazu wurde mit Hilfe eines Watteträgers Vaginalsekret vom hinteren Scheidengewölbe entnommen und auf einen gereinigten fettfreien Objektträger gleichmäßig in dünner Schicht aufgetragen, ein Tropfen NaCl zugegeben und das Präparat mittels Deckglas abgedeckt. Mikroskopisch konnte man das Vorhandensein von für Candida typischen Erscheinungsformen wie Pseudomyzel und Hyphen erkennen, ferner den Reinheitsgrad bestimmen und weitere pathologische Gegebenheiten beurteilen.

3.2.2. Vaginallavage

Für die ELISA und PCR wurde Probenmaterial mittels Vaginallavage gewonnen. Hierzu wurden 3 ml NaCl 0,9% in die Vagina mit Hilfe einer Spritze ohne Kanüle eingebracht, mit einem sterilen Wattetupfer durchmengt und mit der gleichen Spritze wieder aufgenommen. Das Material wurde entweder zügig aufbereitet oder zur späteren Bearbeitung bei -70° C tiefgefroren. Der Spritzeninhalt wurde auf zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt, um eine zweite Probe als Ersatz sicher zu stellen, in Folge 5 min. lang bei 10900 U/m zentrifugiert, um den Überstand vom Pellet (Zellbestandteil) zu trennen. Schließlich wurde eines der Gefäße mit Probenmaterial bei -70°C tiefgefroren, das Andere weiterverarbeitet oder tiefgefroren zur späteren Verwendung.

3.2.3. Reinheitsgrad

Der Reinheitsgrad wurde mikroskopisch nach der Nomenklatur von Weissenbacher et al. festgelegt (110) (Tabelle 1):

Stufe	Beschreibung
RHG I	„Reine“ Döderlein-Flora: zahlreiche Döderleinstäbchen, keine sonstigen Bakterien
RHG II	Mischflora: wenige Döderleinstäbchen, überwiegend Bakterien, vereinzelt Leukozyten
RHG III	„Reine“ Bakterien-Flora: keine Döderleinstäbchen, massenhaft grampositive und gramnegative Bakterien und zahlreiche Leukozyten

Tab.1: Reinheitsgrad

3.2.4. Kulturelle Anzuchtung

Für die kulturelle Anzuchtung wurde Sabouraud 2% Glukose-Agar der Firma Biomerieux® verwendet, versetzt mit Gentamycin (0,1 g/l) und Chloramphenicol (0,05 g/l) für ein selektives Pilzwachstum. Alle Hefearten der Gattung Candida wachsen auf diesem Medium als elfenbeinfarbene, meist glatte, unterschiedlich große Kolonien ohne Luftmyzel. Der in Sabouraud Flüssigmedium getränkte Watteträger, auf dem Abstrichmaterial haftete, musste zunächst für 24 Stunden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einer optimierten Feuchtigkeit bebrütet werden. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das bebrütete Material auf eine Biomerieux® Sabouraud- Agarplatte aufgebracht, mittels einer mit dem Bunsenbrenner ausgeglühten Öse ausgestrichen und für weitere 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Bei positivem Kulturergebnis wurden die Pilzkolonien zur weiteren Differenzierung auf eine Becton Dickinson BBL Chromagar Platte überimpft und für weitere 48 Stunden inkubiert.

3.2.5. Kulturelle Differenzierung

Auf Chromagar Platten können *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* und *C. tropicalis* aufgrund ihrer Pigmentbildung voneinander unterschieden werden. Die Hefen wachsen durch Reaktion von speziesspezifischen Enzymen mit dem Chromsubstrat in unterschiedlicher Farbausprägung. *C. albicans* präsentiert sich grün, *C. glabrata* hellviolett, *C. tropicalis* blau und *C. krusei* blassrosa (Abbildung 2).



Abb. 2. Differenzierung von Candida Spezies auf Chromagar

3.2.6. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction; PCR) ist eine biochemische Labormethode zum Nachweis von bestimmten DNA-Abschnitten mit bekannter Sequenz im Erbmaterial, wobei Kopien von den gewünschten DNA Segmenten generiert werden. (DNA = Desoxyribonukleinsäure, Speicher der Erbinformation von Lebewesen).

Sie wurde Mitte der 80-iger Jahre von Kary Mullis (Nobelpreis für Chemie, 1993) konzipiert und zur Anwendung gebracht. Diese Technik hat innerhalb kürzester Zeit die molekulare Genetik und deren Anwendung im medizinischen Bereich revolutioniert. Auf Grund der hohen Sensitivität des Nachweises erlaubt die PCR die Diagnose von Infektionen mit sehr wenig Material. Bedingt durch die enorme Komplexität des menschlichen Genoms (es besteht aus 25.000- 30.000 Genen) ist

die Analyse einzelner Gene mit herkömmlichen Methoden nur unter großem Aufwand möglich und routinemäßig kaum durchzuführen. Mittels PCR allerdings kann eine beliebig große Anzahl von Kopien eines bestimmten Abschnittes des Genoms hergestellt und der Analyse zugänglich gemacht werden.

3.2.6.1. DNA Extraktion (Candida processing)

Zur Separation der Candida DNA aus der Patientenprobe und zur Gewinnung des Überstandes zur Bestimmung der Zytokine wurde die Vaginallavage zunächst durch Vortexen gemischt, dann auf zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt, schließlich zwei Minuten bei 10900 U/m zentrifugiert, der Überstand sodann auf zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt. Das Zellsediment einer der beiden Patientenproben wurde durch Zugabe von 0,5 ml PBS gelöst, somit konserviert und als Reserve zur späteren Verwendung bei -70° C tiefgefroren. Das Zellsediment der anderen Probe wurde durch Zugabe von Aqua a.i. zweimal gewaschen, nachdem nach Vortexen und Zentrifugieren der Überstand abpipettiert worden war. 100 µl Lytikaselösung wurde dem Zellsediment zugegeben und die aufbereitete Probe wurde dann im Wasserbad bei 37° C für 1 Stunde inkubiert, um die Zellwände der Candidazellen aufzubrechen und somit DNA extrahieren zu können (Lytikase zerstört spezifisch die Zellwände der Candida spp.). Der nächste Schritt war ein erneuter Waschvorgang mit PBS, nach zuvor erfolgtem Abnehmen des Überstandes. Anschließend wurde nach Zentrifugieren und Abpipettieren des Überstandes dem Zellsediment 200 µl Tris-HCl Lysis-Puffer zugegeben und die Probe für 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen, damit übrige Zellen (alle Zellen außer Candidazellen) aufgebrochen wurden. Es folgte nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 1100 U/m und Abnahme des Überstandes ein weiterer Waschvorgang mit PBS. Die anschließende Zugabe von 10 µl Proteinkinase K und 240 µl Nonionic Detergent (NID) Puffer (vermengt durch 10-sekündiges Zentrifugieren bei 8000 U/m) und anschließende einstündige Inkubation der aufbereiteten Probe im Thermocycler bei 56° C bewirkte einen Abbau von Zellproteinen und eine Inaktivierung von zellulären Nukleasen. Die Probe musste vor Erhitzen im Thermocycler mit 1 Tropfen Mineralöl zum Schutz vor Verdampfen bedeckt werden. Der letzte Schritt der DNA-Extraktion war ein 10-minütiges

Erhitzen der Probe auf 96° C im Thermocycler, um die Proteinkinase K zu inaktivieren.

3.2.6.2. Herstellung des Master-Mix

Der sogenannte Master-Mix für die Candida-PCR war eine Mischung aus folgenden Reagenzien in genau definiertem Mischverhältnis:

• H ₂ O	6,75 µl
• MgCl ₂	3,00 µl
• 10xPuffer	5,00 µl
• NTP`s	8,00 µl
• ITS3 5`Primer	1,00 µl
• ITS4 5`Primer	1,00 µl
• Taq-Polymerase	<u>0,25 µl</u>
Gesamtvolumen	25,00 µl

Dieser Ansatz wurde für ein Reagenzgefäß bzw. eine Probe berechnet. Folglich musste noch mit der gewünschten Probenanzahl multipliziert werden.

3.2.6.3. Herstellung der positiven Kontrolle

Zur Herstellung einer positiven Kontrolle wurde Material von kulturell angezüchteten *Candida albicans*-, *C. glabrata*- oder *C. krusei* Kolonien der Agarplatte entnommen und in ein mit 0,5 ml PBS befülltes Eppendorfgefäß gegeben. Dieses Probenmaterial wurde, wie unter 3.2.6.2. beschrieben für die PCR vorbereitet.

3.2.6.4. Durchführung der PCR

In jedes vorbereitete Eppendorfgefäß wurden 25 µl Master Mix, 5 µl der aufbereiteten Patientenprobe respektive Candida-DNA-Lösung als positive Kontrolle, sowie 20 µl Aqua a. i. pipettiert. In das Gefäß der Negativkontrolle wurden 25 µl Aqua a. i. pipettiert. Dies ergab ein Gesamtvolumen von 50µl.

Die drei Positiv Kontrollen für *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* und eine Negativ Kontrolle (Aqua a. i.) durften bei keinem PCR-Durchlauf fehlen.

Ziel war es, durch wiederholte Verdopplung der gewünschten DNA in mehreren Zyklen selektionierte DNA künstlich zu vervielfältigen.

Die DNA liegt normalerweise doppelsträngig vor und wurde zu Beginn des Prozesses durch Erhitzen in Einzelstränge getrennt. Am Anfang und am Ende des spezifischen Abschnittes wurden Starthilfen, sog. Primer gesetzt, die das gegengleiche Muster der DNA besitzen und sich aufgrund dessen an die vorbestimmten Stellen binden können. Zu dem dazwischenliegenden DNA-Abschnitt wurde mit Hilfe des Enzyms Polymerase der jeweils komplementäre DNA-Strang synthetisiert. Der derart gebildete Doppelstrang wurde durch Erhitzen wieder getrennt. Damit wurden die Bindungsstellen für die Primer erneut frei und der Vorgang konnte nach Abkühlung erneut starten. Durch Wiederholen dieses Vorgangs konnte eine exponentielle Vervielfältigung (Amplifizierung) dieses DNA-Abschnittes erreicht werden. Die entstandenen DNA-Abschnitte (Amplifikate) konnten schließlich nach Auftrennung durch Gelelektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht (mittels Farbstoff Ethidiumbromid) und ausgewertet werden.

Die PCR erfolgte in einem so genannten Thermocycle. Diese Maschine erhitzt und kühlt die in ihr befindlichen Reaktionsgefäße präzise auf die für den jeweiligen Schritt benötigte Temperatur. Um Verdunstung zu vermeiden, wurde ein Tropfen Mineralöl auf das Reaktionsgemisch gegeben.

Der PCR-Prozess bestand aus einer Anzahl von 40 Zyklen, jeder Zyklus aus drei Schritten:

1. Denaturierung (o.a. Melting, Schmelzen): Zunächst wurde die doppelsträngige DNA auf 94° C erhitzt, um die Stränge zu trennen. Die Wasserstoffbrückenbindungen, welche die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, wurden dabei aufgebrochen. Im ersten Zyklus wurde die DNA für 3 Minuten erhitzt, um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt hatten und nur noch Einzelstränge vorlagen.
2. Primerhybridisierung (primer annealing): Nach der Trennung der Stränge wurde die Temperatur gesenkt, so dass sich die Primer an die einzelnen DNA-Stränge anlagern konnten. Die Temperatur während dieser Phase hängt von den Primern ab und liegt normalerweise 2-3°C unter ihrem Schmelzpunkt, in unserem Fall bei 49° C.
3. Elongation (Polymerisation, Verlängerung): Schließlich erfolgte die Verlängerung des komplementären Gegenstranges, ausgehend von der Startsequenz, bei 72°C, dem Temperaturoptimum der aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnenen sogenannten Taq-Polymerase, einer thermostabilen DNA Polymerase. Die DNA-Polymerase füllte die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie begann am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgte dann dem DNA-Strang. Die Zeit, die dieser Schritt benötigt, hängt ebenfalls von der verwendeten DNA-Polymerase und der Länge des DNA-Fragments, das vervielfältigt werden soll, ab und betrug in unserem Fall 1,5 min.

3.2.6.5. Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurde nun die im Probenmaterial enthaltene DNA sichtbar gemacht. Nukleinsäure-Stränge des Erbmateriels wurden nach ihrer Größe aufgetrennt und ihre jeweilige Größe durch Vergleich mit Strängen bekannter Größe bestimmt. Lange Fäden von Agarosepolymeren vernetzten sich zu einem Gel, wobei kleine Poren entstanden, welche umso

kleiner waren, je dichter die Vernetzung war. Im elektrischen Feld wanderten die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch diese Poren der Gelmatrix, wobei die kleineren Moleküle schneller wanderten. Dies ermöglichte eine Auftrennung der Stränge ihrer Größe nach.

Zunächst wurde eine 1,5 % Agaroselösung in TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE) hergestellt. Dazu wurde die Agaroselösung im Mikrowellengerät für 1 Minute aufgekocht, bis die Agarose gelöst war. Im Anschluss daran ließ man diese bei Raumtemperatur auf ca. 60 °C abkühlen. Im Weiteren wurden 2 µl Ethidiumbromid pro 10 ml einer Gellösung von 20 ml zugegeben; die Gellösung wurde durchmengt, bis sich das Ethidiumbromid gut verteilt hatte und dann in die Gelkammer gegossen. Anschließend wurde ein Gelkamm in das noch flüssige Gel an der Markierung des Gefäßes ca. 5-10 mm vom oberen Rand eingebracht und sobald das Gel fest war, wieder entfernt. Die Aussparungen (Taschen), die im Gel zurückblieben, wurden vor Auftragen der Probe mit Puffer gespült. Dann wurde das Gel in TBE-Laufpuffer gelegt, derart, dass es vollständig bedeckt war. Die Taschen kamen an der negativen Elektrode der Kammer zu liegen. Nun wurde der Probenpuffer mit Farbmaler zu den DNA-Proben hinzugegeben. Der DNA-Leiter war schon mit Farbmaler versehen.

Es wurden jetzt der DNA-Leiter und die DNA-Proben mit einer Pipette in die Aussparungen gespritzt. Als Molekulargewichtsmarker wurde die Mischung aus 9µl TE-Puffer, 2µl DNA-Auftragspuffer und 0,2µl DNA-Längenstandard verwendet. 2µl Bromphenolblaulösung wurden mit jeweils 9µl der Proben versehen und hiervon dann 9µl in die Aussparungen pipettiert.

Dann wurde eine konstante elektrische Spannung von 300 Volt bei einer Stromstärke von 120 mA für 20 min angelegt.

Die DNA wanderte zur positiv geladenen Anode, weil sie negativ geladen war (Phosphatreste im "Rückgrat" der DNA). Kleine DNA-Fragmente wanderten schnell, große langsam durch das Gel. Die DNA ist währenddessen normalerweise nicht sichtbar. Daher konnte der Fortschritt an der Farbfront abgelesen werden, die sich mit einem DNA-Fragment bestimmter Länge auf gleicher Höhe durch das Gel bewegte (je nach Farbstoff und Agarose-Konzentration unterschiedlich).

Anhand der Farbfront wurde abgeschätzt, wann die Elektrophorese beendet und ausgewertet werden konnte.

Das Gel wurde schließlich unter einer UV-Lampe betrachtet. Ethidiumbromid, das sich in die DNA eingelagert hatte, fluoreszierte im ultravioletten Licht. Mit einer Polaroidkamera wurde das Ergebnis zur Dokumentation fotografiert (Abbildung 3 und 4).

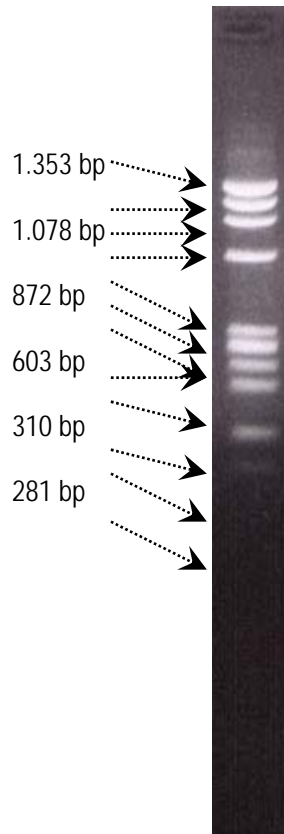


Abb. 3: DNA Standard Hae III Digest (New England Biolabs)

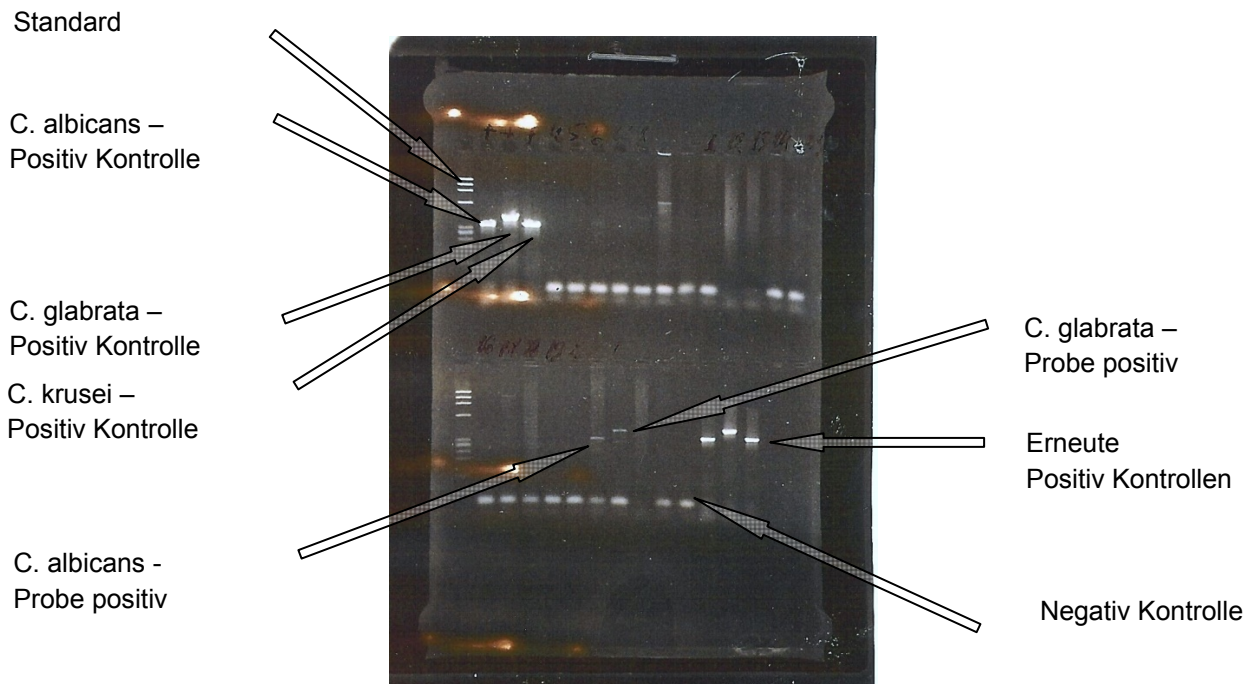


Abb. 4: DNA-Banden im UV-Licht (Probe)

3.2.7. Zytokinbestimmung mittels ELISA

3.2.7.1. Das Wirkungsprinzip des ELISA

In vorliegender Arbeit wurden mittels Elisa die humanen Interleukine hIL-1 β , hIL-4, hIL-6, hIL-8, sowie der Leukämie inhibierender Faktor LIF im Vaginalsekret von schwangeren Frauen nachgewiesen.

Prinzip des hier angewendeten nicht-kompetitiven, feste Phase Sandwich-ELISAs, ein auf Enzymmarkierung basierender Assay, ist der quantitative in vitro Nachweis von Proteinen durch AK-Antigen-AK Komplexbildung. Verwendet werden zwei Antikörper (AK), die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Der erste Antikörper (coating-Antikörper) wird an eine feste Phase (eine Mikrotiterplatte im so genannten 96-Well-Format mit je zwölf Kavitäten in acht Reihen mit einem Volumen pro Kavität von etwa 350 Mikroliter) gebunden. Die über die Firma Biosource Europe SA bezogenen Mikrotiterplatten enthalten bereits die jeweiligen Antikörper der Interleukine. Die Standards und Patientenproben mit dem

nachzuweisenden Antigen werden in die Kavitäten gegeben und eine Zeit lang inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in den Proben vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen. Die ungebundenen Bestandteile der Proben werden dadurch entfernt und zurück bleibt das am (coating-) Antikörper gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wird ein Detektions-Antikörper zugegeben, an dessen Ende das Enzym Streptavidin-Peroxydase (HRP, von engl. horseradish) gebunden ist. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex. Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige zweite Antikörper ausgewaschen. Im Weiteren wird Biotin Konjugat als Farbindikator zugegeben, das sich an den zweiten AK bindet. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe.

Die Farbintensität, die proportional zur optischen Dichte der Lösung ist, wird mit einem Spektralphotometer gemessen und in Bezug zur Standardverdünnungsreihe gesetzt. Daraus werden dann die Konzentrationen der Interleukine in den Proben berechnet. Für eine exakte Konzentrationsbestimmung ist eine Eichkurve notwendig, für die ebenfalls Proben mit bekannter Analytkonzentration gemessen werden.

3.2.7.2. Aufbereiten der Reagenzien

Aufbereitet wurden die Standardlösungen, die Waschlösung sowie das Enzym Streptavidin-Peroxidase. Die übrigen Reagenzien wurden gebrauchsfertig geliefert.

3.2.7.3. Standardlösungen

Zur Herstellung der Standardlösungen wurden die entsprechenden in pulverisierter Form gelieferten IL Standards in der auf der jeweiligen Flasche angegebenen Menge Standardpuffer gelöst.

Der Standard für die Bestimmung des hIL-1 β wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge an Standardpuffer auf eine Konzentration von 2500 pg/ml gebracht. Daraus wurde 0.100 ml des gelösten Standards entnommen und mit 0.900 ml Standardpuffer versehen, sodass der aufbereitete Standard schließlich eine Konzentration von 250 pg/ml hatte.

Der Standard für die Bestimmung des hIL-4 wurde durch Zugabe von Standardpuffer auf eine Konzentration von 10.000 pg/ml gebracht. Daraus wurde 0.050 ml entnommen und mit 0.950 mL Standardpuffer versehen, sodass der aufbereitete Standard schließlich eine Konzentration von 500 pg/ml hatte.

Im Fall der hIL-6 Bestimmung wurde der Standard durch Zugabe von Standardpuffer auf 2500 pg/ml gebracht, davon wurden 0.200 ml entnommen und mit 0.800 ml Standardpuffer versehen, so dass der aufbereitete Standard nun eine Konzentration von 500 pg/ml hatte.

Der aufbereitete Standard für die hIL-8 Bestimmung hatte eine Konzentration von 10.0 ng/ml. Davon wurden 0.100 ml mit 0.900 ml Standardpuffer versehen, dies ergab eine Konzentration von 1000 pg/ml.

Im nächsten Arbeitsschritt wurde je eine Standardverdünnungsreihe hergestellt. Für die Bestimmung des hIL-1 β wurden 0.250 ml des aufbereiteten Standards mit 0.250 ml Standardpuffer verdünnt, so dass die Konzentration von 250 pg/ml auf 125 pg/ml sank. Daraus wurden wiederum 0.250 ml des verdünnten Standards mit 0.250 ml Standardpuffer verdünnt, woraus sich eine Konzentration von 62,5 pg/ml ergab. Es folgten 5 weitere Verdünnungsschritte, wobei sich die Konzentration jeweils halbierte. Die Verdünnungsreihen für die hIL-4-, IL-6- und IL-8-Bestimmungen erfolgten ebenso nach dem oben beschriebenen Prinzip in 7 Verdünnungsschritten. Bei den Interleukinen IL-4 und -6 ausgehend von einer Konzentration von 500 pg/ml. Bei IL- 8 beginnend mit 1000 pg/ml.

3.2.7.4. Streptavidin-Peroxidase

Für jede Reihe (je 8 Vertiefungen) wurden 10 μ l des 100-fach konzentrierten Streptavidin-HRP Konzentrats mit 1 ml des entsprechenden Puffers verdünnt.

3.2.7.5. Gepufferte Waschlösung

Eine Einheit des 25-fach konzentrierten Waschpufferkonzentrats wurde mit 24 Einheiten Wasser verdünnt.

3.2.7.6. Durchführung der Interleukin-Bestimmungen

Sämtliche benötigte Reagenzien und Proben wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig gemischt.

Die Mikrotiterplatte bestand aus einzelnen Reihen mit je 8 Kavitäten.

Zunächst wurde die gewünschte Anzahl der Reihen dem Kit entnommen und auf den dafür vorgesehenen Halterahmen gesteckt. Dann wurden je 50 µl des Standardpuffers bei der Bearbeitung von IL-1β und IL-8, respektive je 100 µl des Standardpuffers bei der Bearbeitung von IL-4 und IL-6 in die Kavitäten einpipettiert. Anschließend wurden 50 µl der Standards und der Proben in die dafür vorgesehenen Kavitäten hinzu pipettiert und schließlich mit je 50 µl des Biotin Konjugates versehen. Durch vorsichtiges Antippen der Platte wurden die Reagenzien gemischt. Nun wurde die Platte mit einer Klebefolie geschützt und für eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten vier Absaug-Spül-Vorgänge mit je 400 µl Waschpuffer pro Vertiefung, um alle ungebundenen Moleküle heraus zu waschen. In Folge wurden 100 µl der Streptavidin-HRP-Lösung in alle Kavitäten pipettiert, die Platte mit einer Klebefolie geschützt und bei Raumtemperatur 30 Minuten lang erneut inkubiert. Es folgten wiederum vier Absaug-Spül-Vorgänge. Schließlich wurden 100 µl TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettiert und die Platte anschließend für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Dem Protokollheft zu Folge betrug die Inkubationszeit 30 Minuten. Jedes Photometer variierte jedoch bezüglich der oberen Messgrenze für die optische Dichte. Durch Zugabe von 100 µl der Stopplösung wurde die Reaktion unterbrochen, es gab einen Farbumschlag von blau nach gelb. Mit Hilfe eines Spektralphotometers konnten nun die optischen Dichten bei einer Wellenlänge von 450 nm und einem Referenzbereich von 492 nm gemessen werden. Für eine Auswertung der Messergebnisse wurde eine Standardkurve erstellt und die optischen Dichten der Standards gegen ihre bekannten Zytokinkonzentrationen

aufgetragen. Aus den einzelnen optischen Dichten wurden die Konzentrationen der unbekanntes Patientenproben berechnet.

3.2.7.7. Durchführung der LIF ELISA

Die LIF/HILDA EASIA (Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay) basiert auf einem oligoklonalen System, in dem verschiedene monoklonale Antikörper eingesetzt werden, die gegen bestimmte Epitope der LIF/HILDA gerichtet sind. Das Prinzip der Sandwich Bildung glich dem Ablauf der zuvor beschriebenen Interleukin- Bestimmungen. Auch hier band LIF/HILDA während einer Inkubationszeit an den in der Mikrotiterplatte beschichteten AK zur einen und an den an HRP gebundenen AK zur anderen Seite. Nach diesem Vorgang wurden die ungebundenen überschüssigen AK herausgewaschen und die gebundenen AK durch eine Reaktion mit TMB und H_2O_2 messbar gemacht. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten unter Schüttelbewegungen der Platte wurde durch Zugabe der Stopplösung (H_2SO_4) der Vorgang beendet. Anhand der Farbintensität maß das Photometer die optischen Dichten, welche sich den gesuchten Konzentrationen proportional zeigten. Es wurde auch hier eine Standardkurve erstellt und über Interpolation die gewünschten Konzentrationen der Proben bestimmt.

Die Standards und Kontrollen mussten in destilliertem Wasser aufgelöst werden, die Mengenangabe war dem Protokollheft und dem Etikett auf den Fläschchen zu entnehmen. Ebenso mit destilliertem Wasser aufzubereiten war die Waschlösung und das konzentrierte Chromogen. Alle übrigen Substanzen wurden gebrauchsfertig geliefert. Vor Testbeginn sollten die Proben und Reagenzien Raumtemperatur erlangt haben und nochmals vorsichtig gemischt worden sein.

Zunächst wurde auch hier wiederum die gewünschte Anzahl der Reihen dem Kit entnommen und auf den dafür vorgesehenen Halterahmen gesteckt. Dann wurden je 100 μ l der Lösung B in die für die Standards, Kontrollen und Proben vorgesehenen Kavitäten pipettiert. Anschließend wurden 100 μ l der jeweiligen Standards, Kontrollen und Proben in die dafür vorgesehenen Kavitäten hinzu pipettiert und schließlich mit je 50 μ l des anti-LIF/HILDA Konjugates versehen. Nun wurde die Platte mit einer Klebefolie geschützt und für vier Stunden bei

Raumtemperatur auf einem horizontalen Shaker mit 700 ± 100 rpm inkubiert. Es folgten drei Absaug-Spül-Vorgänge mit je $400 \mu\text{l}$ Waschpuffer pro Vertiefung, um alle ungebundenen Moleküle heraus zu waschen. Schließlich wurden $200 \mu\text{l}$ der frisch aufbereiteten TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettiert und die Platte anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem horizontalen Shaker mit 700 ± 100 rpm inkubiert, wobei die Platte vor direktem Sonnenlicht geschützt werden mußte. Dem Protokollheft zu Folge betrug die Inkubationszeit 30 Minuten. Jedes Photometer variierte jedoch bezüglich der oberen Messgrenze für die optische Dichte.

Durch Zugabe von $50 \mu\text{l}$ der Stopplösung wurde die Reaktion unterbrochen, es gab einen Farbumschlag von blau nach gelb. Mit Hilfe eines Spektralphotometers konnten nun die optischen Dichten bei einer Wellenlänge von 450 nm und einem Referenzbereich von 492 nm gemessen werden. Für die Auswertung der Messergebnisse wurde eine Standardkurve erstellt und die optischen Dichten der Standards auf der Ordinate gegen ihre bekannten Zytokinkonzentrationen auf der Abszisse aufgetragen. Aus den einzelnen optischen Dichten wurden die Konzentrationen der unbekanntenen Patientenproben berechnet.

3.2.8. Statistische Methoden

Bei metrischen Daten wurde der t-Test angewandt, da dieser bei dieser Fallzahl ausreichend robust gegen Abweichungen von der Normalverteilung ist.

Der t-Test liefert das arithmetische Mittel (Mean) und die Standardabweichung (SD) sowie den Gruppenunterschied mit dem 95% - Konfidenzintervall.

Kategorielle Daten wurden mit dem Pearson-Chi-Quadrat-Test bezüglich eines Gruppenunterschiedes geprüft.

Die Ergebnisse der Zytokinmessungen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben auf Unterschiede zwischen den arithmetischen Mittelwerten der Konzentrationen geprüft.

Als kritisches Niveau wurde allgemein das 5%-Signifikanzniveau genommen.

Die Tabellenwerte wurden als absolute (Anzahl) und relative (Prozentwert) Häufigkeit ausgegeben.

Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm SYSTAT[®] verwendet. Um die Daten für das Programm verwertbar zu machen, wurde der Messgruppe die Gruppenvariable „krank“ und der Kontrollgruppe die Gruppenvariable „gesund“ zugeordnet.

Allen zu bewertenden Daten wurde für „positiv“ der Parameter „1“ und für „negativ“ der Parameter „0“ zugeordnet mit Ausnahme der Pilzart. Hier wurde für „kein Pilz“ der Parameter „0“, für „Candida albicans“ „1“ und für „Candida glabrata“ „2“ definiert. Die Parameter finden sich in der Tabelle im Ergebnisteil wieder.

4. Ergebnisse

4.1. Patientendaten

4.1.1. Alter

Die zur Auswertung verfügbaren Daten beinhalteten 61 Kranke und 188 Gesunde gemäß den definierten Ein- und Ausschlusskriterien. Das Alter der Kontrollgruppe „gesund“ ist minimal höher als das Alter in der „kranken“ Gruppe. Dies ist in keinster Weise relevant für die getroffenen Aussagen.

Der T-Test für unverbundene Stichproben liefert einen p-Wert von 0,415 und somit keinen signifikanten Unterschied. Somit sind die Gruppen bezüglich des Alters gut vergleichbar.

GROUP	N	Mean	Standard Deviation
gesund	188	34.138	4.436
krank	61	33.607	4.398

Getrennte Varianz

Difference in Means : 0.532
95.00% Confidence Interval : -0.756 to 1.820
T : 0.819
Df : 102.571
p-value : 0.415

Gepoolte Varianz

Difference in Means : 0.532
95.00% Confidence Interval : -0.753 to 1.817
T : 0.815
Df : 247.000
p-value : 0.416

Tab.2: T-Test Alter

Two-sample t-test

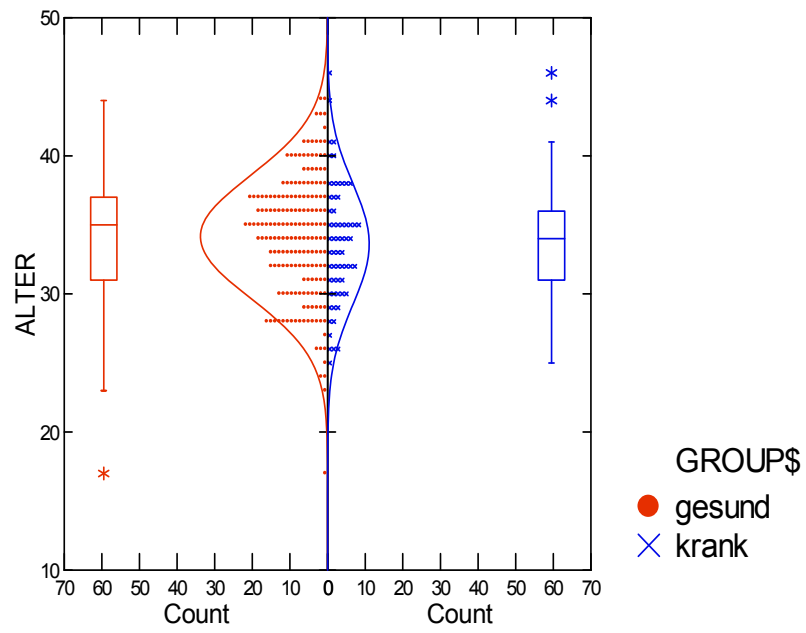


Abb. 5: Alter der Patientinnen

4.1.2. Schwangerschaftswoche

Die Gruppen sind auch hinsichtlich der Schwangerschaftswoche gut vergleichbar. Der T-Test für unverbundene Stichproben liefert einen p-Wert von 0,650 und somit keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Schwangerschaftswoche in beiden Gruppen.

GROUP	N	Mean	Standard Deviation
gesund	188	27.420	8.988
krank	61	28.000	8.544

Getrennte Varianz

Difference in Means : -0.580
95.00% Confidence Interval : -3.108 to 1.949
T : -0.455
Df : 106.425
p-value : 0.650

Gepoolte Varianz

Difference in Means : -0.580
95.00% Confidence Interval : -3.158 to 1.998
T : -0.443
Df : 247.000
p-value : 0.658

Tab. 3: T-Test Schwangerschaftswoche

Two-sample t-test

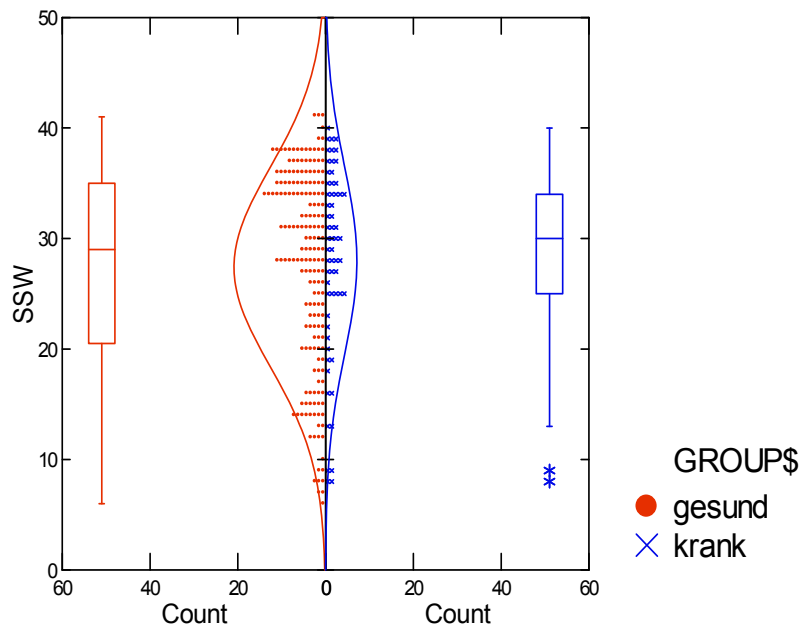


Abb. 6: Schwangerschaftswoche

4.1.3. Anzahl der Schwangerschaften

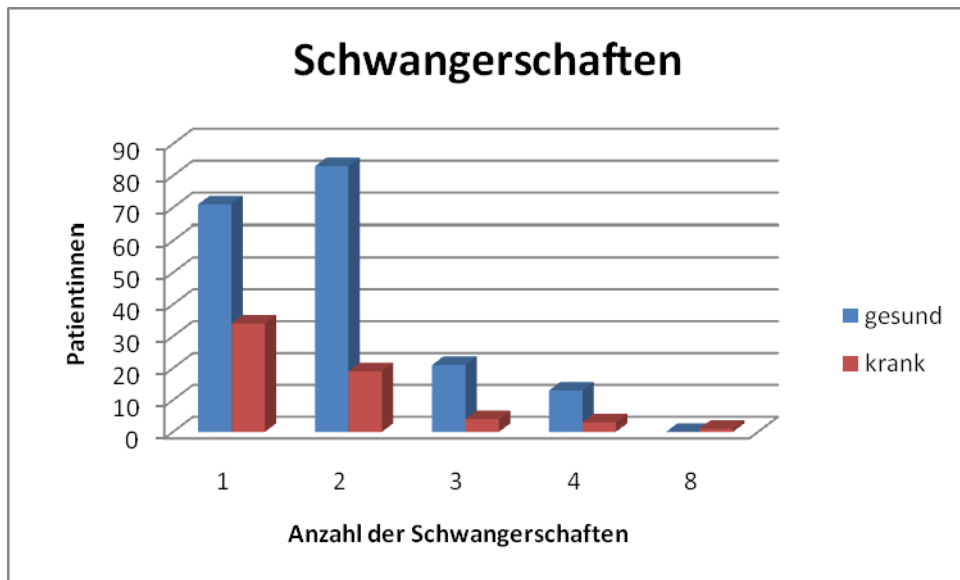


Abb. 7: Schwangerschaften

Der Pearson-Chi-Quadrat Test liefert mit einem p-Wert von 0,044 einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der Anzahl der Schwangerschaften. Dabei befinden sich ca. 56 % der Erstgravida in der Gruppe der Kranken und nur ca. 38% der Erstgravida in der Gruppe der Gesunden.

Andererseits befinden sich 44% der Patientinnen, die vorher bereits schwanger waren in der Gruppe der Kranken und 62% in der Gruppe der Gesunden. Also ein umgekehrtes Bild als bei den Erstgravida.

	gesund	krank	Total
1	71	34	105
2	83	19	102
3	21	4	25
4	13	3	16
8	0	1	1
Total	188	61	249

Tab. 4: Anzahl der Schwangerschaften (Absolut)

	gesund	krank	Total	N
1	37.766	55.738	42.169	105.000
2	44.149	31.148	40.964	102.000
3	11.170	6.557	10.040	25.000
4	6.915	4.918	6.426	16.000
8	0.000	1.639	0.402	1.000
Total	100.000	100.000	100.000	
N	188.000	61.000		249.000

Tab. 5: Anzahl der Schwangerschaften (Prozent)

Test Statistic	Value	df	p-value
Pearson Chi-square	9.772	4.000	0.044

Tab. 6: Anzahl der Schwangerschaften: Pearson Chi – Quadrat Test

4.1.4. Aborte

Im Folgenden wurde der Zusammenhang zwischen einem Abortgeschehen in der Vergangenheit und dem Risiko des Auftretens einer Vulvovaginalcandidose bewertet. Der Pearson-Chi-Quadrat Test lieferte mit einem p-Wert von 0,263 keine Signifikanz und somit keinen Unterschied im Gruppenvergleich.

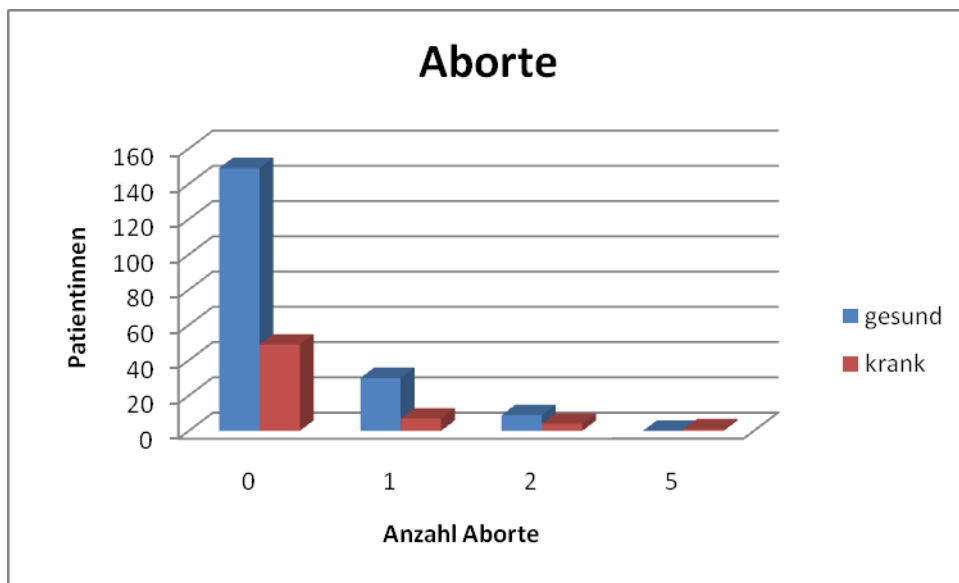


Abb. 8: Aborte

	gesund	krank	Total
0	149	49	198
1	30	7	37
2	9	4	13
5	0	1	1
Total	188	61	249

Tab. 7: Aborte (Absolut)

	gesund	krank	Total	N
0	79.255	80.328	79.518	198.000
1	15.957	11.475	14.859	37.000
2	4.787	6.557	5.221	13.000
5	0.000	1.639	0.402	1.000
Total	100.000	100.000	100.000	
N	188.000	61.000		249.000

Tab. 8: Aborte (Prozente)

Test Statistic	Value	df	p-value
Pearson Chi-square	3.988	3.000	0.263

Tab. 9: Aborte: Pearson Chi – Quadrat Test

4.1.5. Risiken

Betrachtet man das Vorhandensein von einem oder mehreren Risikofaktoren in beiden Gruppen fanden wir mittels dem Pearson- Chi-Quadrat Test einen signifikanten p-Wert von 0,009, was den Schluss zulässt, dass bei dem Vorhandensein von pathologischen Erkrankungen oder Risikofaktoren das Risiko, eine Vulvovaginalcandidose zu bekommen, höher ist.

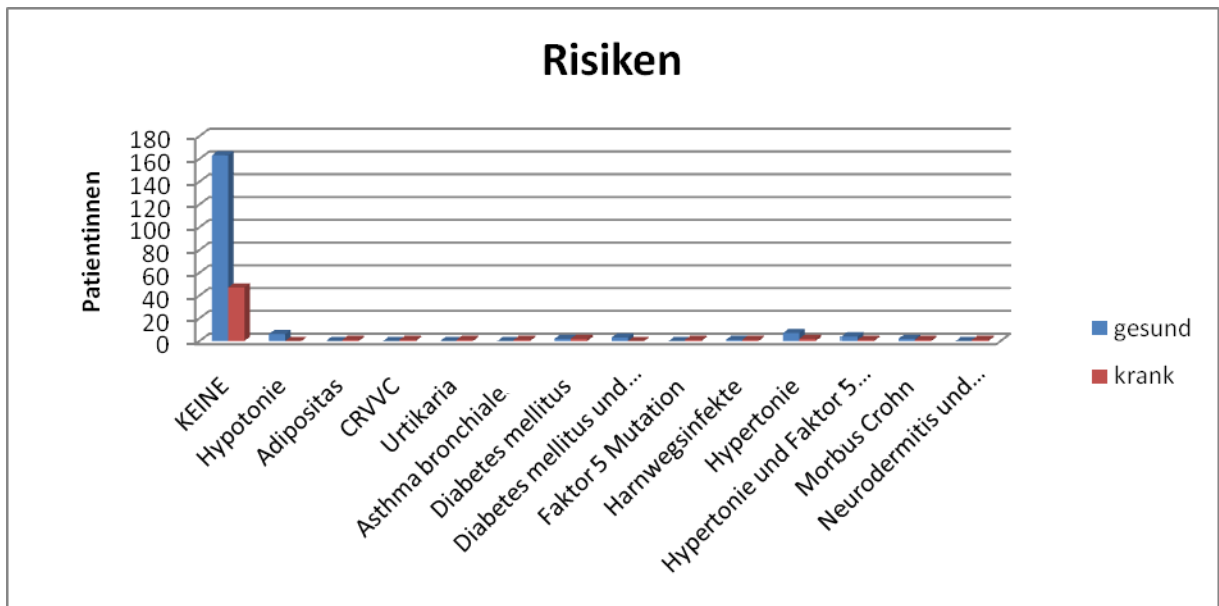


Abb. 9: Risiken

	gesund	krank	Total
KEINE	163	47	210
Hypotonie	6	0	6
Adipositas	0	1	1
CRVVC	0	1	1
Urtikaria	0	1	1
Asthma bronchiale	0	1	1
Diabetes mellitus	2	3	5
Diabetes mellitus und Hypertonie	3	0	3
Faktor 5 Mutation	0	1	1
Harnwegsinfekte	1	1	2
Hypertonie	7	2	9
Hypertonie und Faktor 5 Leiden	4	1	5
Morbus Crohn	2	1	3
Neurodermitis und Asthma bronchiale	0	1	1
Total	188	61	249

Tab. 10: Risiken (Absolut)

	gesund	krank	Total	N
KEINE	86.702	77.049	84.337	210.000
Hypotonie	3.191	0.000	2.410	6.000
Adipositas	0.000	1.639	0.402	1.000
CRVVC	0.000	1.639	0.402	1.000
Urtikaria	0.000	1.639	0.402	1.000
Asthma bronchiale	0.000	1.639	0.402	1.000
Diabetes mellitus	1.064	3.279	2.008	5.000
Diabetes mellitus, Hypertonie	1.596	1.639	1.205	3.000
Faktor 5 Mutation	0.000	1.639	0.402	1.000
Harnwegsinfekte	0.532	1.639	0.803	2.000
Hypertonie	3.723	3.279	3.614	9.000
Hypertonie und Faktor 5 Leiden	2.128	1.639	2.008	5.000
Morbus Crohn	1.064	1.639	1.205	3.000
Neurodermitis und Asthma bronchiale	0.000	1.639	0.402	1.000
Total	100.000	100.000	100.000	
N	188.000	61.000		249.000

Tab. 11: Risiken (Prozent)

Test Statistic	Value	df	p-value
Pearson Chi-square	30.923	15.000	0.009

Tab. 12: Risiken: Pearson Chi – Quadrat Test

4.1.6. Allergien

Das Vorhandensein einer Allergie hat keinen signifikanten Einfluss auf das Risiko, an einer Vulvovaginalcandidose zu erkranken. Wir errechneten einen p-Wert von 0,062 mittels Pearson Chi Quadrat Test. Hier wurde nicht das Vorhandensein einer speziellen Allergie getestet, sondern es wurde statistisch getestet, ob es einen Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich des Parameters Allergie an sich gibt, was nicht signifikant der Fall war. Bei Patientinnen mit VVC treten nicht mehr Allergien auf, als bei Patientinnen der Kontrolle.

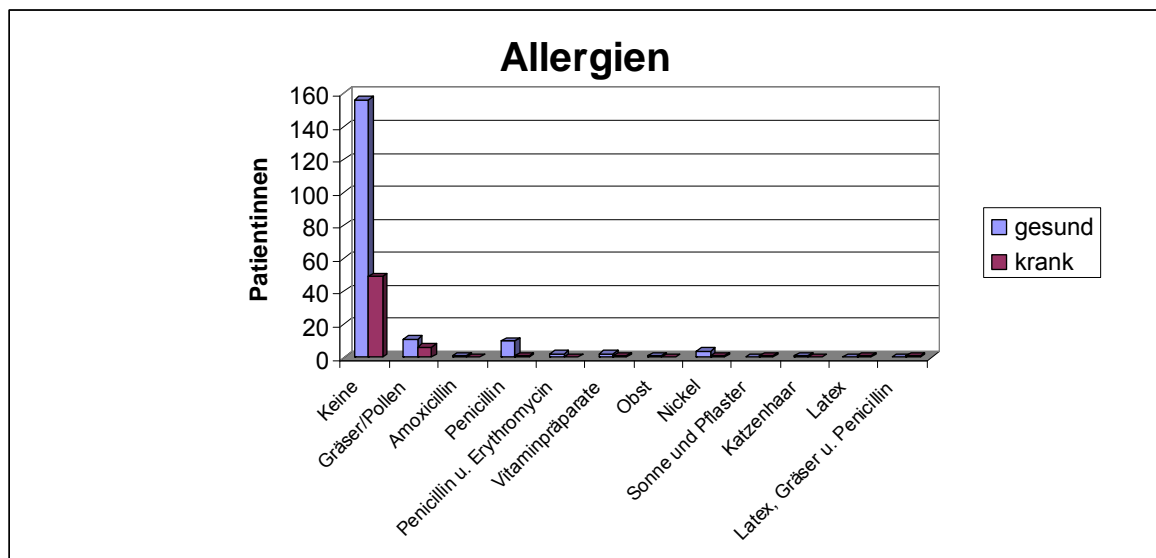


Abb. 10: Allergien

	gesund	krank	Total
Keine	156	49	205
Gräser/Pollen	11	6	17
Amoxicillin	1	0	1
Penicillin	10	1	11
Penicillin und Erythromycin	2	0	2
Vitaminpräparate	2	1	3
Obst	1	0	1
Nickel	4	1	5
Sonne und Pflaster	0	1	1
Katzenhaar	1	0	1
Latex	0	1	1
Latex, Gräser/Pollen und Penicillin,	0	1	1
Total	188	61	249

Tab.: 13: Allergien (Absolut)

	gesund	krank	Total	N
Keine	82.979	80.328	82.329	205.000
Gräser/Pollen	5.851	9.836	6.827	17.000
Amoxicillin	0.532	0.000	0.402	1.000
Penicillin	5.319	1.639	4.418	11.000
Penicillin und Erythromycin	1.064	0.000	0.803	2.000
Vitaminpräparate	1.064	1.639	1.205	3.000
Obst	0.532	0.000	0.402	1.000
Nickel	2.128	1.639	2.008	5.000
Sonnen und Pflaster	0.000	1.639	0.402	1.000
Katzenhaar	0.532	0.000	0.402	1.000
Latex	0.000	1.639	0.402	1.000
Latex, Gräser/Pollen und Penicillin	0.000	1.639	0.402	1.000
Total	100.000	100.000	100.000	
N	188.000	61.000		249.000

Tab. 14: Allergien (Prozent)

Test Statistic	Value	df	p-value
Pearson Chi-square	26.722	14.000	0.062

Tab. 15: Allergien: Pearson Chi – Quadrat Test

4.1.7. Nikotinabusus

Erwartungsgemäß war der Anteil der Raucherinnen in unserem Patientinnenkollektiv der Schwangeren mit insgesamt 11 Frauen gering. Trotz der geringen Fallzahl erhielten wir einen hochsignifikanten p-Wert von 0,000. Unser Ergebnis zeigt, dass Rauchen das Risiko für eine Vulvovaginalcandidose erhöht.

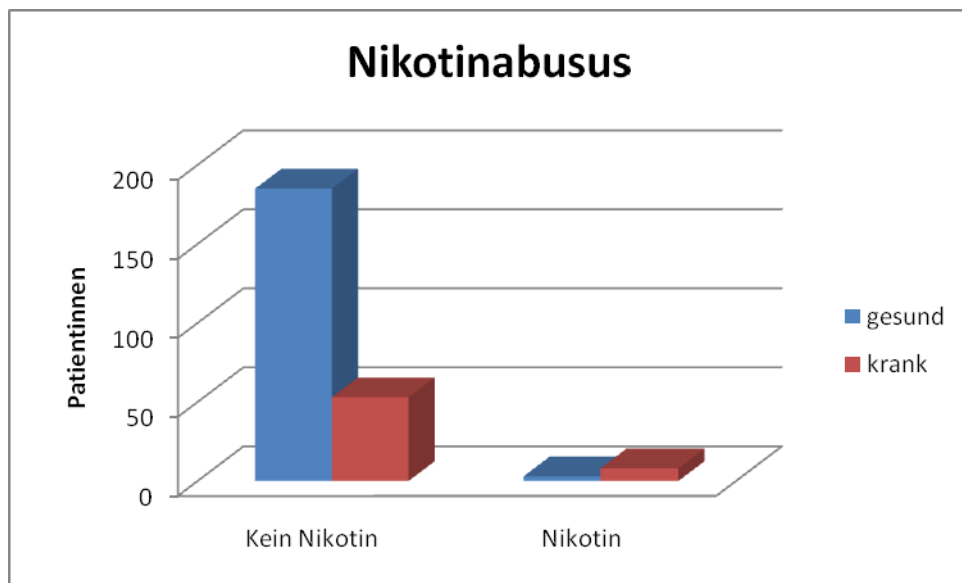


Abb. 11: Nikotinabusus

	gesund	krank	Total
0	185	53	238
1	3	8	11
Total	188	61	249

Tab. 16: Nikotinabusus (Absolut)

	gesund	krank	Total	N
0	98.404	86.885	95.582	238.000
1	1.596	13.115	4.418	11.000
Total	100.000	100.000	100.000	
N	188.000	61.000		249.000

Tab. 17: Nikotinabusus (Prozent)

Test Statistic	Value	df	p-value
Pearson Chi-square	14.473	1.000	0.000

Tab. 18: Nikotinabusus: Paerson-Chi – Quadrat Test

4.2. Beschreibung der Candidose

Von den 61 Candida – PCR positiven Patientinnen waren 48 Candida albicans positiv und 13 Patientinnen Candida glabrata positiv. In unserer Stichprobe war keine Patientin Candida krusei positiv.

4.2.1. Reinheitsgrad

Analysiert man die mikroskopische Betrachtung des Nativpräparates vom Vaginalfluor der Patientinnen zur Diagnose einer Vulvovaginalcandidose, so erhalten wir eine Sensitivität von 54% und eine Spezifität von 52%. Der p-Wert ist mit 0,173 nicht signifikant. Der Reinheitsgrad alleine reicht als Diagnoseinstrument nicht aus.

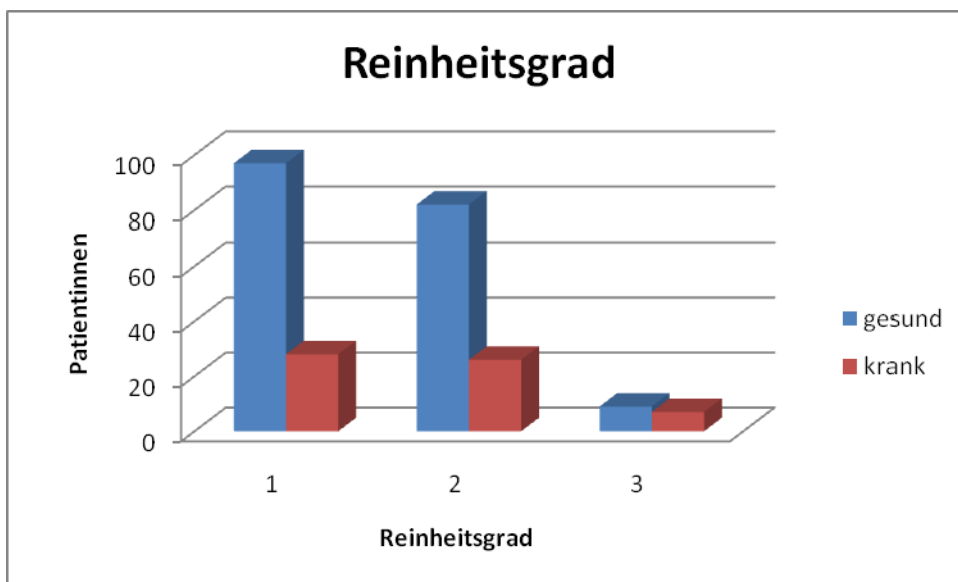


Abb. 12: Reinheitsgrad

RG	gesund	krank	Total
1	97	28	125
2	82	26	108
3	9	7	16
Total	188	61	249

Tab. 19: Reinheitsgrad (Absolut)

RG	gesund	krank	Total	N
1	51.596	45.902	50.201	125.000
2	43.617	42.623	43.373	108.000
3	4.787	11.475	6.426	16.000
Total	100.000	100.000	100.000	
N	188.000	61.000		249.000

Tab. 20: Reinheitsgrad (Prozent)

Test Statistic	Value	df	p-value
Pearson Chi-square	3.514	2.000	0.173

Tab. 21: Reinheitsgrad: Pearson Chi – Quadrat Test

4.2.2. Kultur

In der Kultur konnten 18 Patientinnen in der Gruppe der 61 Patientinnen, die mittels PCR positiv auf Candida getestet wurden als positiv verifiziert werden. Erwartungsgemäß gab es aufgrund unserer Gruppenzuordnung (PCR) keine falsch Positiven, da in einer PCR negativen Probe eine positive Kultur sehr unwahrscheinlich ist. Die Sensitivität lag bei ca. 30% und die Spezifität aufgrund unserer Einschlusskriterien in die Gruppe „gesund“ bei geschaffenen 100%. Ebenso ist der hochsignifikante p-Wert von 0.000 nicht zu werten. Zu werten und auf das Kollektiv zu übertragen ist jedoch die geringe Sensitivität von 30%.

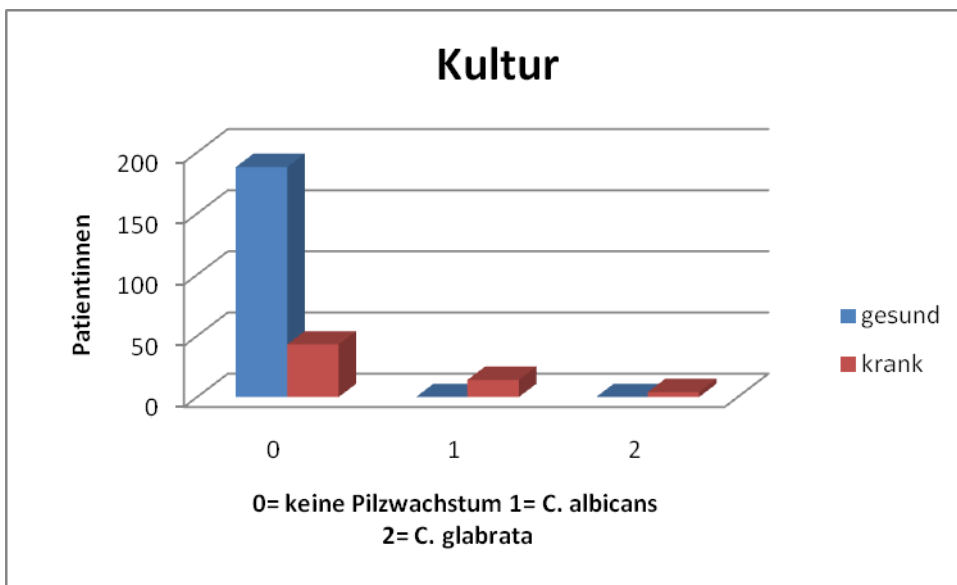


Abb. 13: Kultur

	gesund	krank	Total
0	188	43	231
1	0	14	14
2	0	4	4
Total	188	61	249

Tab. 22: Kultur (Absolut)

	gesund	krank	Total	N
0	100.000	70.492	92.771	231.000
1	0.000	22.951	5.622	14.000
2	0.000	6.557	1.606	4.000
Total	100.000	100.000	100.000	
N	188.000	61.000		249.000

Tab. 23: Kultur (Prozent)

Test Statistic	Value	df	p-value
Pearson Chi-square	59.798	2.000	0.000

Tab. 24: Kultur : Pearson Chi – Quadrat Test

4.2.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR war unser Gruppenzuordnungsmerkmal, somit sind die statistischen Ergebnisse geschaffen und nicht zu werten. Interessanter ist der statistische Vergleich zwischen PCR und Kultur in folgendem Unterpunkt.

Die PCR identifizierte 61 Candida positive Patientinnen (48 Candida albicans und 13 Candida glabrata) und 188 Candida negative.

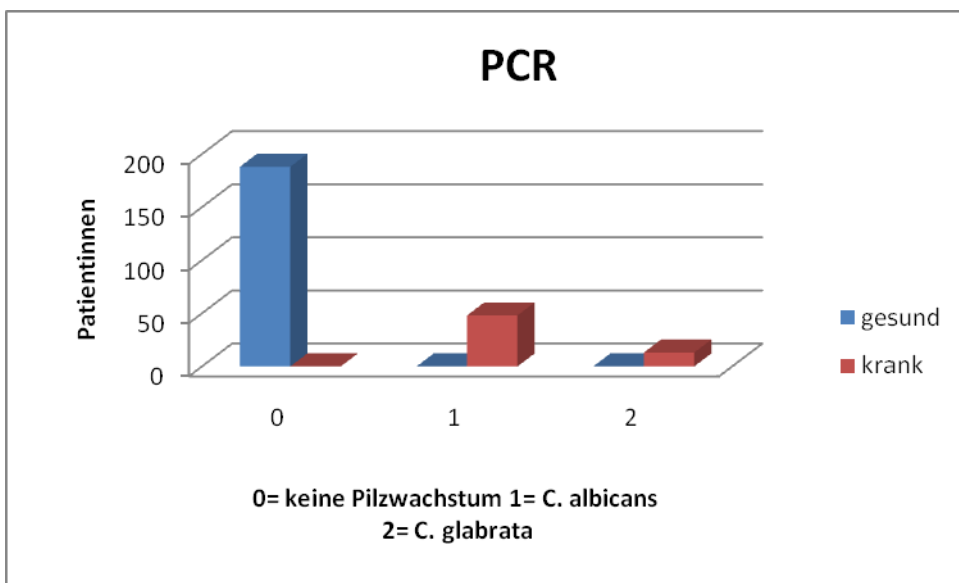


Abb. 14: PCR

	gesund	krank	Total
0	188	0	188
1	0	48	48
2	0	13	13
Total	188	61	249

Tab. 25: PCR (Absolut)

	gesund	krank	Total	N
--	--------	-------	-------	---

	gesund	krank	Total	N
0	100.000	0.000	75.502	188.000
1	0.000	78.689	19.277	48.000
2	0.000	21.311	5.221	13.000
Total	100.000	100.000	100.000	
N	188.000	61.000		249.000

Tab. 26: PCR (Prozent)

Test Statistic	Value	df	p-value
Pearson Chi-square	249.000	2.000	0.000

Tab. 27: PCR: Pearson Chi – Quadrat Test

4.2.4. Vergleich PCR – Kultur

Betrachtet man in der Gruppe der Kranken (PCR Positiv für Candida gemäß den Einschlusskriterien) die Kultur und die PCR, so sieht man, dass bei 43 Patientinnen die Kultur eine Candida Infektion nicht nachweisen konnte. Bei 14 Patientinnen wurde *C. albicans* nachgewiesen und bei 4 Patientinnen *C. glabrata*.

Der Pearson-Chi -Quadrat Test liefert mit einem p-Wert von 0,000 ein signifikantes Ergebnis dahingehend, dass die PCR im Vergleich zur Kultur als Diagnosemethode eines Pilzbefalles genauer ist.

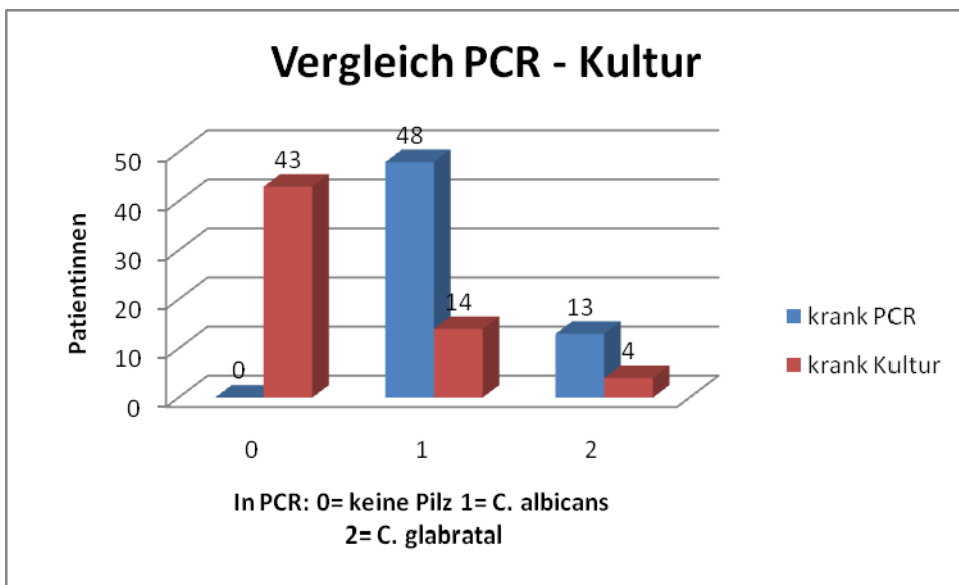


Abb.15: Vergleich PCR - Kultur

PCR	Kultur		
	1	2	Total
0	34	9	43
1	14	0	14
2	0	4	4
Total	48	13	61

Tab. 28: Vergleich PCR – Kultur (Absolut)

PCR	1	2	Total	N
Kultur				
0	70.833	69.231	70.492	43.000
1	29.167	0.000	22.951	14.000
2	0.000	30.769	6.557	4.000
Total	100.000	100.000	100.000	
N	48.000	13.000		61.000

Tab. 29: Vergleich PCR – Kultur (Prozent)

Test Statistic	Value	df	p-value
Pearson Chi-square	18.565	2.000	0.000

Tab. 30: Vergleich PCR – Kultur: Pearson Chi – Quadrat Test

4.3. Analyse der Interleukine und LIF

Im Folgenden betrachten wir die Interleukine und den Leukämie inhibierenden Faktor LIF.

Die Ergebnisse sind nachfolgend für jedes Interleukin in der gleichen Art dargestellt. Zu Beginn steht ein Diagramm, welches die absolute Anzahl des Nachweises des entsprechenden Interleukins im Gruppenvergleich darstellt.

Es folgt eine Tabelle mit den arithmetischen Mittelwerten in pg/ml und eine graphische Darstellung der Ergebnisspanne.

Abschließend sehen wir die statistische Auswertung mittels Mann –Whitney U Test inklusive p - Wert.

4.3.1. IL-1 β

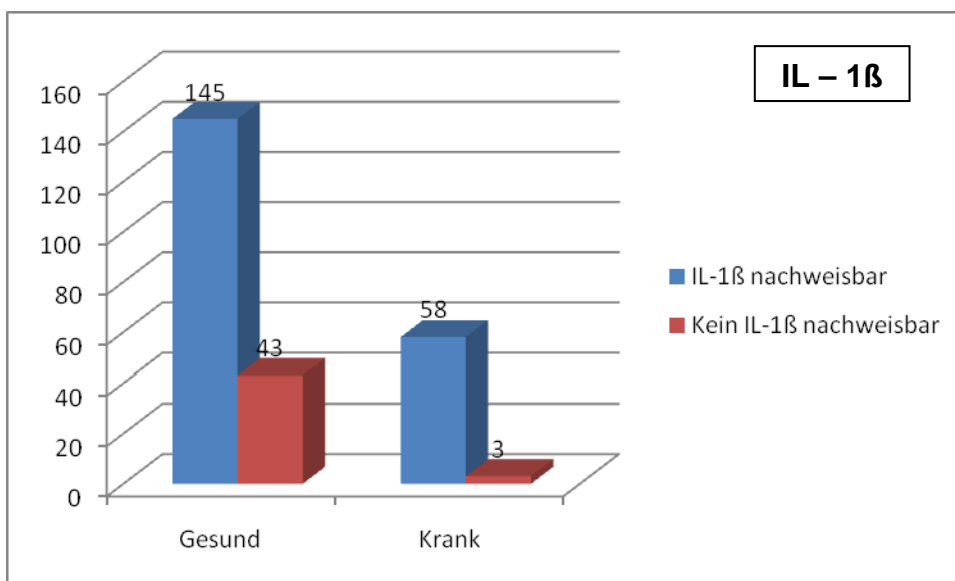


Abb. 16: IL-1 β

	N	Mittelwert	Vertrauen (\pm)	Std.Fehler	Std.Abw.
Krank	61	42.6685246	22.205397	11.1007506	86.6996337
Gesund	188	25.8123404	8.87996204	4.50135122	61.7194184

Tab. 31: Vergleich IL-1 β

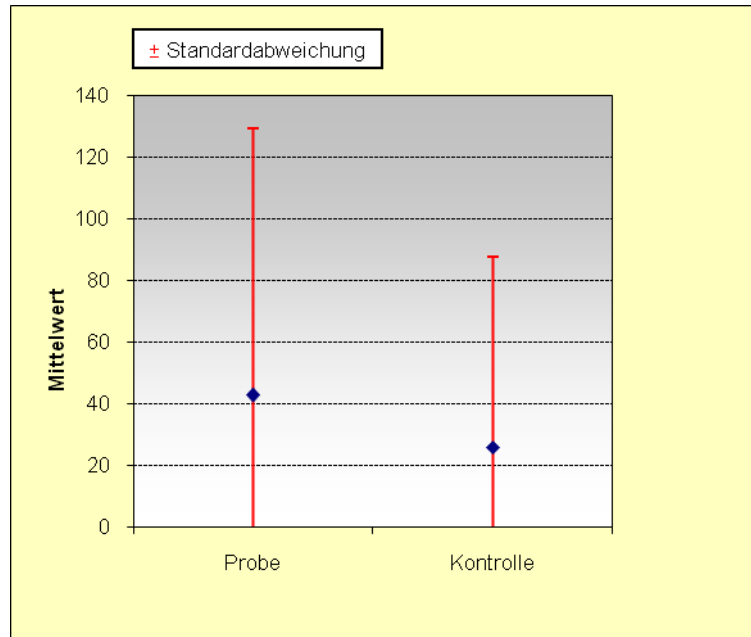


Abb. 17: Mittelwerte IL-1 β

Dependent variable	IL-1 β
Grouping variable	GROUP\$

Group	Count	Rank Sum
gesund	188	21556.000
krank	61	9569.000

Mann-Whitney U Test Statistic :	3790.000
p-value :	0.000
Chi-square Approximation :	15.920
Df :	1

Tab. 32: Mann-Whitney-U-Test IL-1 β

4.3.2. IL-4

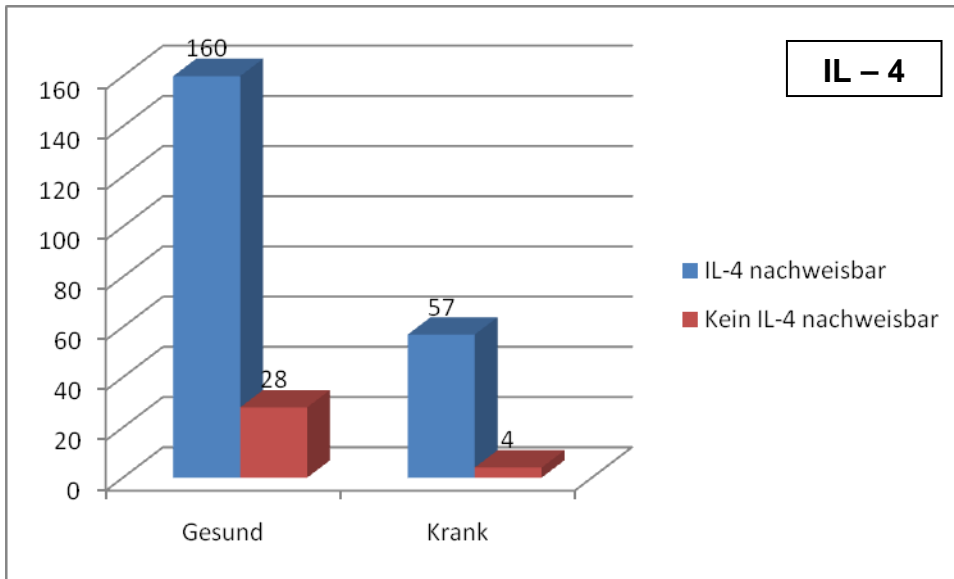


Abb. 18: IL-4

	N	Mittelwert	Vertrauen (±)	Std.Fehler	Std.Abw.
Krank	61	12.70623	3.15409651	1.5767716	12.31498
Gesund	188	10.036777	1.53788441	0.7795707	10.688934

Tab. 33: Gruppenvergleich IL-4

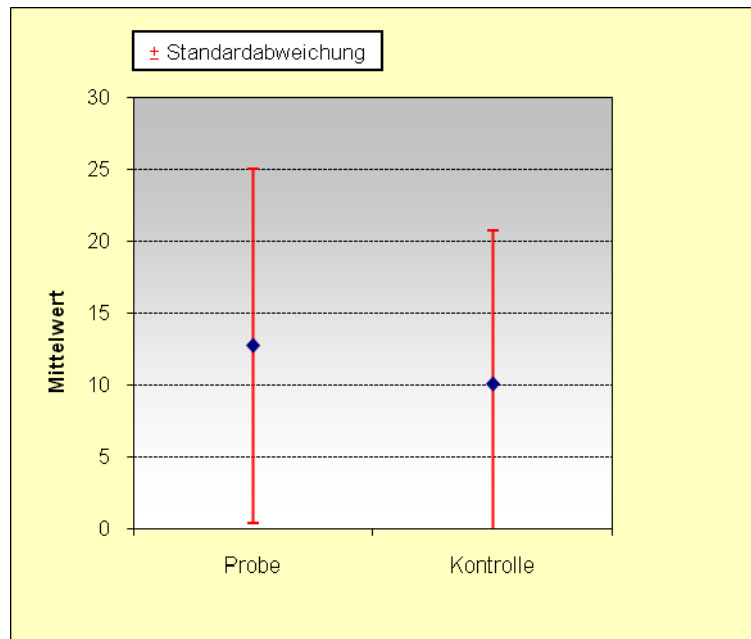


Abb. 19: Mittelwerte IL-4

Dependent variable	IL4
Grouping variable	GROUP\$

Group	Count	Rank Sum
gesund	188	22704.000
krank	61	8421.000

Mann-Whitney U Test Statistic : 4938.000

p-value : 0.103

Chi-square Approximation : 2.658

df : 1

Tab. 34: Mann-Whitney-U-Test IL-4

4.3.3. IL-6

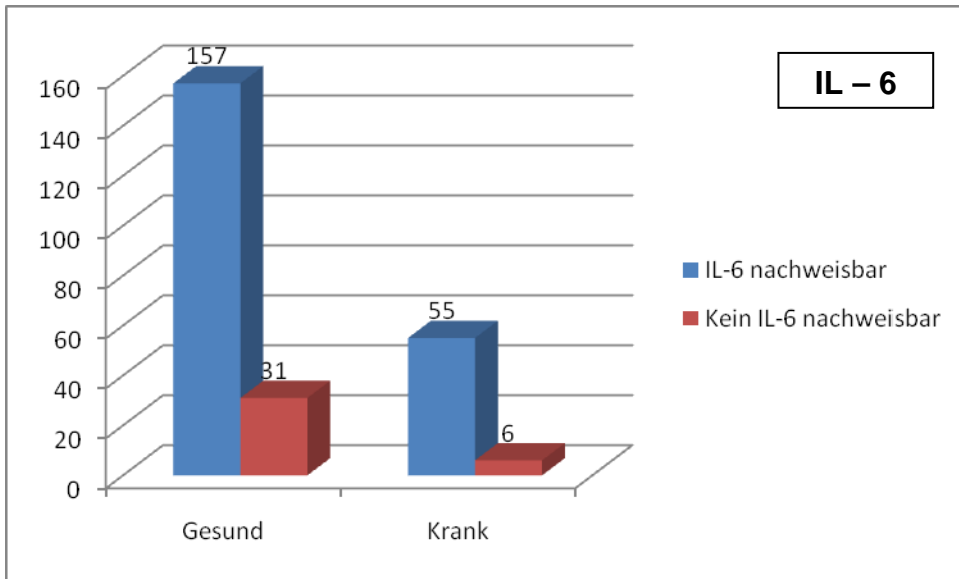


Abb. 20: IL-6

	N	Mittelwert	Vertrauen (±)	Std.Fehler	Std.Abw.
Krank	61	62.03918	28.39638012	14.195699	110.87195
Gesund	188	48.583191	17.0410233	8.6382837	118.44218

Tab. 35: Gruppenvergleich IL-6

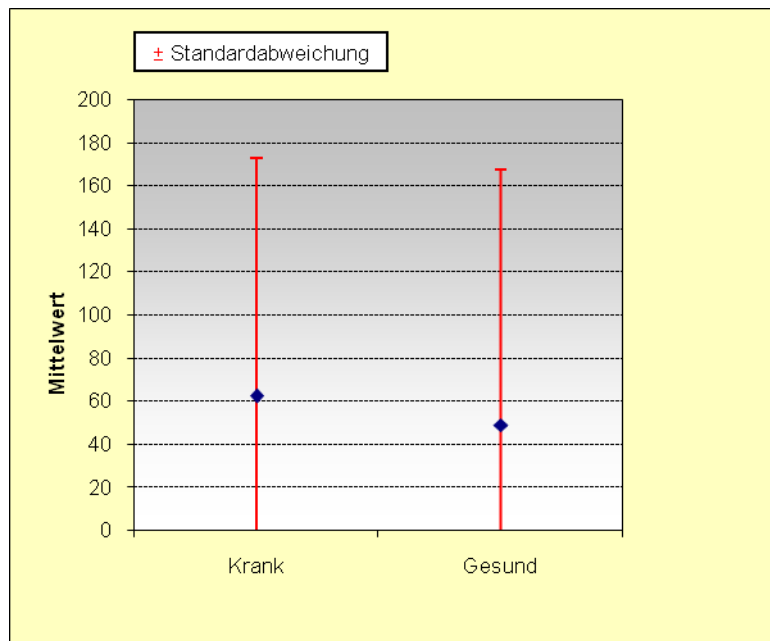


Abb. 21: Mittelwerte IL-6

Dependent variable	IL6
Grouping variable	GROUP\$

Group	Count	Rank Sum
gesund	188	22944.500
krank	61	8180.500

Mann-Whitney U Test Statistic : 5178.500

p-value : 0.255

Chi-square Approximation : 1.296

df : 1

Tab. 36: Mann-Whitney-U-Test IL-6

4.3.4. IL-8

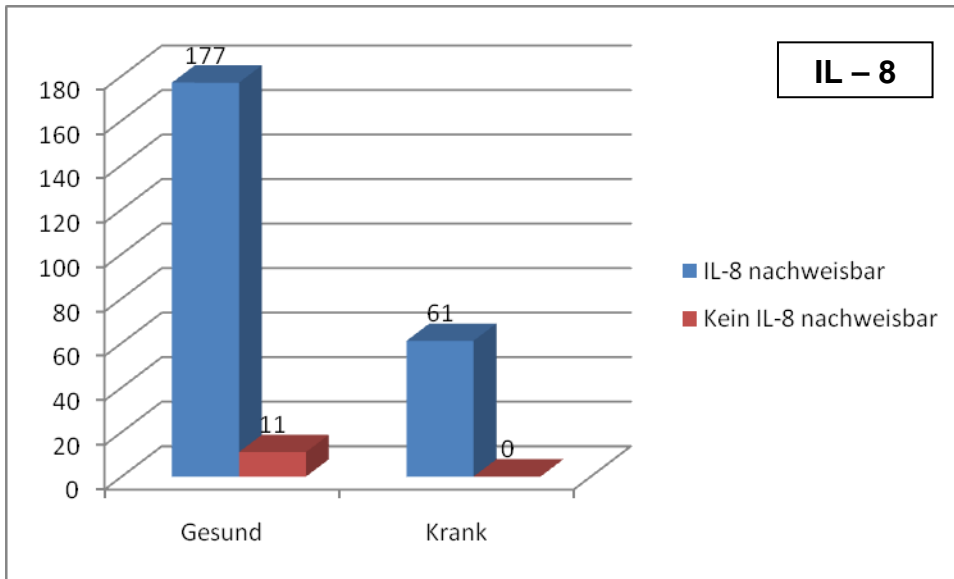


Abb. 22: IL-8

	N	Mittelwert	Vertrauen (±)	Std.Fehler	Std.Abw.
Krank	61	393.4041	165.595614	82.783281	646.55809
Gesund	188	416.89553	94.51797204	47.912208	656.9391

Tab. 37: Gruppenvergleich IL-8

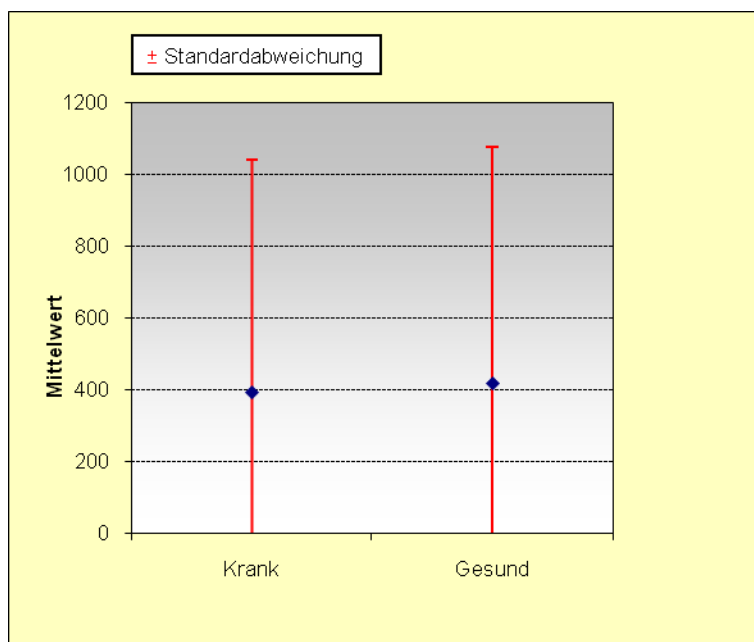


Abb. 23: Mittelwerte IL-8

Dependent variable	IL8
Grouping variable	GROUP\$

Group	Count	Rank Sum
gesund	188	23265.500
krank	61	7859.500

Mann-Whitney U Test Statistic : 5499.500

p-value : 0.631

Chi-square Approximation : 0.230

df : 1

Tab. 38: Mann-Whitney-U-Test IL-8

4.3.5. LIF

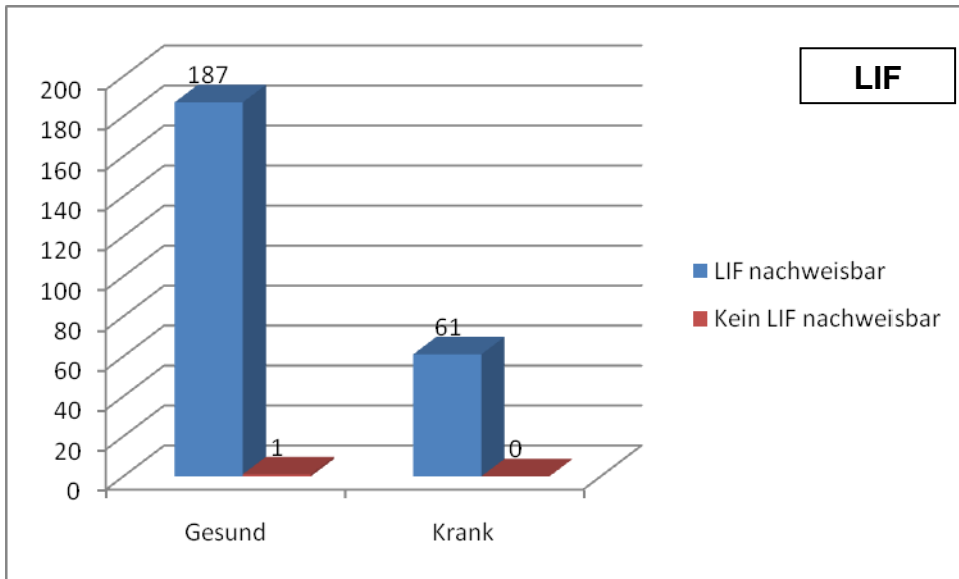


Abb. 24: LIF

	N	Mittelwert	Vertrauen (±)	Std.Fehler	Std.Abw.
Krank	61	1617.5056	404.9569995	202.44298	1581.1302
Gesund	188	1379.5022	250.9941584	127.23172	1744.5135

Tab. 39: Gruppenvergleich LIF

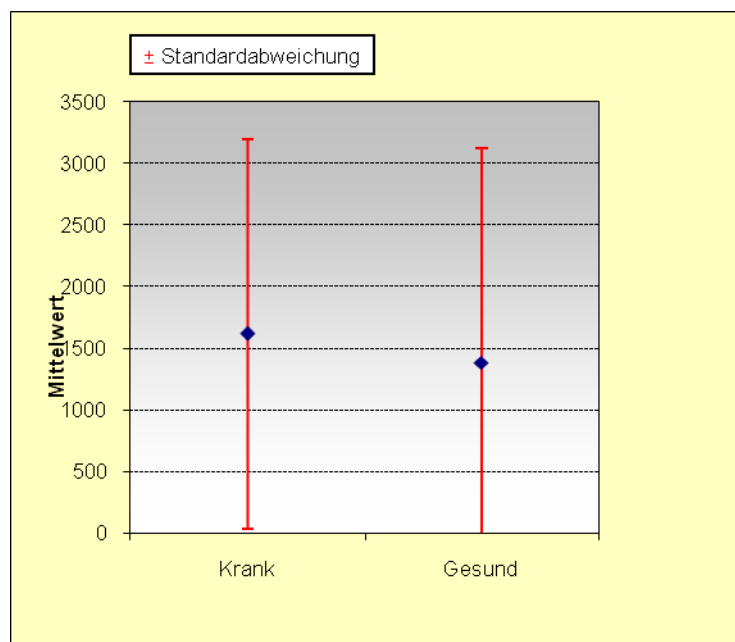


Abb. 25: Mittelwerte LIF

Dependent variable	LIF
Grouping variable	GROUP\$

Group	Count	Rank Sum
gesund	188	22193.500
krank	61	8931.500

Mann-Whitney U Test Statistic : 4427.500

p-value : 0.008

Chi-square Approximation : 7.145

df : 1

Tab. 40: Mann-Whitney-U-Test LIF

5. Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit war die quantitative Bestimmung der Interleukine IL-1 β , IL- 4, IL- 6, IL- 8 sowie des Leukämie Inhibierenden Faktors (LIF) durch die zuvor beschriebene Methode eines ELISA-Tests im Vaginalsekret von schwangeren Frauen, die in der Gruppe „krank“ eine mittels PCR nachgewiesene Vulvovaginalcandidose (Einschlusskriterium) hatten und in der Gruppe „gesund“ hinsichtlich einer Candidose PCR negativ waren. Weiter wurde das Risiko für das Auftreten einer VVC bei Vorliegen von Risikofaktoren betrachtet und ein Vergleich verschiedener Diagnostikmethoden für das Erkennen einer Candidose durchgeführt.

Die Betrachtung des auf einem Objektträger ausgestrichenen Vaginalsekretes im Nativpräparat unter dem Lichtmikroskop mit Bestimmung des Reinheitsgrades nach Weissenbacher et al. (110) und die mikroskopische Suche nach Pilzmyzel diente als erste Information für das Vorliegen einer Candidose. 51% der Patientinnen mit Reinheitsgrad 1 waren gesund und 45% krank. Im Gruppenvergleich ergab die Auswertung dieser diagnostischen Methode mit einem p-Wert von 0,173 keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen „krank“ und „gesund“. Wir fanden für den Reinheitsgrad eine Sensitivität von 54% und eine Spezifität von 52 %.

Somit deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die Bestimmung des Reinheitsgrades alleine zur Identifikation einer vorliegenden Vulvovaginalcandidose unzureichend ist. Diese Beobachtung korreliert gut mit den Ergebnissen von Weissenbacher et al. (110), der ebenfalls bei der Bestimmung des Reinheitsgrades, selbst bei Vorliegen eindeutiger klinischer Zeichen einer Vulvovaginalcandidose, einen Vorhersagewert mit der breiten Spanne von 30% bis 90% beschrieb.

Auch in der Studie von Abbott et al. 1995 (2) erwies sich die Lichtmikroskopie zur Diagnostizierung einer Candidose aufgrund einer hohen Anzahl von falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen als wenig sensitiv. Trotz einer klinisch manifesten Vulvovaginalcandidose konnten in der Studie von Abbott et al. weniger als 50% der mikroskopisch erhobenen Verdachtsdiagnosen in der Kultur bestätigt werden.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam die Arbeitsgruppe Ledger et al. (54) 1996, welche in ihrer Untersuchungsreihe eine deutlich höhere Anzahl an falsch positiven Candida Proben in den mikroskopischen Befunden erhielten als in der Kultur.

Müller et al. (69) beschreiben, dass bei beschwerdefreien Patientinnen mit vaginaler Hefepilzkolonisation die Sensitivität des Nativpräparates bei 5-40 %, bei Patientinnen mit Vaginalmykose bei 40 - 90 % liegt.

Jedoch richten sich viele niedergelassene Kollegen, Allgemeinmediziner wie auch Gynäkologen in der Entscheidung der einzuleitenden Therapie noch immer vorwiegend nach einem im Lichtmikroskop sichtbaren Befund, obwohl diese Methode im Vergleich zur kulturellen Anzucht und zur PCR (wie im nachfolgendem Text belegt) eine geringere Sensitivität und Spezifität zeigt (2, 73).

Mittels kultureller Anzucht isolierten wir Candida spp. in 18 von 61 PCR positiven Fällen. Pilzkulturen sind in der Gruppe der Gesunden aufgrund unserer Ein- und Ausschlusskriterien (PCR negativ) erwartungsgemäß immer negativ. Somit haben wir eine geschaffene Spezifität von 100%. Die Sensitivität liegt hingegen bei ca. 30%, welche zwar auf das Gesamtkollektiv zu übertragen ist, aber auch nur zeigt, dass die Kultur alleine ebenfalls nicht ausreichend ist, um mit hinreichender Genauigkeit eine Vulvovaginalcandidose zu diagnostizieren. Durch Kultivierung der Hefepilze auf Sabouraud-Agar[®] mit anschließender Differenzierung der Candida Spezies auf Chromagar[®] lässt sich, verglichen mit der Mikroskopie, laut Nyirjesy P et al. eine höhere Sensitivität für das Vorliegen einer Vulvovaginalcandidose erzielen (74).

Wir fanden hier in der Kultur sogar eine geringere Sensitivität als im Nativpräparat beim Reinheitsgrad, was den Ergebnissen von Abbott et al., Nyirjesy et al. und Ledger et al. widerspricht. (2, 55, 73). Die Ursache ist hier wahrscheinlich in der geringeren Fallzahl zu sehen oder wahrscheinlicher aufgrund unserer Ein- und Ausschlusskriterien. In der mikroskopischen Betrachtung des Reinheitsgrades ist die Güte des Ergebnisses auch von der Erfahrung des Untersuchers abhängig.

Der vom Pearson Chi-Quadrat Test gelieferte hochsignifikante p-Wert ist aufgrund der Gruppenzuordnung geschaffen und somit nicht relevant.

Bezüglich der Sensitivität und Spezifität verhält es sich beim Pilznachweis mittels PCR ebenfalls aufgrund der Gruppenzuordnung (PCR negativ = gesund) wie bei

der Kultur. Auch hier haben wir eine geschaffene Spezifität von 100%. Dem gegenüber steht eine auf das Kollektiv nicht übertragbare Sensitivität von 100%, welche auch aus den definierten Ein- und Ausschlusskriterien resultiert. Der p-Wert ist hier erwartungsgemäß hochsignifikant und nicht zu werten.

Um hier jedoch ein von der Gruppenzuordnung unabhängiges Ergebnis zu erhalten, wurde die PCR mit der Kultur verglichen und das Ergebnis statistisch bewertet.

Wir fanden, dass bei 43 von 61 Patientinnen in der Gruppe „krank“ die Kultur negativ war, obwohl in der PCR Candida-DNA nachgewiesen werden konnte. Dies entspricht in der Gruppe krank einem prozentualen Anteil von 70,5 %. Somit war die Kultur in Bezug auf den Pilznachweis bei nur 29,5% der Patientinnen erfolgreich.

Dieses Ergebnis korreliert gut mit der Arbeit von Giraldo et al. (38), die 2000 in einer Studie mit 95 Patientinnen Candida mittels PCR bei 28 Patienten nachweisen konnten, mittels Kultur jedoch nur bei 14 Patientinnen. Also 50% mehr Treffer als bei der Kultur.

Die in unserer Arbeit nachgewiesene höhere Sensitivität der PCR im Vergleich zur Kultur konnte in verschiedenen weiteren Studien bestätigt werden (16, 31, 70, 113) und die Studienlage ist hier sicherlich eindeutig, obwohl es auch gegenteilige Ergebnisse, wie die von Mardth et. al. von 2003 (58) gibt, welcher in einer Studie mit 73 Patientinnen bei 43,8% sowohl in der PCR als auch in der Kultur ein Candida positives Ergebnis hatte, 20,5% waren nur Kulturpositiv und bei 17,8% der Studienteilnehmer konnte nur die PCR ein positives Ergebnis liefern.

Im folgenden Teil der Diskussion beschäftigen wir uns mit Gruppeneigenschaften wie Anzahl der Schwangerschaften, Aborte, Vorhandensein von Risikofaktoren, Allergien und Nikotinabusus.

Um die Vergleichbarkeit der Gruppen zu prüfen, wurden Gruppeneigenschaften wie Alter oder Schwangerschaftswoche mit dem T-Test für unverbundene Stichproben hinsichtlich signifikanter Unterschiede zwischen Mess- und Kontrollgruppe geprüft. Der T-Test lieferte für das Alter einen p-Wert von 0,415 und für die Schwangerschaftswoche einen p-Wert von 0,650. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, somit sind die Gruppen statistisch gut vergleichbar.

Der Vergleich der Mittelwerte zeigte beim Alter 34,14 Jahre in der Gruppe gesund zu 33,61 Jahre in der Gruppe krank. Der Mittelwert der Schwangerschaftswoche betrug 27,42 Wochen in der Kontrollgruppe zu 28,00 Wochen in der Messgruppe. Der minimale Unterschied in den Mittelwerten ist wie oben gezeigt nicht signifikant. Bezüglich der Anzahl der Schwangerschaften lieferte uns der Person Chi-Quadrat Test einen p-Wert von 0,004 und somit im Gruppenvergleich einen signifikanten Unterschied. Zu bemerken ist allerdings, dass bei den Erstgravida 56% eine Vulvovaginalcandidose hatten, während sich dies nur bei 44% der Multigravida nachweisen lies. Dieser Unterschied ist wie oben gezeigt signifikant. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der Arbeit von Parveen et al. (79), welche bei 110 schwangeren Frauen eine erhöhte Rate an Vulvovaginalcandidosen in der Gruppe der Multigravida und in der Gruppe der Schwangeren mit Diabetes aufzeigten. Der Grund der Abweichung im Ergebnis ist hier sicherlich in unserer geringen Fallzahl und eventuell in der Subpopulation der Diabetes-Patientinnen bei Parveen et. al. zu sehen.

Hinsichtlich der Prädisposition für eine Vulvovaginalcandidose bei Patientinnen mit einem Abortgeschehen in der Vorgeschichte waren die beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (p-Wert von 2,263). Hellberg et al. (40) zeigten 1999 in einer Kohortenstudie mit 956 Frauen für die VVC eine Odds Ratio von 1,8. In Hellbergs Studie hatten 192 Patientinnen einen Abort in der Krankengeschichte, 104 Frauen wurden der Kontrollgruppe zugeordnet. Dies korreliert folglich mit unseren Ergebnissen. Allerdings konnte dieser Zusammenhang in der Studie von Frerich et al. 1977 nicht bestätigt werden (33). Von 243 schwangeren Frauen hatten 163 in dieser Studie eine Candidainfektion. Jedoch konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Aborten und einer Candidainfektion festgestellt werden. Im Weiteren betrachteten wir das Vorhandensein von Allergien, Risiken sowie Nikotinabusus hinsichtlich Ihrer Relevanz für eine VVC. Bezüglich des Zusammenhanges zwischen Allergien und einer Prädisposition für eine Vulvovaginalcandidose ermittelten wir einen p-Wert von 0,062 und somit keinen signifikanten Gruppenunterschied. Bei der Subpopulation der Schwangeren haben die Patientinnen also gleichermaßen häufig Allergien oder im Umkehrschluss haben die Candiapositiven nicht mehr Allergien. Moraes et al. zeigte 1998 (68) mit einem p-Wert von 0,0001 einen signifikanten Unterschied bei 95 Patientinnen mit allergischer Rhinitis. 71% der Patientinnen in der Messgruppe hatten eine

VVC. In der Kontrollgruppe hingegen nur 42%. Dies korreliert nicht mit unserem Ergebnis hinsichtlich der Relevanz des Risikofaktors Allergie. Wobei in der Arbeit von Moraes et al. (68) die für uns relevante Gruppe der Schwangeren nicht erwähnt wurde.

Im Folgenden betrachten wir das Vorhandensein von Risiken wie Morbus Crohn, Adipositas oder Diabetes mellitus. Hier fanden wir mit einem p-Wert von 0,009 einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Curran et al. (17) untersuchte bei gesunden Patientinnen im Vergleich zu Patientinnen mit Morbus Crohn die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten, *Candida albicans* abzutöten. Hierzu isolierte er neutrophile Granulozyten aus dem peripheren Blut von Gesunden und von Morbus Crohn Patienten, löste diese jeweils in einer Phosphat Puffer Lösung zu 5×10^6 Zellen pro ml auf, inkubierte sie jeweils zusammen mit *Candida albicans* für 30 Minuten respektive 60 Minuten bei 37°C. Er kam zu dem Ergebnis, dass gesunde Neutrophile bedeutend mehr *Candida* abtöteten als Neutrophile von Morbus Crohn Patienten. Nach 30 Minuten Inkubationszeit lag der p- Wert $< 0,0001$, nach 60 Minuten bei $p < 0,005$.

Daus et al. (19) gingen 1975 der Frage nach, welche Faktoren die Inzidenz und die Schwere einer *Candida* Infektion beeinflussen. Es wurden 92 schwangere und nicht schwangere Patientinnen randomisiert und die Daten bezüglich der Risikofaktoren für eine VVC ausgewertet. Ein Zusammenhang war zu sehen in den Kofaktoren Medikamentenabusus, Übergewicht, Schwangerschaft, der Einnahme von Antibiotika und Diabetes mellitus.

Das Ergebnis von Curran et al. und Daus et al. korreliert gut mit unseren Beobachtungen, dass das Vorhandensein von somatischen Erkrankungen, auch in der Subpopulation der Schwangeren, einen Einfluss auf die Entstehung einer Vulvovaginalcandidose hat.

A. Dürr stellte in seiner 2003 veröffentlichten Arbeit (22) fest, dass HIV infizierte Frauen mit einer bedeutend höheren Prävalenz und Inzidenz ($p < 0,01$) unter einer *Candida* Infektion litten, als immunkompetente Frauen. Es ergab sich im Gruppenvergleich kein Unterschied in der Schwere der *Candida* Infektion. Verglichen wurden 856 HIV infizierte Frauen mit 421 immunkompetenten Frauen. Dürr et al. beschrieben eine starke Assoziation der unabhängigen Faktoren Diabetes mellitus und Schwangerschaft mit dem Auftreten einer vulvovaginalen Candidose. Ob Schwangere mit Diabetes mellitus häufiger von einer

vulvovaginalen Candidose betroffen sind als Schwangere ohne Diabetes mellitus wurde in unserer Arbeit nicht explizit statistisch bewertet, da die Fallzahl der Patientinnen mit Diabetes mellitus isoliert oder in Kombination mit Hypertonie von insgesamt acht (drei in der Gruppe krank und fünf in der Gruppe gesund) zu gering ist, um hier eine statistisch signifikante Aussage treffen zu können. Ebenso wurde keine schwangere Patientin mit HIV untersucht, so dass wir in unserer Arbeit nur eine Aussage bezüglich der Gesamtheit des Vorhandenseins aller Risikofaktoren im Hinblick auf das Risiko für die Prädisposition für eine Vulvovaginalcandidose treffen können. Hier haben wir, wie bereits ausgeführt, einen signifikanten p-Wert und korrelieren somit gut mit den Ergebnissen von Dürr et al., dass das Vorhandensein von Faktoren, die eventuell immunsuppressiv wirken, eine VVC begünstigen. Auch die Arbeitsgruppe von Mazziotti, F. et al. 1997 (61) befasste sich in einer Studie mit 23 schwangeren Patientinnen in der Testgruppe und 23 schwangeren Patientinnen in der Kontrollgruppe mit der Fragestellung, ob ein Risikofaktor wie Diabetes Genitalinfektionen begünstigt. Die Diagnostik erfolgte mittels Kolposkopie und Zytologie. Seine Arbeitsgruppe konnte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen feststellen. Dies steht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen hinsichtlich der Risikofaktoren. Das Ergebnis von Mazzotti et al. basiert auf 23 jeweils in der Mess- und Kontrollgruppe untersuchten Patienten, eine Fallzahl, welche insgesamt als gering zu betrachten ist. Hier sind sicherlich aufgrund der geringen Gruppenstärke Ergebnisdifferenzen möglich.

Die Anzahl der Patientinnen in der Subpopulation der Schwangeren, die rauchen, ist erfahrungsgemäß sehr gering. Bei unseren Patientinnen rauchten insgesamt 11 von 249 Patientinnen. Darunter gehörten 3 der Gruppe der Gesunden und 8 der Gruppe der Kranken an. Trotz der geringen Fallzahl lieferte uns der Pearson-Chi-Quadrat Test einen hochsignifikanten Gruppenunterschied. Somit begünstigt das Rauchen in unserer Studie signifikant das Auftreten einer VVC.

Schumann et al. (93) zeigte 1998 im Vergleich von 871 HIV-seropositiven Frauen mit 439 HIV-seronegativen Frauen einen Zusammenhang zwischen Rauchen und der oralen Kolonisation von Candida. Allerdings konnte dieser Zusammenhang nicht für die Kolonisation in der vaginalen Schleimhaut nachgewiesen werden. Somit steht unser Ergebnis im Gegensatz zu dem Ergebnis der Arbeit von

Schumann et al.. Dies kann an der sehr geringen Fallzahl oder an der Subpopulation der Schwangeren liegen.

Im dritten Teil der Arbeit beschäftigten wir uns mit der quantitativen Bestimmung der pro- und antiinflammatorischen Interleukine IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 und des Leukämie inhibierenden Faktors LIF und analysierten den statistischen Unterschied zwischen der Candida positiven Gruppe und der Kontrollgruppe. Hierzu wurden die Mittelwerte verglichen und mittels Mann-Whitney-U Test hinsichtlich eines signifikanten Gruppenunterschiedes geprüft.

IL-1 β ist ein für die Steuerung der Frühphase der Entzündungsreaktion wichtiges Zytokin, da es eine Schlüsselfunktion in der Entwicklung der proinflammatorischen Kaskade hat. Es induziert die Synthese von IL-6, IL-8 und PGE₂ und inhibiert IL-4 (87, 104, 116).

Unser Ergebnis zeigte, dass sowohl in der Gruppe „gesund“ als auch in der Gruppe „krank“ IL-1 β im Scheidensekret nachzuweisen war, es wird also in der Schwangerschaft synthetisiert. In der PCR Candida positiven Gruppe wurde IL-1 β in 95,08% ausgeschüttet, in 4,92% nicht. In der Kontrollgruppe fanden wir in 77,13% IL-1 β und in 22,87% ließ sich kein IL-1 β nachweisen. Der Mittelwert in der kranken Gruppe betrug 42,66 pg/ml, in der gesunden Gruppe 25,81 pg/ml.

IL-1 β zeigte mit einem p-Wert von 0,000 einen signifikanten Gruppenunterschied bezüglich der Ausschüttungskonzentration. Es ist somit davon auszugehen, dass eine Candida Infektion in der Gruppe der Schwangeren eine zusätzliche IL-1 β Synthese induziert, somit die Konzentration bei Infektion erhöht ist und die proinflammatorische Kaskade aktiviert wird.

In einer von Foster et al. (32) durchgeführten Studie wurden vulvovestibuläre Fibroblasten in vitro mit verschiedenen eine Vestibulitis verursachenden Faktoren u.a. Candida albicans zusammengebracht. Ergebnis der Studie war, dass Fibroblasten, die in vitro mit Candida albicans beimpft wurden, eine signifikant höhere Synthese von proinflammatorischen Zytokinen u.a. IL-1 β aufwiesen als Fibroblasten ohne Zusatz von Candida albicans (Kontrolle). Dies korreliert gut mit unserem in vivo Ergebnis bezüglich des IL-1 β .

Ebenso konnten Zaga-Clavellir et al. 2006 die vermehrte Ausschüttung von Interleukin-1 β , Prostaglandin E und den Metalloproteinasen 2 und 9 bei der Inkubation von Chorioamnion-Membranen mit Candida albicans feststellen. Tumornekrosefaktor α und Interleukin-6 blieben unverändert (121). Diese

Beobachtung bestätigt sowohl unser Ergebnis hinsichtlich der Induktion der IL-1 β Synthese durch Candida-Hefen als auch unser im weiteren Verlauf dieses Kapitels diskutiertes IL-6 Ergebnis, welches keinen signifikanten Unterschied in den Konzentrationsmittelwerten zwischen unseren Gruppen erbrachte. Auch kann das Ergebnis von Foster et al. und Zaga-Clavellir daher auf Vaginalepithelien bei schwangeren Frauen übertragen werden.

Interleukin-4 agiert (wie auch IL-10 und IL-11) als anti-inflammatorisches Zytokin, indem es überschießende Entzündungsreaktionen verhindert und somit wichtig für die Homöostase des Immunsystems ist. Es ist ein Gegenspieler von Interleukin-1 β . Außerdem stimuliert IL-4 die B-Zellaktivierung und die IgE-Produktion. Weiter kann IL-4 alle Reaktionen der Th-2 Immunantwort auslösen, ohne Hilfe anderer Zytokinen (28, 41).

Wir fanden Interleukin-4 in 85,11% der Proben der Gruppe „gesund“ und in 93,44% der Proben der Gruppe „krank“. In 14,89% der Kontrolle und in 6,56% der Messgruppe war kein IL-4 nachzuweisen. Der Mittelwert der Konzentration von IL-4 lag bei 10,03 pg/ml (Kontrolle) verglichen mit 12,70 pg/ml (Messgruppe), jedoch war bei einem p-Wert von 0,103 kein signifikanter Unterschied zwischen Candida positiven und Candida negativen Schwangeren festzustellen. Insgesamt sind die Konzentrationen gering. Da IL-1 β das IL-4 inhibiert (87, 104, 116), könnte hier ein Zusammenhang bestehen.

Dieses Ergebnis korreliert mit den Erkenntnissen von Shimaoka et al., welche bei Schwangeren ein im Vergleich zu nichtschwangeren Frauen niedrigeres Serum-IL-4 messen konnten (95). Diese Tatsache lässt vermuten, dass sich diese Erkenntnis aus dem Blutserum auch auf das Vaginalsekret übertragen lässt. Hier müsste jedoch ein Gruppenvergleich zwischen Schwangeren und Nichtschwangeren hinsichtlich des IL-4 durchgeführt werden, was nicht Gegenstand dieser Arbeit war.

Roilides et al. und Tascini et al. fanden einen signifikanten Zusammenhang mit $p < 0.05$ zwischen einem hohen Interleukin-4 Level und einer verminderten Aktivität von Phagozyten gegenüber Candida. IL-4 supprimiert also die Immunabwehr gegen eine Candidainfektion (85, 105). Hierzu können wir für die Subpopulation der schwangeren Frauen keine Aussage treffen, da wir weder ein hohes IL-4 noch einen Gruppenunterschied feststellen konnten. Betrachten wir jedoch unsere Ergebnisse bezüglich IL-4, so müssen wir vermuten, dass ein niedriges

Interleukin-4 im Umkehrschluss keine protektive Wirkung gegen eine Candidose hat.

Ein weiteres interessantes Ergebnis hat Ouyang et al. an einem Mausvagina - Model erlangt. Seine Gruppe untersuchte die IL-2, IL-4, IL-10 und TGF-beta1 Level an mit und ohne Estradiol vorbehandelten Mäusen, welche mit Candida infiziert worden waren und einer Kontrollgruppe ohne Infizierung mit Candida. Bezüglich des Interleukin-4 konnte festgestellt werden, dass die IL-4 Werte in der Gruppe der Estradiolmäuse signifikant höher waren als in den beiden anderen Gruppen (77). Hieraus kann man einerseits folgern, dass es keinen Unterschied zwischen den Nicht-Estradiolmäusen und der Kontrollgruppe gab, also unser Ergebnis bestätigt wurde und andererseits, dass ein hoher Östrogenspiegel, IL-4 induziert. Dies jedoch können wir nicht bestätigen, da in der Schwangerschaft der Östrogenspiegel bekanntlich höher ist.

Das proinflammatorische Th-2 Zytokin Interleukin-6 aktiviert Akute Phase Proteine und stimuliert Lymphozyten. Eine Rolle bei der Candida Immunantwort wird diskutiert (47).

Wir fanden in der Messgruppe in 90% der Proben IL-6, in 10% ließ es sich nicht nachweisen. In der Kontrollgruppe war das Verhältnis 83,51% (vorhanden) zu 16,49% (nicht vorhanden). Der Mittelwert der Konzentration von IL-6 lag in der Gruppe „krank“ bei 62,04 pg/ml und in der Gruppe „gesund“ bei 48,58 pg/ml. Der durch den Mann-Whitney U Test getestete Gruppenunterschied war jedoch mit einem p-Wert von 0,255 nicht signifikant, so dass wir hier eine Beteiligung von Interleukin-6 an einer Immunantwort bei Candidainfektionen der Vagina für schwangere Patientinnen nicht sehen, was im Widerspruch steht zu einer Induktion von IL-6 durch IL-1 β , welches bei uns in der Messgruppe signifikant erhöht war. (87, 104, 116). Der Grund hierfür könnte in der Fallzahl, an möglichen Inhibitoren, an einer alternativen Aktivierung einer Immunantwort oder an der Schwangerschaftswoche liegen. Dies könnte Gegenstand weiterer Studien sein.

Schaller M et al. zeigten hingegen auf, dass humane vaginale Epithelzellen, die in vitro mit einem Candida albicans Wildstamm in Kontakt gebracht wurden, im Vergleich zu nicht infizierten vaginalen Epithelzellen eine höhere Reizantwort in Form einer Zytokin-Ausschüttung, u. a. IL- 1 β , IL-6 und IL-8 aufwiesen (90).

Auch Steele et al. (102) und Villar et al. (108) bestätigten durch Ihre Studien, dass vaginale Epithelzellen auf den Kontakt mit *Candida albicans* mit einer Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen reagieren. Villar et al. beschrieben eine höhere proinflammatorische Antwort bei invasiver Infektion. Dies steht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen und könnte an der Subpopulation der Schwangeren, an der Fallzahl oder daran liegen, dass wir in vivo gemessen haben. Somit könnten die in vitro Ergebnisse eventuell nicht auf die in vivo Situation übertragen werden. Dieses Ergebnis wurde jedoch auch durch Steele et al. bestätigt, welche an oralen und vaginalen Lavage ebenfalls bei Patienten mit Candidose keine Interleukin-6 Induktion feststellen konnten (103). Hier müsste jedoch in weiteren Studien näher differenziert werden.

IL-8, ein weiterer proinflammatorischer Mediator und Aktivator der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten bei Entzündungsreaktionen (107) war mit einem p-Wert von 0,631 nicht signifikant unterschiedlich im Gruppenvergleich. Der Vergleich der Mittelwerte der Konzentration von IL-8 zeigt 393,40 pg/ml in der Messgruppe und 416,90 pg/ml in der Kontrollgruppe. 100% der Kranken schütteten es auch aus, bei den Gesunden hinsichtlich einer VVC war das Verhältnis 94,15 (nachweisbar) zu 5,85%. Somit konnten wir keinen Zusammenhang zwischen einer Vulvovaginalcandidose und der Induktion von IL-8 als Immunreaktion gegen *Candida* feststellen.

Spear GT et al. (101) bestätigte in seiner Arbeit das Vorhandensein einer höheren Konzentration von IL-8 in Proben von *Candida* positiven Patientinnen im Vergleich zu *Candida* negativen Patientinnen. In einer weiteren Studie von Pivarcsi A et al. (81) und wie oben bereits beschrieben, von Schaller et al. (89), wurde ein signifikanter Unterschied von $p < 0,05$ hinsichtlich der Ausschüttung von IL-8 herausgearbeitet, d.h. vaginale Epithelzellen, die mit *Candida* in Kontakt waren, produzierten wesentlich mehr IL-8, als solche, die frei von *Candida* waren. Dies widerspricht unserem Ergebnis für Interleukin-8, bei welchem wir keine signifikante IL-8 Induktionen finden konnten. So könnte man vermuten, dass das Ergebnis der aufgeführten Studien sich nicht ohne Weiteres auf die Subpopulation der Schwangeren übertragen lässt und hier keine Immunantwort durch IL-8 aktiviert wird. Dies könnte an inhibierenden Mediatoren in der Schwangerschaft liegen und müsste in weiteren Studien validiert werden.

Abschließend haben wir den Leukämie inhibierenden Faktor (LIF) bestimmt. Wie bereits beschrieben, induzieren proinflammatorische Agenzien wie Lipopolysaccharide, Interleukin-1, Interleukin-17 und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) die LIF-Expression und antiinflammatorische Agenzien wie Glukokortikoide, Interleukin-4 und Interleukin-13 inhibieren LIF (5). Donders et al. verglich unter Anderen auch LIF zwischen gesunden schwangeren und nicht-schwangeren Patientinnen und kam zu dem Ergebnis, dass bezüglich LIF zwischen den Gruppen, bis auf einen kurzen Zeitraum zu Beginn der Schwangerschaft, wo LIF niedriger war, kein Unterschied festzustellen war (21). LIF wurde zu 100% in der Gruppe „krank“ sezerniert und zu 99,47% in der Kontrollgruppe. Hier konnte nur in einem Fall (0,53%) kein LIF nachgewiesen werden. Der Mittelwert der Konzentration lag in der Messgruppe bei 1617,51 pg/ml und in der Kontrolle bei 1617,51 pg/ml. Die statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U Test lieferte einen signifikanten p-Wert von 0,008. Ein Ergebnis, dass eine enge Korrelation der LIF Produktion mit dem Stimulus Candida vermuten lässt. Eine verstärkte Produktion von LIF durch T-Lymphozyten nach Stimulation durch ein Antigen, darunter Candida albicans, beobachtete auch Rasanen L. 1979 (82) in einer Studie, in der Lymphozyten des humanen peripheren Blutes durch Rosettenbildung mittels Schaferthozyten und anschließender Zentrifugation in T- und B-Zellen aufgeteilt wurden und anschließend mit Candida stimuliert wurden. Allerdings war eine signifikante LIF Synthese nur in Anwesenheit von Monozyten zu verzeichnen. Dies korreliert gut mit unserem Ergebnis bezüglich LIF. Auch Kim et al. konnte 2005 an mit Candida inkubierten Monozyten, die frisch aus peripherem Blut von fünf Probanden gewonnen wurden, eine proinflammatorische Immunantwort durch Anstieg von TNF- α , IL-1 (α und β), IL-6, den Kolonie Stimulationsfaktoren (Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktor und Granulozyten Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktor) und auch LIF feststellen (49). Anhand unseres Ergebnisses bezüglich LIF lässt sich somit die Aussage treffen, dass auch in der Gruppe der Schwangeren mit Vulvovaginalcandidose LIF erhöht ist und somit die Candidainfektion einen Anstieg von proinflammatorischem LIF induziert.

6. Zusammenfassung

Infektionen mit Hefepilzen der Gattung *Candida* sind in allen Fachgebieten der Medizin häufig. Im Fachgebiet der Gynäkologie und Geburtshilfe ist die chronisch rezidivierende Vulvovaginalcandidose für die betroffenen Patientinnen meist mit hohem Leidensdruck verbunden und hat daher in Diagnostik und Therapie einen hohen Stellenwert.

In der Schwangerschaft begünstigt zum Einen ein verändertes Scheidenmilieu eine Vulvovaginalcandidose, zum Anderen der in der Schwangerschaft erhöhte Östrogenspiegel, da *Candida albicans* Östrogenrezeptoren besitzt (6, 20, 65).

Das Risiko der Infektion des Neugeborenen mit Hefepilzen unter der vaginalen Geburt liegt bei laut Blaschke-Hellmessen et al. und Hoppe et al. ca. 80%. Infizierte Neugeborene entwickeln in ca. 90% der Fälle im 1. Lebensjahr eine Mykose mit einem Häufigkeitsgipfel von 10- 15 % in der 2. - 4. Lebenswoche (11, 42, 43).

Die alleinige Durchführung von Anamnese und makroskopischer Evaluierung mittels Spekulumuntersuchung kann die Ätiologie der vaginalen Infektion nicht bestimmen. Diese Art der Untersuchung führt häufig zu Falschdiagnosen und daraus resultierend zu falschen Therapien.

Die exakten Abläufe der Immunantwort auf eine vaginale Infektion mit *Candida* spp. sind bis dato nicht ausreichend erforscht. In der vorliegenden Arbeit werden die Zytokine Interleukin -1 β , -4, -6, -8 sowie der Leukämie inhibierende Faktor LIF als Modulatoren der Immunantwort hinsichtlich Ihrer Bedeutung beim Vorliegen einer Vulvovaginalcandidose quantitativ betrachtet. Im Weiteren wurde in vorliegender Arbeit untersucht, welche diagnostische Methode (Reinheitsgrad, kulturelle Anzüchtung, PCR), den besten Vorhersagewert für eine in der Schwangerschaft zu behandelnde Vulvovaginalcandidose liefert.

Folgend wurden Nebenfaktoren wie Allergie, Risiken, Aborte, Anzahl der Schwangerschaften oder Nikotinabusus hinsichtlich Ihres Risikopotentials, in der Schwangerschaft eine Vulvovaginalcandidose zu entwickeln, bewertet.

Methodisch wurde von jeder Patientin eine PCR, eine mikroskopische Betrachtung des Reinheitsgrades, eine Kultur (wenn *Candida* positiv inklusive Differenzierung) und ein Interleukin-ELISA angefertigt, sowie eine ausführliche Anamnese erhoben.

Es wurden schwangere Patientinnen rekrutiert, die zur Schwangerenvorsorge in die Sprechstunde kamen. Insgesamt wurden 249 Patientinnen in die Studie eingeschlossen. 61 Candida-PCR-Positive wurden in die Gruppe „krank“ eingeschlossen, 188 Patientinnen waren Candida PCR-Negativ und wurden der Kontrollgruppe „gesund“ zugeordnet. Beide Gruppen waren hinsichtlich des Alters und der Schwangerschaftswoche unter Verwendung des T-Testes gut vergleichbar ($p=0,416$ bzw. $p=0,650$).

Betrachtet man die Anzahl der Schwangerschaften, Risiken wie Diabetes mellitus oder andere Erkrankungen, die während der Schwangerschaft vorlagen oder sich entwickelten, und den Nikotinabusus, so fanden wir hier signifikante p- Werte bezüglich des Auftretens einer Vulvovaginalcandidose in der Schwangerschaft. ($p=0,04$, $p=0,09$, $p=0,000$).

Nicht signifikant waren hingegen das Vorliegen von Aborten oder Allergien in der Vorgeschichte ($p=0,263$ bzw. $p=0,062$).

Die Analyse der Diagnosemethoden zur Erkennung einer Vulvovaginalcandidose in der Schwangerschaft, lieferte bei der mikroskopischen Betrachtung des Reinheitsgrades keine Signifikanz ($p=0,173$).

Erwartungsgemäß gab es aufgrund unserer Gruppenzuordnungskriterien (PCR) keine falsch positiven Patientinnen in der Kultur, da in einer PCR negativen Probe eine positive Kultur sehr unwahrscheinlich ist. Die Sensitivität lag bei ca. 30% und die Spezifität aufgrund unserer Einschlusskriterien in der Gruppe „gesund“ bei geschaffenen 100%. Ebenso ist der hochsignifikante p-Wert von 0,000 nicht zu werten. Zu werten und auf das Kollektiv zu übertragen ist jedoch die geringe Sensitivität der Kultur von 30%. Ebenso war die PCR unser Gruppenzuordnungsmerkmal, somit sind die statistischen Ergebnisse gemäß unserer Einschlusskriterien geschaffen und nicht zu werten. Interessant aber ist der statistische Vergleich zwischen PCR und Kultur. Denn betrachtet man in der Gruppe der Kranken (PCR Positiv gemäß den Einschlusskriterien) die Kultur und die PCR, so sieht man, dass bei 43 Patientinnen die Kultur eine Candidose nicht nachweisen konnte.

Der Pearson-Chi-Quadrat Test liefert mit einem p-Wert von 0,000 das signifikante Ergebnis, dass die PCR im Vergleich zur Kultur als Diagnosetool eines Pilzbefalles genauer ist.

Die quantitative Bestimmung der von uns untersuchten Interleukine und LIF lieferte bei Interleukin 1- β und bei LIF einen signifikanten Gruppenunterschied ($p=0,000$ und $p=0,008$), nicht jedoch bei IL-4, IL-6 und IL-8 (Mann-Whitney U Test: $p=0,103$, $p=0,255$ und $p=0,631$), so dass zusammenfassend laut unseren Ergebnissen in der Subpopulation der Schwangeren eine Infektion mit *Candida* spp. eine Immunantwort hinsichtlich der Interleukine in Form der Ausschüttung von Interleukin 1- β und LIF induziert wird.

Ob sich hieraus die Option einer medikamentösen Inhibition dieser Interleukine als symptomatische Therapieoption zur Linderung des Leidensdruckes bei Patientinnen mit Vulvovaginalcandidose ergeben könnte, muss sicherlich noch weiter erforscht werden. Hier muss natürlich der Aspekt der Risikoabwägung bei Schwangeren unter medikamentöser Therapie hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung des ungeborenen Kindes berücksichtigt werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Rote Liste 2008: Arzneimittelverzeichnis für Deutschland. Frankfurt/Main: Rote Liste® Service GmbH, 2008.
2. Abbott J. Clinical and microscopic diagnosis of vaginal yeast infection: a prospective analysis. *Ann.Emerg.Med.* 1995;25:587-91.
3. al-Rawi N, Kavanagh K. Characterisation of yeasts implicated in vulvovaginal candidosis in Irish women. *Br.J.Biomed.Sci.* 1999;56:99-104.
4. Altamura M et al. Immune responses to fungal infections and therapeutic implications. *Curr.Drug Targets.Immune.Endocr.Metabol.Disord.* 2001;1:189-97.
5. Auernhammer CJ, Melmed S. Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocr.Rev.* 2000;21:313-45.
6. Barousse MM et al. Growth inhibition of *Candida albicans* by human vaginal epithelial cells. *J.Infect.Dis.* 2001;184:1489-93.
7. Barousse MM et al. Vaginal yeast colonisation, prevalence of vaginitis, and associated local immunity in adolescents. *Sex Transm.Infect.* 2004;80:48-53.
8. Battaglia F et al. [Vulvovaginal candidiasis: a therapeutic approach]. *Minerva Ginecol.* 2005;57:131-9.
9. Bein M, Schaller M, Korting HC. The secreted aspartic proteinases as a new target in the therapy of candidiasis. *Curr.Drug Targets.* 2002;3:351-7.
10. Bernhard H. *Candida* im Ökosystem des Orintestinaltraktes. *Mycoses* 1996;39:44-7.
11. Blaschke-Hellmessen R. [Vertical transmission of *Candida* and its consequences]. *Mycoses* 1998;41 Suppl 2:31-6.
12. Brown MA, Metcalf D, Gough NM. Leukaemia inhibitory factor and interleukin 6 are expressed at very low levels in the normal adult mouse and are induced by inflammation. *Cytokine* 1994;6:300-9.
13. Buchta V, Spacek J. [Microbiological findings in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis in the Hradec Kralove Faculty Hospital 1995-2002]. *Ceska.Gynekol.* 2004;69:7-14.
14. Cenci E et al. Induction of protective Th1 responses to *Candida albicans* by antifungal therapy alone or in combination with an interleukin-4 antagonist. *J.Chemother.* 1998;10:160-3.
15. Cha R, Sobel JD. Fluconazole for the treatment of candidiasis: 15 years experience. *Expert.Rev.Anti.Infect.Ther.* 2004;2:357-66.

16. Chryssanthou E et al. Detection of *Candida albicans* DNA in serum by polymerase chain reaction. *Scand.J.Infect Dis* 1994;26:479-85.
17. Curran FT et al. Candidacidal activity of Crohn's disease neutrophils. *Gut* 1991;32:55-60.
18. Dan M et al. Vaginitis in a gynecologic practice in Israel: causes and risk factors. *Isr.Med.Assoc.J.* 2003;5:629-32.
19. Daus AD, Hafez ES. *Candida albicans* in women. *Nurs.Res.* 1975;24:430-3.
20. Dennerstein GJ, Ellis DH. Oestrogen, glycogen and vaginal candidiasis. *Aust.N.Z.J.Obstet Gynaecol.* 2001;41:326-8.
21. Donders GG et al. Vaginal cytokines in normal pregnancy. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2003;189:1433-8.
22. Duerr A et al. Incident and persistent vulvovaginal candidiasis among human immunodeficiency virus-infected women: Risk factors and severity. *Obstet.Gynecol.* 2003;101:548-56.
23. Dukovski A. [The treatment of vaginal candidiasis during pregnancy with a single dose of clotrimazole]. *Akush.Ginekol.(Sofia)* 1996;35:46-8.
24. Dukovski A, Kolarov G. [The possibilities for treating vaginal candidiasis with a single dose of clotrimazole 500 mg]. *Akush.Ginekol.(Sofia)* 1995;34:69-71.
25. Eckert LO et al. Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm. *Obstet.Gynecol.* 1998;92:757-65.
26. Ellepola AN, Samaranayake LP. The in vitro post-antifungal effect of nystatin on *Candida* species of oral origin. *J.Oral Pathol.Med.* 1999;28:112-6.
27. Ernest JM. Topical antifungal agents. *Obstet.Gynecol.Clin.North Am.* 1992;19:587-607.
28. Fallon PG et al. IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. *Immunity.* 2002;17:7-17.
29. Fidel PL, Jr. et al. Vaginal-associated immunity in women with recurrent vulvovaginal candidiasis: evidence for vaginal Th1-type responses following intravaginal challenge with *Candida* antigen. *J.Infect Dis* 1997;176:728-39.
30. Fidel PL, Jr., Lynch ME, Sobel JD. *Candida*-specific Th1-type responsiveness in mice with experimental vaginal candidiasis. *Infect.Immun.* 1993;61:4202-7.
31. Flahaut M et al. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. *J.Clin.Microbiol.* 1998;36:395-401.

32. Foster DC et al. Enhanced synthesis of proinflammatory cytokines by vulvar vestibular fibroblasts: implications for vulvar vestibulitis. *Am.J.Obstet Gynecol* 2007;196:346-8.
33. Frerich W, Gad A. The frequency of *Candida* infections in pregnancy and their treatment with clotrimazole. *Curr.Med.Res.Opin.* 1977;4:640-4.
34. Friese K, Mendling W. Therapie der vaginalen Mykosen - oral vs. lokal. *Gynäkologie* 1996;29:221-8.
35. Friese K, Neumann G, Siebert J. Topical antiseptics as an alternative in the treatment of acute vulvovaginal candidosis. *Arch.Gynecol.Obstet.* 2003;268:194-7.
36. Garcia HM et al. [Prevalence of vaginal candidiasis in pregnant women. Identification of yeasts and susceptibility to antifungal agents]. *Rev.Argent Microbiol.* 2006;38:9-12.
37. Gearing DP et al. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J* 1987;6:3995-4002.
38. Giraldo P et al. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet.Gynecol.* 2000;95:413-6.
39. Gough NM et al. Molecular biology of the leukaemia inhibitory factor gene. *Ciba Found.Symp.* 1992;167:24-38.
40. Hellberg D, Mogilevkina I, Mardh PA. Sexually transmitted diseases and gynecologic symptoms and signs in women with a history of induced abortion. *Sex Transm.Dis.* 1999;26:197-200.
41. Holter W et al. Regulation of interleukin-4 production in human mononuclear cells. *Eur J Immunol.* 1992;22:2765-7.
42. Hoppe JE. Treatment of oropharyngeal candidiasis and candidal diaper dermatitis in neonates and infants: review and reappraisal. *Pediatr.Infect Dis J.* 1997;16:885-94.
43. Hoppe JE. Treatment of oropharyngeal candidiasis in immunocompetent infants: a randomized multicenter study of miconazole gel vs. nystatin suspension. The Antifungals Study Group. *Pediatr.Infect Dis J.* 1997;16:288-93.
44. Hube B et al. [What functions do six different genes for secretory proteinases have in *Candida albicans*?]. *Mycoses* 1998;41 Suppl 1:47-50.
45. Ibelgaufts H. *Lexikon Zytokine.* München: Medikon Verlag, 1992.
46. Johnson A. *Immunologie auf 70 Seiten.* Stuttgart: Thieme Verlag, 2001.

47. Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol.* 2005;175:3463-8.
48. Jung EG, Moll I. *Dermatologie.* Stuttgart: Thieme Verlag, 2003.
49. Kim HS et al. Expression of genes encoding innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Candida albicans*. *Infect Immun.* 2005;73:3714-24.
50. King RD, Lee JC, Morris AL. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infect.Immun.* 1980;27:667-74.
51. Kirkamm R. *Fachbroschüre GanzImmun 0021.* Mainz: GANZIMMUN Labor für funktionelle Medizin AG, 2008.
52. Kozłowska EA, Nuber D. *Leitfaden der praktischen Mykologie.* Berlin - Wien: Blackwell Wiss. - Verlag, 1996.
53. Kunzelmann V et al. [Prerequisites for effective therapy of chronic recurrent vaginal candidiasis]. *Mycoses* 1996;39 Suppl 1:65-72.
54. Ledger WJ et al. Vulvar vestibulitis: A complex clinical entity. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1996;284-92.
55. Ledger WJ et al. Vulvar vestibulitis: A complex clinical entity. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1996;284-92.
56. Linhares LM et al. Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for *Candida* species by culture. *Infect.Dis.Obstet.Gynecol.* 2001;9:221-5.
57. Maccato ML, Kaufman RH. Fungal vulvovaginitis. *Curr.Opin.Obstet.Gynecol.* 1991;3:849-52.
58. Mardh PA et al. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis--a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. *Int.J.STD AIDS* 2002;13:522-39.
59. Margariti PA et al. [Mycotic vulvovaginitis]. *Recenti Prog.Med.* 1997;88:479-84.
60. Mazneikova V. [Vaginal candidiasis--treatment protocols using miconazole and fluconazole]. *Akush.Ginekol.(Sofia)* 2003;42 Suppl 2:30-4.
61. Mazziotti F et al. Diabetes and pregnancy: prophylaxis of genital infections. *Ann.Ist.Super.Sanita* 1997;33:343-5.
62. Mendling W. [Vulvovaginal mycoses]. *Z.Arztl.Fortbild.Qualitatssich.* 1998;92:175-9.
63. Mendling W, Koldovsky U. Investigations by cell-mediated immunologic tests and therapeutic trials with thymopentin in vaginal mycoses. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1996;4:225-31.

64. Mendling W, Seebacher C. AWMF Leitlinie Vulvovaginalcandidose. 2006.
65. Mendling W, Spitzbart H. Empfehlungen zur antimykotischen Therapie der vaginalen Hefepilz- Kolonisation von Schwangeren zur Verhütung von Kandidamykosen beim Neugeborenen. 2006.
66. Merkus JM. Treatment of vaginal candidiasis: orally or vaginally? *J.Am.Acad.Dermatol.* 1990;23:568-72.
67. Metzner G, Weissenbacher E. Candidainfektionen des weiblichen Genitaltraktes. München: Medifact publishing, 1999.
68. Moraes PS. Recurrent vaginal candidiasis and allergic rhinitis: a common association. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 1998;81:165-9.
69. Mueller J, Nold B. Quantitative Aspekte der vaginalen Mykoflora und ihre Beziehungen zur klinischen Symptomatik bei Kolpitis-Patientinnen. Seeliger HPR (Hrsg): *Gyno-Travogen-Monographie.* Amsterdam: 1981:21-30.
70. Muramatsu H et al. [Detection of *Candida albicans* by PCR]. *Rinsho Byori* 1994;42:961-5.
71. Nielsen K, Heitmann J. Sex and virulence of human pathogenic fungi. *Adv.Genet.* 2007;57:143-73.
72. Nikolov A et al. [Treatment in cases of recurrent vaginal candida infection during pregnancy]. *Akush.Ginekol.(Sofia)* 2007;46:23-6.
73. Nyirjesy P, Alexander AB, Weitz MV. Vaginal *Candida parapsilosis*: pathogen or bystander? *Infect.Dis.Obstet.Gynecol.* 2005;13:37-41.
74. Nyirjesy P et al. Chronic fungal vaginitis: the value of cultures. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1995;173:820-3.
75. Odds FC. Pathogenesis of *Candida* infections. *J.Am.Acad.Dermatol.* 1994;31:S2-S5.
76. Oethinger M. *Kurzlehrbuch Mikrobiologie und Immunologie.* Jena: Urban & Schwarzenberg Verlag, 2000.
77. Ouyang W et al. Local Th1/Th2 cytokine expression in experimental murine vaginal candidiasis. *J Huazhong.Univ Sci.Technolog.Med.Sci.* 2008;28:352-5.
78. Overcoming *Candida* Web Page. *Candida Pictures.* 2008.
Ref Type: Internet Communication
79. Parveen N et al. Frequency of vaginal candidiasis in pregnant women attending routine antenatal clinic. *J.Coll.Physicians Surg.Pak.* 2008;18:154-7.
80. Peer AK et al. Vaginal yeast infections in diabetic women. *S.Afr.Med.J.* 1993;83:727-9.

81. Pivarcsi A et al. Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells. *Microbes.Infect* 2005;7:1117-27.
82. Rasanen L. Cellular co-operation in the production of human leucocyte inhibitory factor by lymphocyte subpopulations stimulated with antigens and allogeneic cells. *Immunology* 1979;37:715-21.
83. Reed BD, Eyster A. Vaginal infections: diagnosis and management. *Am.Fam.Physician* 1993;47:1805-18.
84. Ringdahl EN. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Mo.Med.* 2006;103:165-8.
85. Roilides E et al. Interleukin-4 suppresses antifungal activity of human mononuclear phagocytes against *Candida albicans* in association with decreased uptake of blastoconidia. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 1997;19:169-80.
86. Roitt IM. Leitfaden der Immunologie. Blackwell Wissenschafts-Verlag, 2000.
87. Sandborg CI et al. IL-4 expression in human T cells is selectively inhibited by IL-1 alpha and IL-1 beta. *J.Immunol.* 1995;155:5206-12.
88. Saporiti AM et al. [Vaginal candidiasis: etiology and sensitivity profile to antifungal agents in clinical use]. *Rev.Argent Microbiol.* 2001;33:217-22.
89. Schaller M et al. *Candida albicans*-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis. *Infect.Immun.* 2005;73:2758-65.
90. Schaller M et al. *Candida albicans*-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis. *Infect Immun.* 2005;73:2758-65.
91. Schauer F, Hanschke R. [Taxonomy and ecology of the genus *Candida*]. *Mycoses* 1999;42 Suppl 1:12-21.
92. Schmidt-Matthiesen W. Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart, New York: 2004.
93. Schuman P et al. Mucosal candidal colonization and candidiasis in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. HIV Epidemiology Research Study (HERS) Group. *Clin.Infect.Dis.* 1998;27:1161-7.
94. Schwiertz A et al. Throwing the dice for the diagnosis of vaginal complaints? *Ann.Clin.Microbiol.Antimicrob.* 2006;5:4.
95. Shimaoka Y et al. Changes in cytokine production during and after normal pregnancy. *Am.J Reprod.Immunol.* 2000;44:143-7.

96. Sobel JD et al. Single oral dose fluconazole compared with conventional clotrimazole topical therapy of Candida vaginitis. Fluconazole Vaginitis Study Group. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1995;172:1263-8.
97. Sobel JD et al. Treatment of vaginitis caused by Candida glabrata: use of topical boric acid and flucytosine. *Am.J.Obstet Gynecol* 2003;189:1297-300.
98. Sobel JD et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1998;178:203-11.
99. Sobel JD et al. Adherence of Candida albicans to human vaginal and buccal epithelial cells. *J.Infect.Dis.* 1981;143:76-82.
100. Sojakova M et al. Fluconazole and itraconazole susceptibility of vaginal yeast isolates from Slovakia. *Mycopathologia* 2004;157:163-9.
101. Spear GT et al. Vaginal IL-8 levels are positively associated with Candida albicans and inversely with lactobacilli in HIV-infected women. *J.Reprod.Immunol.* 2008;78:76-9.
102. Steele C, Fidel PL, Jr. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to Candida albicans. *Infect Immun.* 2002;70:577-83.
103. Steele C, Fidel PL, Jr. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to Candida albicans. *Infect.Immun.* 2002;70:577-83.
104. Tanaka Y et al. Interleukin-1beta and interleukin-8 in cervicovaginal fluid during pregnancy. *Am.J.Obstet Gynecol* 1998;179:644-9.
105. Tascini C et al. Inhibition of fungicidal activity of polymorphonuclear leukocytes from HIV-infected patients by interleukin (IL)-4 and IL-10. *AIDS* 1996;10:477-83.
106. Tietz HJ. [Therapy problems in chronic recurrent vaginal mycosis]. *Ther.Umsch.* 2002;59:481-4.
107. Utgaard JO et al. Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J Exp.Med.* 1998;188:1751-6.
108. Villar CC et al. Invasive phenotype of Candida albicans affects the host proinflammatory response to infection. *Infect Immun.* 2005;73:4588-95.
109. Weissenbacher ER. Pressekonferenz anlässlich der 20. Internationalen Tagung über Infektionen in München. 20-7-2005.
Ref Type: Hearing
110. Weissenbacher E, Spitzbart H. Mykosen in der Frauenheilkunde, Diagnostik und Therapie, Flourpraktikum II. München: Medifact Verlag, 2001.

111. Weissenbacher S et al. Value of Candida polymerase chain reaction and vaginal cytokine analysis for the differential diagnosis of women with recurrent vulvovaginitis. *Infect.Dis.Obstet.Gynecol.* 2000;8:244-7.
112. White DJ et al. Combined topical flucytosine and amphotericin B for refractory vaginal *Candida glabrata* infections. *Sex Transm.Infect* 2001;77:212-3.
113. Wildfeuer A, Schlenk R, Friedrich W. Detection of *Candida albicans* DNA with a yeast-specific primer system by polymerase chain reaction. *Mycoses* 1996;39:341-6.
114. Wilton L et al. Relative risk of vaginal candidiasis after use of antibiotics compared with antidepressants in women: postmarketing surveillance data in England. *Drug Saf* 2003;26:589-97.
115. Witkin SS. Immunologic factors influencing susceptibility to recurrent candidal vaginitis. *Clin.Obstet.Gynecol.* 1991;34:662-8.
116. Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin.Infect Dis* 2002;34:204-9.
117. Witkin SS, Hirsch J, Ledger WJ. A macrophage defect in women with recurrent *Candida* vaginitis and its reversal in vitro by prostaglandin inhibitors. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1986;155:790-5.
118. Witkin SS, Jeremias J, Ledger WJ. A localized vaginal allergic response in women with recurrent vaginitis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1988;81:412-6.
119. Yamamori T et al. The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science* 1989;246:1412-6.
120. Young GL, Jewell D. Topical treatment for vaginal candidiasis (thrush) in pregnancy. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* 2001;CD000225.
121. Zaga-Clavellina V et al. Incubation of human chorioamniotic membranes with *Candida albicans* induces differential synthesis and secretion of interleukin-1beta, interleukin-6, prostaglandin E, and 92 kDa type IV collagenase. *Mycoses* 2006;49:6-13.

8. Anhang

8.1. Rohdaten

(Interleukin und LIF - Konzentration in pg/ml)

SSW	RG	Kultur	PCR	IL-1β	IL-4	IL-6	IL-8	LIF	Alter	Gravi.	Aborte	Allergien	Nikotin	Risiken	Gruppe
15	2	0	0	82.6	11.0	264.7	256.8	637.2	28	2	0	1	0	0	0
20	1	0	0	49.7	8.5	4.4	0.0	6170.3	28	2	0	1	0	0	0
28	2	0	0	31.1	0.0	5.5	0.0	356.5	28	2	0	1	0	0	0
31	2	0	0	0.0	0.0	527.0	0.0	305.6	26	1	0	1	0	0	0
20	1	0	0	31.8	1.9	26.5	350.3	959.5	30	1	0	0	0	0	0
27	1	0	0	0.0	7.8	12.5	73.5	598.9	30	1	0	0	0	0	0
30	1	0	0	14.1	3.5	9.5	6.3	689.1	30	1	0	0	0	0	0
32	1	0	0	24.7	15.5	22.6	21.5	432.3	30	1	0	0	0	0	0
9	1	0	0	72.0	4.7	42.0	37.4	447.2	30	1	0	0	0	0	0
12	2	0	0	80.0	2.7	243.1	727.2	956.4	43	4	2	0	0	0	0
16	2	0	0	70.0	1.2	250.0	700.0	789.1	43	4	2	0	0	0	0
18	3	0	0	73.8	14.9	392.8	1028.0	556.1	43	4	2	0	0	0	0
35	2	0	0	4.4	2.1	11.0	1.0	299.8	26	1	0	1	0	0	0
15	1	0	0	5.6	0.0	21.1	737.3	1362.3	35	3	0	1	0	1	0
20	1	0	0	15.0	4.5	22.1	312.7	1124.2	35	3	0	1	0	1	0
24	1	0	0	6.5	5.6	11.2	291.8	554.8	35	3	0	1	0	1	0
28	1	0	0	0.4	7.8	158.0	476.0	266.8	28	1	0	0	0	0	0
39	1	0	0	2.1	17.9	3.4	328.0	664.8	28	1	0	0	0	0	0
35	3	0	0	0.0	0.0	0.0	36.8	215.3	39	2	1	0	0	0	0
17	1	0	0	0.0	0.2	16.0	0.0	178.4	39	2	0	0	0	0	0
37	1	0	0	4.8	24.4	43.6	445.0	98.6	34	2	0	0	0	0	0
14	2	0	0	5.0	7.4	12.9	484.0	973.1	28	1	0	0	0	0	0
17	2	0	0	0.1	6.1	3.4	469.0	2266.5	28	1	0	0	0	0	0
36	1	0	0	36.9	10.2	64.8	220.5	2215.0	31	3	0	0	0	0	0
18	2	0	0	133.7	4.4	119.1	348.8	179.2	35	2	0	0	0	1	0
38	2	0	0	144.0	0.0	29.4	18.6	208.1	36	2	0	0	0	1	0
33	2	0	0	79.6	2.5	0.0	370.9	503.0	41	2	0	0	0	0	0
16	2	0	0	26.3	6.7	12.3	1310.0	689.6	29	2	1	0	1	0	0
33	2	0	0	2.5	1.3	0.0	39.7	789.4	30	2	1	0	1	0	0
34	1	0	0	2.4	16.4	13.4	475.0	901.9	34	1	0	0	0	0	0
34	1	0	0	0.0	2.2	1.4	87.0	9404.9	42	2	0	0	0	0	0
38	2	0	0	0.2	3.8	1.7	21.3	8744.6	40	2	0	0	0	0	0
19	1	0	0	6.9	61.9	0.0	993.0	232.0	33	2	0	0	0	0	0
14	1	0	0	0.0	10.5	14.3	49.0	539.3	41	3	1	0	0	0	0
15	1	0	0	0.0	13.9	0.0	173.0	625.2	41	3	1	0	0	0	0
9	1	0	0	1.1	0.0	11.2	97.8	214.8	37	1	0	0	0	0	0
37	2	0	0	1.9	22.6	0.0	23.8	330.5	36	1	0	1	0	0	0
22	1	0	0	3.8	37.2	728.4	864.9	300.4	40	2	1	0	0	1	0
26	2	0	0	0.0	18.7	34.7	123.3	289.3	40	2	1	0	0	1	0
33	2	0	0	0.0	9.4	76.1	141.3	234.7	40	2	1	0	0	1	0
35	2	0	0	2.3	7.6	7.8	100.0	199.5	40	2	1	0	0	1	0
24	1	0	0	3.4	3.9	4.3	0.0	187.3	41	3	1	0	0	1	0
14	1	0	0	0.0	12.0	3.0	63.0	348.5	33	1	0	0	0	0	0
12	2	0	0	1.1	0.0	44.9	11.9	399.4	35	3	1	1	0	1	0
34	2	0	0	42.0	5.5	28.4	754.1	245.8	35	3	1	1	0	1	0
31	1	0	0	14.4	14.9	3.7	160.8	807.7	34	2	0	0	0	0	0
36	1	0	0	5.7	20.8	21.5	335.2	1574.2	34	2	0	0	0	0	0
38	1	0	0	5.9	11.4	4.6	13.0	2132.7	34	2	0	0	0	0	0
34	3	0	0	0.0	10.9	236.0	780.0	147.6	27	1	0	1	0	0	0
14	2	0	0	500.9	14.7	207.1	1308.1	189.4	28	2	0	1	0	0	0
23	2	0	0	3.7	3.2	16.0	29.7	134.9	28	2	0	1	0	0	0
14	1	0	0	13.2	8.0	2.8	166.8	2945.2	32	1	0	0	0	0	0
28	1	0	0	1.6	6.2	20.5	76.2	579.2	33	1	0	0	0	0	0
34	1	0	0	3.9	3.8	5.5	73.1	478.3	33	1	0	0	0	0	0
31	1	0	0	3.8	48.3	56.9	777.0	883.0	37	2	0	0	0	0	0
37	1	0	0	9.8	5.3	1.3	1470.0	939.5	37	2	0	0	0	0	0
38	2	0	0	3.1	8.3	0.5	818.0	133.3	39	3	1	0	0	0	0
24	2	0	0	0.0	3.8	3.7	0.0	332.1	31	2	0	0	0	0	0
16	1	0	0	0.9	11.0	5.4	21.4	754.2	34	1	0	0	0	0	0
12	1	0	0	0.9	0.5	0.0	5.9	154.8	38	2	0	0	0	0	0
35	1	0	0	0.3	0.5	0.0	245.8	1141.9	33	3	0	0	0	0	0
37	1	0	0	8.7	0.0	0.5	1890.0	301.5	33	3	0	0	0	0	0
31	1	0	0	4.2	22.3	0.9	574.0	83.46	37	1	0	0	0	0	0
27	1	0	0	3.6	24.9	5.9	494.0	154.6	30	1	0	0	0	0	0

31	2	0	0	0.6	13.0	3.3	1569.0	612.2	30	1	0	0	0	0	0
29	2	0	0	0.0	6.0	9.0	3.4	567.4	36	1	0	0	0	0	0
36	1	0	0	0.0	5.6	34.6	5097.0	888.7	35	2	0	0	0	0	0
16	2	0	0	41.0	5.5	23.2	175.7	3200.5	34	4	2	0	0	0	0
20	2	0	0	2.6	9.1	6.4	196.1	347.5	35	4	2	0	0	0	0
31	2	0	0	25.5	9.3	0.0	419.4	401.1	35	4	2	0	0	0	0
38	3	0	0	22.3	3.7	0.0	187.6	189.8	35	4	2	0	0	0	0
36	2	0	0	242.5	15.8	20.5	405.8	1457.5	32	1	0	1	0	0	0
39	3	0	0	272.2	21.3	49.0	340.4	1249.7	32	1	0	1	0	0	0
15	1	0	0	3.1	0.0	40.1	123.0	3017.5	24	1	0	0	0	0	0
26	1	0	0	390.4	2.7	32.0	81.4	3391.7	34	2	0	0	0	0	0
28	2	0	0	0.0	0.0	0.0	9.3	233.6	36	3	0	0	0	0	0
22	1	0	0	4.8	0.0	0.0	25.5	129.4	33	2	1	0	0	0	0
26	1	0	0	23.3	18.0	24.7	47.2	157.4	33	2	1	0	0	0	0
35	1	0	0	2.2	23.4	18.9	103.9	189.6	33	2	1	0	0	0	0
38	1	0	0	0.0	20.2	25.8	0.0	304.9	33	2	1	0	0	0	0
14	2	0	0	0.0	3.8	0.0	69.4	660.3	38	1	0	0	0	0	0
31	2	0	0	215.9	34.7	72.1	49.6	5874.6	36	2	0	0	0	0	0
36	2	0	0	87.3	21.8	31.3	14.6	3456.7	36	2	0	0	0	0	0
25	1	0	0	0.4	12.1	17.8	3675.0	2640.9	23	1	0	0	0	0	0
14	2	0	0	0.2	16.0	117.0	798.0	134.7	34	1	0	0	0	0	0
28	1	0	0	3.0	6.0	10.9	72.1	287.1	37	2	0	0	0	0	0
35	1	0	0	0.0	4.5	6.9	0.0	247.6	37	2	0	0	0	0	0
41	1	0	0	2.2	6.8	0.0	0.0	302.5	37	2	0	0	0	0	0
21	2	0	0	2.3	9.0	6.8	26.6	789.2	34	1	0	0	0	1	0
26	2	0	0	0.0	78.3	26.7	667.0	0.0	39	2	0	0	0	0	0
31	2	0	0	0.6	14.9	47.9	703.0	2891.8	39	2	0	0	0	0	0
28	2	0	0	0.7	12.4	2.9	505.0	512.6	44	2	0	0	0	0	0
30	1	0	0	0.7	6.4	5.5	79.0	565.9	44	2	0	0	0	0	0
36	1	0	0	90.6	1.2	1093.1	383.0	184.8	33	1	0	0	0	0	0
38	3	0	0	15.4	28.6	31.4	11.4	124.4	38	2	0	0	0	0	0
8	1	0	0	11.1	7.0	0.0	1014.0	1452.8	41	3	0	0	0	0	0
24	1	0	0	51.9	6.1	24.2	704.9	190.9	34	1	0	0	0	0	0
28	1	0	0	46.8	0.0	24.7	229.0	135.3	28	1	0	1	0	0	0
29	2	0	0	8.1	0.3	16.0	43.4	129.4	37	2	0	0	0	0	0
13	2	0	0	58.8	0.0	238.8	963.0	2768.6	34	4	1	1	0	1	0
20	2	0	0	120.0	20.8	60.0	421.0	478.9	35	4	1	1	0	1	0
23	3	0	0	99.8	23.2	26.7	736.6	897.6	35	4	1	1	0	1	0
27	2	0	0	50.4	3.9	61.9	348.0	1144.6	35	4	1	1	0	1	0
29	2	0	0	109.1	7.2	5.8	109.9	998.4	35	4	1	1	0	1	0
38	2	0	0	2.3	0.0	4.3	166.0	567.7	35	4	1	1	0	1	0
15	3	0	0	2.1	6.9	177.9	352.7	1723.3	40	2	1	1	0	0	0
36	2	0	0	90.6	19.3	5.2	252.3	124.7	35	2	0	0	0	1	0
27	1	0	0	2.4	7.0	66.8	62.7	354.9	38	2	0	0	0	0	0
31	1	0	0	5.2	12.1	20.4	108.3	246.1	38	2	0	0	0	0	0
38	2	0	0	2.1	0.0	8.7	79.2	123.2	37	1	0	0	0	0	0
32	3	0	0	70.5	4.1	56.8	429.9	135.6	31	1	0	0	0	0	0
22	2	0	0	0.0	0.0	12.8	142.1	5285.2	40	1	0	0	0	0	0
25	1	0	0	18.3	0.0	4.9	222.2	859.2	36	1	0	0	0	0	0
28	1	0	0	6.4	5.5	2.2	778.0	2506.1	35	2	0	0	0	0	0
29	2	0	0	0.3	5.6	0.0	673.0	983.0	35	2	0	0	0	0	0
34	1	0	0	0.6	3.9	8.4	2528.0	1587.0	35	2	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0.0	15.8	0.0	22.9	167.8	34	2	1	1	0	1	0
12	1	0	0	2.3	14.1	106.9	25.2	109.5	34	2	1	1	0	1	0
37	2	0	0	96.0	32.6	36.9	479.8	227.5	36	3	0	1	0	0	0
35	2	0	0	2.3	19.0	0.0	35.4	172.5	32	2	0	1	0	0	0
36	2	0	0	1.9	22.9	10.5	214.1	160.2	32	2	0	1	0	0	0
32	1	0	0	0.0	23.7	0.8	2370.0	438.5	26	1	0	0	0	0	0
32	1	0	0	0.0	2.7	15.1	101.1	808.6	25	1	0	0	0	0	0
35	2	0	0	17.1	16.6	0.0	775.7	166.4	32	1	0	0	0	0	0
25	1	0	0	2.7	11.1	22.4	2902.0	1147.9	31	1	0	0	0	0	0
34	1	0	0	6.8	5.3	20.1	381.5	1185.9	33	1	0	0	0	0	0
34	1	0	0	16.0	9.0	7.9	58.4	333.4	17	1	0	0	0	0	0
10	2	0	0	0.0	34.3	7.6	14.0	247.3	31	2	0	0	0	0	0
31	1	0	0	23.1	13.2	6.7	149.5	211.4	32	2	0	0	0	0	0

23	1	0	0	0.0	3.7	0.0	0.0	147.9	32	1	0	0	0	0	0
28	1	0	0	0.0	11.2	13.2	3.5	198.3	32	1	0	0	0	0	0
23	2	0	0	24.3	14.0	0.0	176.5	752.2	36	3	2	0	0	0	0
35	2	0	0	29.1	14.0	5.5	424.0	554.6	36	3	2	0	0	0	0
36	2	0	0	222.3	0.0	60.0	891.7	4597.0	30	1	0	0	0	1	0
20	1	0	0	0.1	0.0	122.7	99.9	2334.3	28	2	0	1	0	1	0
28	2	0	0	0.2	12.4	14.5	54.8	3960.8	28	2	0	1	0	1	0
35	1	0	0	12.0	7.0	0.0	0.0	6307.8	40	3	0	0	0	0	0
21	2	0	0	0.0	8.2	14.5	144.5	3007.2	32	2	0	0	0	0	0
30	2	0	0	0.0	12.4	40.4	120.4	2319.9	32	2	0	0	0	0	0
34	2	0	0	13.0	0.0	22.1	4.4	4824.0	32	2	0	0	0	0	0
27	1	0	0	100.1	0.0	58.5	150.0	1085.5	24	1	0	0	1	0	0
33	2	0	0	2.8	25.9	3.4	801.0	664.8	30	2	0	0	0	0	0
16	1	0	0	19.9	0.0	51.9	74.0	631.4	36	2	0	0	0	0	0
32	1	0	0	0.0	4.3	6.2	22.2	4018.4	36	2	0	0	0	0	0
41	2	0	0	0.0	4.8	0.0	33.5	209.2	35	1	0	0	0	0	0
35	1	0	0	2.3	13.5	25.5	103.2	98.5	36	3	0	0	0	0	0
40	1	0	0	2.1	12.6	0.0	202.3	6420.8	36	3	0	0	0	0	0
24	2	0	0	89.4	7.6	310.0	501.2	160.2	39	2	1	0	0	0	0
35	2	0	0	0.2	5.4	15.6	34.8	2521.9	33	1	0	0	0	0	0
31	2	0	0	0.0	9.3	0.0	118.5	92.3	37	1	0	0	0	0	0
37	2	0	0	2.3	10.5	0.0	10.3	1632.0	38	1	0	0	0	0	0
38	2	0	0	2.2	4.3	0.0	31.4	3610.2	38	1	0	0	0	0	0
36	2	0	0	2.5	5.4	98.0	97.2	4660.4	38	1	0	0	0	0	0
36	2	0	0	6.2	4.5	6.7	7.1	3229.0	40	2	0	0	0	0	0
28	2	0	0	34.0	5.0	35.0	998.0	3322.2	41	2	0	0	0	0	0
22	1	0	0	15.5	12.8	4.9	13.6	2970.5	37	1	0	0	0	0	0
34	1	0	0	2.6	24.7	7.1	74.9	4887.7	37	1	0	0	0	0	0
38	1	0	0	0.6	7.8	6.2	388.0	1933.0	38	2	0	0	0	0	0
41	2	0	0	0.3	0.0	5.8	18.9	1478.2	38	2	0	0	0	0	0
37	1	0	0	0.0	6.3	5.8	356.2	2632.9	31	1	0	0	0	0	0
30	1	0	0	0.0	0.0	269.6	1108.4	1278.4	29	1	0	0	0	0	0
8	2	0	0	0.0	16.5	0.0	11.7	1104.1	34	2	0	0	0	0	0
34	2	0	0	0.0	22.2	6.8	1388.7	3212.1	34	2	0	0	0	0	0
34	1	0	0	0.0	2.0	4.2	1703.0	5861.7	32	1	0	0	0	0	0
28	1	0	0	12.4	10.4	28.9	406.4	2613.0	28	1	0	0	0	0	0
38	1	0	0	14.6	0.0	23.8	203.8	927.4	28	2	0	0	0	0	0
29	1	0	0	2.3	0.0	31.8	4.9	129.4	34	2	0	0	0	0	0
8	1	0	0	0.0	2.3	0.8	2200.0	5029.1	36	1	0	0	0	0	0
19	1	0	0	0.0	9.3	0.0	546.0	1739.8	37	2	1	0	0	0	0
21	2	0	0	2.0	5.8	4.7	7.0	69.2	37	2	1	0	0	0	0
34	1	0	0	2.3	5.2	0.0	158.0	1766.6	37	2	1	0	0	0	0
22	2	0	0	0.7	7.3	6.4	978.0	920.7	30	1	0	0	0	0	0
27	2	0	0	0.4	11.1	7.8	2080.0	512.6	30	1	0	0	0	0	0
30	1	0	0	37.1	0.0	52.3	259.6	449.9	29	2	0	0	0	0	0
7	1	0	0	0.0	4.4	170.2	988.0	1807.9	37	1	0	0	0	0	0
14	1	0	0	0.0	21.2	46.1	462.3	2593.1	37	1	0	0	0	0	0
15	2	0	0	61.1	23.7	48.7	773.6	1066.4	37	1	0	0	0	0	0
18	1	0	0	0.2	7.3	306.2	564.9	2510.2	37	1	0	0	0	0	0
32	2	0	0	6.6	12.2	18.7	165.3	9033.2	38	1	0	0	0	0	0
13	2	0	0	0.9	7.6	29.6	181.0	54.8	40	3	0	0	0	0	0
37	2	0	0	0.0	12.5	0.0	11.5	971.3	28	1	0	0	0	0	0
7	1	0	0	3.9	5.8	44.0	1002.0	2959.2	29	2	0	0	0	0	0
29	1	0	0	25.1	6.5	23.5	60.9	1868.5	29	2	0	0	0	0	0
34	1	0	0	46.1	17.4	211.0	408.0	1107.6	29	2	0	0	0	0	0
37	2	0	0	6.9	8.2	12.6	391.6	888.7	36	2	0	0	0	0	0
38	1	0	0	25.1	5.7	19.8	204.3	2640.9	36	2	0	0	0	0	0
36	1	0	0	0.0	34.3	91.0	101.0	973.1	33	1	0	1	0	0	0
34	1	0	0	0.0	0.0	31.2	10.0	4362.3	32	1	0	0	0	0	0
16	1	0	1	80.7	4.0	9.0	220.4	1160.1	28	1	0	1	0	1	1
28	0	1	1	8.0	4.9	15.0	800.0	1650.4	26	1	0	0	0	0	1
9	3	0	2	24.3	25.3	198.2	683.4	514.8	25	2	1	0	0	1	1
30	2	1	1	120.5	5.1	59.1	506.9	1133.4	44	4	2	1	0	0	1
29	2	1	1	33.6	19.2	0.0	3016.0	1026.2	40	1	0	0	0	0	1
26	3	0	2	1.4	6.2	51.2	15.1	61.2	26	1	0	0	0	0	1

38	1	0	2	2.1	38.3	1.0	45.6	706.2	32	1	0	0	1	0	1
39	2	1	1	14.2	7.1	110.4	215.1	1046.3	35	2	0	1	0	0	1
27	3	1	1	71.9	4.1	55.3	69.7	1969.0	35	2	0	0	0	1	1
35	1	0	1	83.8	5.3	91.6	3932.0	458.8	30	2	0	0	0	0	1
39	2	0	2	161.2	13.0	7.6	495.8	6425.4	38	4	1	1	0	1	1
25	2	1	1	2.3	20.4	5.6	224.2	8675.5	30	2	1	0	1	0	1
16	0	0	1	45.8	3.2	43.8	653.9	367.2	40	3	0	0	1	0	1
32	3	0	1	0.0	0.0	0.4	202.2	2916.4	30	1	0	0	0	0	1
37	1	0	1	24.5	14.3	30.5	146.2	544.1	34	1	0	1	0	0	1
28	1	1	1	0.0	14.0	2.0	196.8	1655.2	34	2	0	0	0	0	1
20	1	0	1	0.4	4.3	17.7	127.5	646.7	32	1	0	0	0	1	1
28	2	1	1	3.1	25.0	0.3	377.1	525.1	38	1	0	0	0	0	1
8	1	2	2	7.4	19.8	223.2	399.0	3929.8	41	1	0	0	1	0	1
18	1	2	2	96.3	0.1	250.1	545.4	1101.8	31	2	1	0	0	0	1
19	2	0	1	5.3	0.0	3.4	80.4	2169.4	31	1	0	0	0	0	1
30	1	0	1	36.9	10.4	450.0	104.1	3577.5	35	1	2	0	1	0	1
29	2	0	2	104.1	1.4	37.8	31.2	2106.2	34	1	0	0	0	0	1
25	1	0	1	6.3	1.7	314.6	17.6	1679.6	38	1	0	0	0	0	1
36	2	0	1	46.0	25.8	0.0	126.5	717.7	35	4	2	0	0	0	1
33	1	0	1	8.0	8.0	15.8	1.4	824.2	37	2	0	0	0	0	1
31	0	2	2	7.7	7.7	0.8	1014.4	2315.3	33	2	0	1	0	1	1
31	2	0	1	71.3	11.1	2.0	462.0	251.9	32	1	0	1	0	0	1
34	2	0	1	45.7	22.6	50.6	295.0	1132.1	36	1	0	0	0	0	1
34	2	1	1	0.7	10.2	0.0	49.0	1690.0	46	1	0	0	1	0	1
22	1	1	1	27.1	21.0	21.7	238.1	1238.5	29	1	0	1	0	0	1
39	3	0	1	60.7	19.8	33.0	468.4	2416.0	31	2	0	0	0	1	1
34	1	0	1	6.4	1.2	5.5	9.6	2460.3	38	2	0	0	0	0	1
37	2	0	1	1.8	0.0	0.0	98.0	4692.2	34	1	0	0	0	1	1
28	2	1	1	589.0	11.8	215.1	948.6	1548.1	30	3	0	0	1	0	1
21	2	0	2	6.0	5.2	20.0	23.0	23.8	35	2	0	0	0	1	1
23	2	0	1	313.0	18.9	547.8	1001.0	217.2	27	1	0	1	0	1	1
35	2	0	1	28.9	59.1	22.3	9.7	1568.2	41	2	1	1	0	0	1
34	2	0	1	19.5	15.8	11.9	435.8	444.0	35	2	0	0	0	1	1
19	1	1	1	2.2	12.3	0.0	11.2	2510.2	38	1	0	0	1	0	1
27	1	0	1	0.6	10.0	9.0	195.8	1711.6	34	2	1	1	0	1	1
38	3	0	1	64.5	15.6	290.6	1134.0	1456.3	33	1	0	0	0	0	1
8	2	0	1	38.9	5.0	18.3	110.8	79.9	33	1	0	0	0	0	1
34	1	0	1	1.4	14.6	26.2	115.7	828.4	32	1	0	0	0	0	1
35	1	0	2	4.1	4.3	0.0	22.5	3076.2	32	1	0	0	0	0	1
38	1	0	1	39.1	12.9	70.9	847.4	1660.6	30	1	0	0	0	1	1
13	2	0	1	45.3	5.1	56.6	706.2	491.3	32	2	0	0	0	0	1
25	2	0	1	4.5	6.0	21.0	3.0	956.3	35	8	5	0	0	0	1
31	1	1	1	7.9	4.8	27.9	31.1	2366.1	29	3	2	1	0	1	1
9	1	0	1	24.2	2.2	1.8	414.0	1233.7	32	1	0	0	0	0	1
30	2	0	1	5.4	7.3	7.9	14.3	1895.3	35	1	0	0	0	0	1
32	2	0	1	40.7	4.8	23.0	128.2	408.3	33	1	0	0	0	0	1
25	1	0	1	0.0	9.5	35.7	356.8	1123.7	38	2	0	0	0	0	1
27	1	0	1	12.4	58.1	0.2	289.7	876.4	31	1	0	0	0	0	1
33	1	0	2	47.4	23.6	3.6	184.0	479.5	34	2	0	0	0	0	1
36	1	0	2	33.4	0.0	3.9	80.8	461.7	28	1	0	0	0	0	1
25	1	0	1	0.6	20.7	179.3	448.8	294.3	37	1	0	0	0	0	1
30	3	2	2	31.3	38.6	7.6	195.4	862.7	37	3	1	0	0	0	1
13	1	1	1	16.0	4.8	58.3	215.6	5697.2	29	2	0	0	0	0	1
40	1	0	1	4.3	17.5	7.9	92.0	1054.8	36	1	0	0	0	0	1
37	1	0	1	12.9	12.1	10.3	114.5	1558.0	26	1	0	0	0	0	1

8.2. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Frauenklinik des Klinikums Großhadern, München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dr. E.R. Weissenbacher danke ich besonders für die Überlassung des Themas, die stete Unterstützung und eingehende Beratung in allen wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen.

Herrn Prof. Dr. H. Spitzbart möchte ich für die fachliche Betreuung sowie für die stets freundliche Zusammenarbeit danken.

Frau Dr. rer.nat. G. Anton gilt mein Dank für die praktische Unterweisung und die freundschaftliche Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen.

Außerdem habe ich Herrn Dr. Marc-Oliver Rauch für die wertvolle Unterstützung bei der statistischen Bearbeitung zu danken.

8.3. Curriculum Vitae

Geburtsdatum: 13. Dezember 1973
Geburtsort: München
Nationalität: Deutsch
Eltern: Dr. med. Heidemarie Weissenbacher
Prof. Dr. med. Ernst-Rainer Weissenbacher
Familienstand: Verheiratet
Zwei Töchter

Schulbildung

1980 – 1984 Grundsule Pöcking
1984 – 1993 Gymnasium Starnberg
09.07.1993 Allgemeine Hochschulreife
am Gymnasium Starnberg

Auslandsaufenthalt

September 1993 – März 1994 Sprachkurs am North Shore continuing
Education Center in Vancouver, BC, Canada

Krankenpflegedienst

April 1994 – Dezember 1994 Klinikum der Universität München-Großhadern
Dr. von Haunersches Kinderspital, München

Fremdsprachenausbildung

Januar 1995 – Juli 1995	Sprachkurs am Cambridge Institut, München
September 1995 – Juli 1997	Ausbildung zur Fachübersetzerin Englisch/Deutsch (Fachgebiet Naturwissenschaften) am Sprachen- und Dolmetscher- Institut München Zusatzsprache Italienisch

Hochschulausbildung

Mai 1996 – Dezember 2004	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
August 2000	Ärztliche Vorprüfung
August 2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11. September 2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10. Dezember 2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
20. Januar 2005	Erhalt der Approbation als Ärztin

Famulaturen

Physikalische Medizin:

Klinikum der Universität München-Großhadern

Pädiatrie:

Lachner Klinik, München

Innere Medizin:

Klinikum der Universität München-Großhadern

Orthopädie:

Praxis Prof. Dr. Pförringer, München

Praktisches Jahr

20.10.2003 – 08.02.2004

Chirurgie:

Städtische Klinik München-Schwabing

09.02.2004 – 30.05.2004

Innere Medizin:

Klinikum der Universität München-Großhadern

31.05.2004 – 19.09.2004

Dermatologie:

Städtische Klinik München-Schwabing

Elternzeit

2005 bis 2007

Berufliche Tätigkeit

15.10.2007 bis 28.04.2009

Waldkrankenhaus St. Marien – Orthopädische
Universitätsklinik Erlangen

Assistenzärztin Orthopädie / Rheumatologie

28.04.2009 bis laufend

Mutterschutz und Elternzeit