

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

**Nachweis von Candida-Spezies und Bestimmung der Zytokine
Interleukin-1 β , Interleukin-1ra, Interleukin-4, Interleukin-6, Interleukin-8,
Interleukin-10 und Interleukin-12 im Vaginalsekret und im Serum bei
Schwangeren
in Relation zum Gestationsalter**

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

vorgelegt von
Tatiana Azbil
aus Baku
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. F. Ebel
Prof. Dr. S. Endres

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	6
1 Einleitung	8
1.1 Candida Spezies.....	8
1.2 Epidemiologie von vaginaler Kolonisation und symptomatischer Infektion mit <i>Candida spp.</i> in der Schwangerschaft.....	9
1.3 Mechanismen, die die Entstehung von Candidosen in der Schwangerschaft begünstigen.....	12
1.4 Folgen der Kolonisation mit <i>Candida spp.</i> für die Mutter und das Kind	12
1.5 Struktur des Immunsystems	15
1.5.1 Zytokine	18
1.5.1.1 Interleukin-1 (IL-1)	18
1.5.1.2 Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra)	19
1.5.1.3 Interleukin-4 (IL-4)	19
1.5.1.4 Interleukin-6 (IL-6)	20
1.5.1.5 Interleukin-8 (IL-8)	20
1.5.1.6 Interleukin-10 (IL-10)	21
1.5.1.7 Interleukin-12 (IL-12)	21
1.5.2 Zytokine und <i>Candida spp.</i>	22
2 Aufgabenstellung	25
3 Material und Methodik	27
3.1 Patientinnen.....	27
3.2 Proben	29
3.2.1 Blutproben	29
3.2.2 Vaginalabstriche	29
3.3 Kulturelle Anzuchtug	30
3.4 PCR	31

3.4.1	Vorbereitung der DNA der Candidazellen zur PCR (Candida processing)	31
3.4.2	Candida Primer	32
3.4.3	PCR-Mischung für Candida-PCR	33
3.4.4	Gelelektrophorese	34
3.5	Zytokinbestimmung.....	34
3.5.1	Das Wirkungsprinzip eines ELISAs (Enzyme-linked-immunosorbent-assay).....	34
3.5.2	Protokoll der Zytokinbestimmung mittels ELISA	35
3.5.2.1	Reagenzien	35
3.5.2.2	Vorbereitung von Reagenzien	36
3.5.2.3	Durchführung der Untersuchung	37
3.6	Statistische Analyse.....	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Demographische Charakteristika	39
4.2	Candidanachweis	40
4.2.1	Kultur	40
4.2.2	PCR	41
4.3	Bestimmung der Zytokine	43
4.3.1	Interleukin-1 β im Vaginallavage und im Serum.....	44
4.3.2	Interleukin-1ra im Vaginallavage und im Serum	48
4.3.3	Interleukin-4 im Vaginallavage und im Serum.....	53
4.3.4	Interleukin-6 im Vaginallavage und im Serum.....	57
4.3.5	Interleukin-8 im Vaginallavage und im Serum.....	61
4.3.6	Interleukin-10 im Vaginallavage und im Serum.....	65
4.3.7	Interleukin-12 im Vaginallavage und im Serum.....	69
5	Diskussion.....	73
6	Zusammenfassung	89
7	Literaturverzeichnis.....	92

8	Anhang	107
8.1	Tabellenverzeichnis	107
8.2	Abbildungsverzeichnis	108
8.3	Geräte.....	110
8.4	Reagenzien	111
9	Danksagung	113
10	Lebenslauf	114

Abkürzungen

AK	Antikörper
aOR	adjustiertes Oddsratio
APC	Antigenpräsentierende Zellen
Aqua a.i.	Aqua ad iniectabilia
bp	Basenpaare
<i>Candida spp.</i>	<i>Candida</i> -Spezies
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
IL-1 ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
INF- γ	Interferon-gamma
IUP	Intrauterinpeessar
kDa	kilo Dalton
KI	Konfidenzinterval
l	Liter
mA	Milli Amper
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
NID Puffer	Nonionic Detergent Puffer
nm	Nanometer
NTP	Nukleotidtriphosphate
OD	optische Dichte
PBS - Puffer	Phosphate-Borate-Saline-Puffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm
PGE ₂	Prostaglandin E ₂

PMNL	polymorphonukleare Leukozyten
QS	Querschnittstudie
RHG	Reinheitsgrad
SSW	Schwangerschaftswoche
TBE	Tris Boric EDTA
TE	Tris HCL EDTA
TMB	Tetramethylbensidin
TNF- α	Tumornekrosisfaktor-alpha
U/m	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

1.1 Candida Spezies

Das Genus *Candida* umfasst mehr als 200 Hefearten, von denen nur wenige für Menschen pathogen sind. Aus medizinischer Sicht repräsentiert die Hefe *Candida albicans* die wichtigste der Arten, die für die Entstehung von Humanmykosen verantwortlich sind. Die Krankheitsbilder variieren von unkomplizierten Hautinfektionen bis hin zu fatalen, systemischen Infektionen bei immungeschwächten Patienten (20;97;143).

In den letzten Jahren wurde eine steigende Inzidenz von Mykosen, die von anderen *Candida*-Spezies wie z.B. *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. krusei* verursacht werden, beobachtet (11;24;118). Diese Arten sind oft weniger empfindlich oder resistent gegenüber Antimykotika, insbesondere gegen Azolen, was als wichtiger Selektionsfaktor dazu führen kann, dass es zum Wandel in der Epidemiologie der Mykosen kommt (74;100;119;143).

Bei *Candida*-Spezies werden beide morphologische Formen beobachtet, sowohl Hefezellen als auch Myzel. Bei den Myzel-Formen handelt es sich um elongierte Blastokonidien, die aneinander gekettet liegen und dadurch ähnlich wie echte Hyphen aussehen. Dies wird als Pseudomyzel bezeichnet. *C. albicans* ist als einziger Vertreter dieser Art in der Lage, echtes Myzel zu bilden (20).

Es wird angenommen, dass das Myzel im klinischen Material ein Zeichen für eine Invasion ist, wobei Blastokonidien bei einer Kolonisation vorkommen. *C. albicans* ist in der Lage, von der Hefe- zur filamentösen Form zu wechseln (143).

Im Genitalbereich spielen nur wenige Arten eine relevante Rolle in der Entstehung von Mykosen. Die wichtigsten sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 Erreger der Mykosen im Genitalbereich

<i>Candida spp.</i>	Häufigkeit (%)
<i>Candida albicans</i>	60-80
<i>Candida glabrata</i>	18
<i>Candida krusei</i>	6
<i>Candida kefyr</i>	3
<i>Candida tropicalis</i>	2
andere <i>Candida spp.</i>	6

Quelle: Weissenbacher E.R. Spitzbart H. Mykosen in der Frauenheilkunde. Diagnostik und Therapie. Fluorpraktikum II. Medifact-Publishing KG München 2001 (143).

1.2 Epidemiologie von vaginaler Kolonisation und symptomatischer Infektion mit *Candida spp.* in der Schwangerschaft

Die steigende Prävalenz von vaginalen Kolonisationen und Infektionen mit *Candida spp.* im Vergleich zwischen Schwangeren und nicht Schwangeren sowie im Laufe der Schwangerschaft wurde in vielen verschiedenen wissenschaftlichen Abhandlungen beschrieben (58;96;143;166). Das dritte Trimester ist hierbei mit der höchsten Nachweisrate von *Candida spp.* assoziiert. Die Schweregrade der Kolonisierung variieren innerhalb der Schwangerschaft sehr stark von ganz leichter bis massiver Besiedlung. Nur 60% Schwangere mit Kolonisierung mit *Candida spp.* entwickeln Symptome, wobei das klinische Bild sehr stark variiert und in vielen Fällen aufgrund der Symptomatik keine Behandlung notwendig ist. Es wurden auch starke Unterschiede in der Prävalenz einer Besiedlung mit *Candida spp.* zwischen verschiedenen Ländern beobachtet.

Abbildung 1 zeigt die Prävalenz des Nachweises von *Candida spp.* in der Vagina in verschiedenen Ländern.

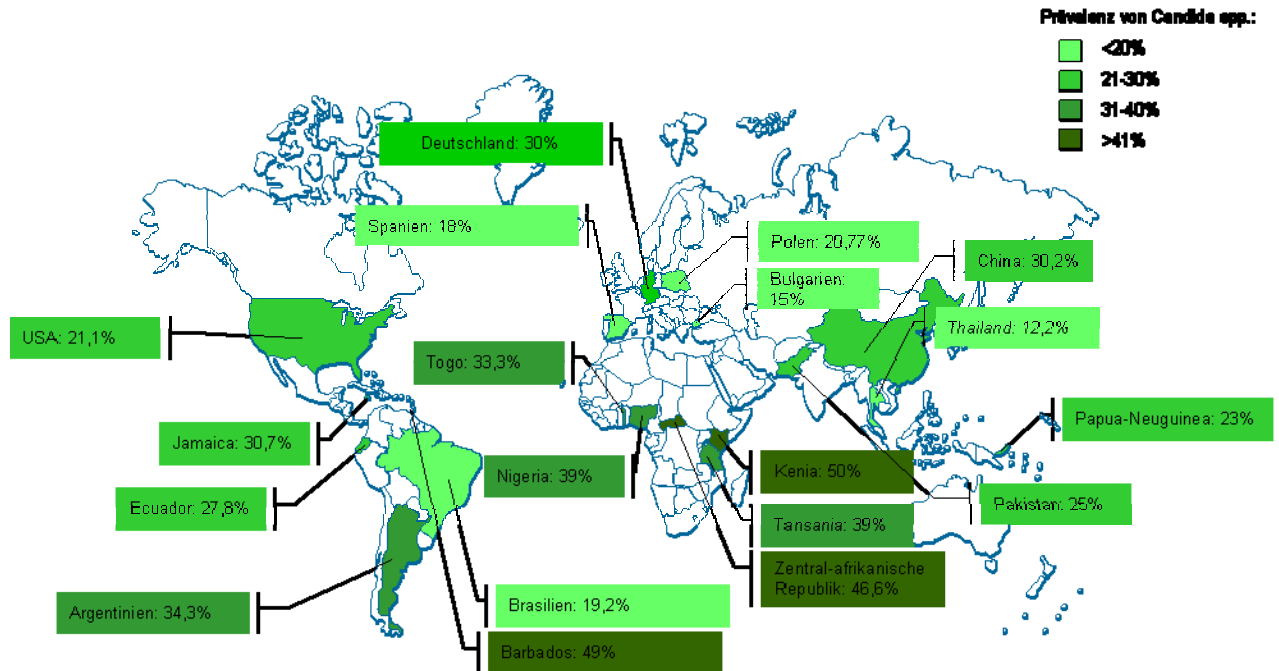


Abbildung 1 Prävalenz von Kolonisation und Infektion der Vagina mit *Candida* spp. in verschiedenen Ländern. Quellen: Fonck, Bartolomeo, Ito Vitella, Blankhart, Bayo, bu-Elteen, Balaka, Mayaud, Levett, Kukner, Klufio, Kamara, Thongkrajaj, Simoes, Peterek, Lisiak, Aboyeji, Akerele, Weissenbacher, Yim, Claeys, Hidalgo, (2;3;8;10;13;21;25;31;51;61;66;68;72;73;77;83;91;104;124;138;143;169)

Die Unterschiede in der Prävalenz sind nicht nur auf unterschiedliche Risikogruppen und Untersuchungsmethoden zurückzuführen, sondern auf tatsächliche Variationen in verschiedenen Populationen. So wurden z.B. ethnische Variationen in den Besiedlungsraten beobachtet (164). Studiendesign, Stichprobenumfang, Nachweismethode und Risikofaktoren für die Entstehung von Candidosen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2 Prävalenz des Nachweises von *Candida spp.* in verschiedenen Ländern

Autor, Land, Publikationsjahr	Stichprobe (n)	Prävalenz (%)	Nachweis-Methode	Risikofaktoren	Studientyp
Bartolomeo, Argentina, 2001	198	34,3	Kultur	Schwangere mit Symptomen	QS*
Levett, Barbados, 1995	91	49	Kultur	n.a.	QS*
Simoës, Brasilien, 1998	328	19,2	Mikroskopie	Keine Risiken	QS*
Todorova, Bulgarien, 2002	1330	15	n.a.	Keine Risiken	QS*
Yim, China, 1995	367	30,2	n.a.	n.a.	QS*
Kamara, Jamaika, 2000	269	30,7	n.a.	n.a.	QS*
Fonck, Kenya, 2000	334	50	Kultur	Schwangere mit Symptomen	QS*
Aboyeji, Nigeria, 2003	230	37,8	n.a.	n.a.	QS*
Akerele, Nigeria, 2002	300	39	Kultur	Keine Risiken	QS*
Kukner, Pakistan, 1995	98	25	Mikroskopie, Kultur	n.a.	Therapiestudie
Klufio, Papua NG, 1995	206	23	Kultur	79% symptomatisch	QS*
Peterek, Polen, 2003	106	15,1	Mikroskopie	Keine Risiken	QS*
Lisiak, Polen, 2000	10,825	22,7	Kultur	Keine Risiken	QS*
Spanien, Bayo, 2002	623	10	Kultur	Keine Risiken	QS*
Ito Vilella, Spanien, 2000	549	18	Kultur	Keine Risiken	Retrospektive Erhebung
Mayaud, Tansania, 1998	660	27	Kultur	Keine Risiken	QS*
Thongkrajaj, Thailand, 1999	514	12,2	Kultur	Keine Risiken	QS*
Balaka, Togo, 2003	306	33,3	Mikroskopie und Kultur	Keine Risiken	QS*
Blankhart, ZAR, 1999	481	46,6	Kultur	12,1% HIV+	QS*

* Querschnittstudie

1.3 Mechanismen, die die Entstehung von Candidosen in der Schwangerschaft begünstigen

Während der Schwangerschaft führen die Änderungen im hormonellen Status zu Änderungen der vaginalen Mikroflora. Die Konzentration von Laktobakterien erhöht sich auf das 10-fache, während die Konzentration von anaeroben Keimen sinkt (163). Dies führt zur erhöhten Freisetzung von Glykogen mittels Zytolyse von Vaginalepithelzellen durch Laktobakterien. Glykogen liefert die Nahrungsquelle für *Candida spp.* und führt dadurch zur Vermehrung des Mikroorganismus. In diesem Prozess spielt der Östrogenisierungsstatus eine wichtige Rolle, da ein hoher Östrogengehalt in der Schwangerschaft zur Verdickung der Vaginalepithelschicht führt. Zusätzlich produziert *Candida albicans* ein östrogenbindendes Protein und intrazelluläre Rezeptoren für Östrogene. Diese Tatsachen erklären den kumulativen Effekt auf die Erhöhung der Virulenz von *Candida spp.* (26;49;162). Es wurde auch in einer Studie von Hillier et al. beschrieben, die die Vaginalflora von 7.918 Schwangeren untersuchte und herausfand, dass *Candida spp.* bei Frauen mit normaler oder intermedialer Mikroflora isoliert wurden und seltener bei Bakterieller Vaginose vorkamen (161).

1.4 Folgen der Kolonisation mit *Candida spp.* für die Mutter und das Kind

Es konnten bisher keine Beweise geführt werden, dass eine Kolonisation der Mutter mit *Candida spp.* während der Schwangerschaft für das Kind harmlos ist (146).

Eine Besiedlung ist auch für die Mutter nicht ohne Bedeutung.

Daniels et. al. demonstrierten, dass eine asymptomatische vaginale Kolonisation während der Schwangerschaft ein Risikofaktor für die spätere Entwicklung von Vulvovaginalcandidosen darstellt. Dies macht weitere Forschungen von Wachstumsregulation und Virulenz der Mikroorganismen notwendig (30). Nablanski et al. haben die höhere Wahrscheinlichkeit des

Auftretens von Verletzungen des Geburtskanals bei Frauen mit symptomatischer Candidose zur Zeit der Geburt beschrieben. Diese Verletzungen sind auf lokale Entzündungsprozesse zurückzuführen (99).

Invasive Pilzinfektionen, die zum größten Teil von *Candida spp.* verursacht sind, nehmen in den letzten 20 Jahren in der Population von Frühgeborenen stetig zu, was auf die Unreife des Immunsystems zurückzuführen ist. Die Inzidenz solcher Infektionen in der Gruppe der Neugeborenen unter 1500g wird auf 4% und in der Gruppe unter 1000g auf 10% geschätzt. Candidose ist in 2% der Fälle die Todesursache (92;96).

Die Fortschritte von peri- und neonatologischer Betreuung führten zu einer höheren Überlebenschance sehr kleiner Frühgeborener, was die Problematik der Candidosen während der Schwangerschaft zu einem nicht zu übersehenden Thema macht (15).

Ein großes Problem stellt die Transmission von *Candida spp.* während der Geburt auf das Kind dar, die zur Kolonisation von Neugeborenen führt. Diese Kolonisation ist nicht nur für Frühgeborene von Bedeutung, sondern auch für am Termin geborene Kinder, da *Candida spp.* während des ersten Lebensjahres obligat-pathogen ist. 90% aller Kinder, die innerhalb der ersten Lebenswoche kolonisiert waren, entwickeln eine Candidose mit dem Häufigkeitsgipfel von 10 % in der 3. Lebenswoche (14;96). Bei einigen Neugeborenen kann kongenitale Candidose entstehen, die in lokaler und systemischer Form beschrieben ist (105). Am häufigsten entwickelt sich Oralcandidose, gefolgt von Anogenitalcandidose. Selten kommt Pneumonie, Meningitis sowie durch *Candida spp.* verursachte Mikroabszesse in der Lunge und Leber vor. Sehr ernstzunehmende potenzielle Komplikationen sind Candidämie, Sepsis und systemische Candidose. Obwohl die meisten Episoden von septischen Syndromen mit einem Aufenthalt der Neugeborenen auf der Intensivstation verbunden und auf katheterinduzierte

Infektionen zurückzuführen sind, kann intrapartale Kolonisation als Übertragungsweg nicht ausgeschlossen werden(75;167).

Makhoul et al. haben gezeigt, dass 30% aller sehr kleinen Frühgeborenen in Israel Sepsis entwickeln. Die Mortalität im Falle der *Candida*-Sepsis in der Gruppe der sehr kleinen Frühgeborenen beträgt 27,6% und ist vergleichbar mit der Mortalität im Falle von gramnegativer Sepsis und wesentlich höher als bei grampositiver Sepsis (8,7%) (84).

Die Frage, welcher Übertragungsweg von *Candida spp.* (vertikal während der Geburt oder nosokomial durch Pflegepersonal) mehr Bedeutung hat, untersuchten die Arbeitsgruppen von Willinger et al. und Waggoner et al. Sie haben die Kulturen von Wöchnerinnen und Ihrer Kinder mittels DNA-Analyse verglichen und festgestellt, dass der überwiegende Teil von Mutter-Kind Paaren mit den gleichen Genotypen kolonisiert wurde bzw. dass diese Kolonisierung während der Geburt stattgefunden hatte (142;148). Es wird vermutet, dass 70-85% der Schwangeren, die mit *Candida spp.* kolonisiert sind, diesen Mikroorganismus während der Geburt auf das Neugeborene übertragen. Bei durchschnittlicher Prävalenz der Kolonisation der Vagina mit *Candida spp.* von 25-30% erhalten 22-24% aller Kinder diesen Mikroorganismus sub partu. Aus diesem Grund wird empfohlen, präpartale Prophylaxe mit lokalen Antimykotika und Prophylaxe bei Neugeborenen, die Risiken für eine Candidose aufweisen, anzuwenden (14).

Nalbanski et al. wiesen darauf hin, dass Frühgeburten im Falle von Candidose nicht ausgeschlossen sind (99).

Eine Kohortenstudie aus Finnland zeigte den Zusammenhang zwischen vaginalen Infektionen während der Schwangerschaft und einer späteren Entwicklung von Asthma bei Kindern. Die Prävalenz von Asthma betrug 4,5% in der Gruppe mit Vaginitis sowie 3,2% in der Gruppe ohne Vaginitis ($p=0,008$). 87,4% aller Frauen mit Vaginitis hatten Candidose. Das adjustierte

Oddsratio (aOR) für Asthma bei Candidosen in der Schwangerschaft im Vergleich mit Müttern ohne Vaginitis betrug 1,33 (KI 1,01; 1,75). (160).

Gurgan et al. haben in Experimenten in vitro mit mittels Sectio gewonnenen Fetalmembranen gezeigt, dass nur *C. albicans* in der Lage ist, die mütterliche Seite zu penetrieren und eine Degeneration von Fetalmembranen zu verursachen. *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida pseudotropicalis* und *Candida glabrata* hatten diese Fähigkeiten dagegen nicht (60). Die Inzidenz einer Invasion in die amniotische Höhle beträgt nur 0,8-2% und führt nur selten zu einem klinisch relevanten Chorioamnionitis. Friebe-Hoffman et. al. berichteten von intrauteriner *Candida albicans* Sepsis mit Chorioamnionitis, was zum Tod des Fötus geführt hat (52;165).

Obwohl Candida-Chorioamnionitis selten vorkommt, muss das Kind sehr aufmerksam untersucht werden, wenn in der Plazenta und auf der Nabelschnur weiße Mikroabszesse nachgewiesen werden (32).

Quershi et al. berichteten über 32 Fälle von Candidose der Nabelschnur, der als unterschiedlich großer, gelb-weißer Nodules auf der Oberfläche der Nabelschnur beschrieben wurde und mikroskopisch Mikroabszessen mit Erregern darstellte. In allen Fällen wurde Chorioamnionitis diagnostiziert. 75% dieser Fälle waren Frühgeborene, 5 (16%) Föten hatten kongenitale Candidose, 5 (16%) Mütter hatten intrauterine Fremdkörper, einschließlich IUP und zervikale Zerklage. Die Diagnostik von Nabelschnurcandidose sollte zu einer sorgfältigen Untersuchung des Kindes führen, obwohl eine kongenitale Candidose nur selten vorkommt (106).

1.5 Struktur des Immunsystems

Das Immunsystem schützt unsere Körper vor der breiten Reihe der Infektionserreger. Dazu sind im Evolutionsprozess die Mechanismen der primären und adaptiven Immunantwort entstanden. Auf eine erste Begegnung mit einem Infektionserreger wird dieses zunächst im Rahmen der angeborenen oder primären Immunantwort von den antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen und in die Lymphknoten transportiert. Dort wird

ein erregerspezifisches Antigen nach der intrazellulären Verarbeitung an der Oberfläche der APC präsentiert. Dieser antigen-unspezifische Mechanismus wird innerhalb von wenigen Stunden nach der Begegnung mit einem Erreger aktiviert. APC synthetisieren nach der Phagozytose von Erregern eine ganze Reihe von proinflammatorischen Zytokinen, unter denen $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6 und IL-12, die adaptive Immunabwehr beeinflussen (103;116;140).

Bei adaptiver oder spezifischer Immunabwehr werden antigenspezifische Mechanismen aktiviert, was einige Tage dauert (22). Das adaptive Immunsystem besitzt zwei Eigenschaften, die es vom primären Immunsystem unterscheiden: 1. klonale Selektion von Zellen, die zur Expression von antigenspezifischen Rezeptoren fähig sind und 2. das immunologische Gedächtnis, das schnellere und effektivere Reaktionen zur Eliminierung von Antigenen, mit denen der Körper schon kontaktiert wurde, ermöglicht (46).

In Rahmen der adaptiven Immunabwehr werden die humorale und zellvermittelte Immunantwort unterschieden. Die humorale Immunantwort wird durch Antikörper vermittelt. Diese Antikörper werden von Plasmazellen sezerniert, die aus B-Lymphozyten nach ihrer Aktivierung entstehen. Die Antikörper binden Antigene und blockieren damit ihre Interaktion mit Zielzellen. Zusätzlich aktivieren sie das Komplementsystem und Opsonierung des Antigens (4;9;12;110).

Die zellvermittelte Immunabwehr wird durch T-Lymphozyten koordiniert und schließt die Produktion von zytotoxischen T-Lymphozyten, aktivierten Makrophagen, aktivierten NK-Zellen und Zytokinen als Reaktion auf Antigen ein.

T-Lymphozyten spielen eine sehr wichtige Rolle in der Koordination der spezifischen Immunabwehr und dienen als Hauptquelle von Zytokinen.

In der Population der T-Lymphozyten kann man je nach Funktion die Subpopulationen von T-Helferzellen (Th), T-Supressorzellen und zytotoxischen T-Zellen unterscheiden. T-Lymphozyten werden phänotypisch

in zwei Untergruppen, CD4⁺ und CD8⁺, aufgeteilt. Die CD4⁺ T-Lymphozyten erkennen mit ihren Rezeptoren Antigenfragmente, die an einen MHC-Klasse II Rezeptor gebunden sind. Da dieser Rezeptor nur auf den antigenpräsentierenden Zellen (APC), u.a. dendritischen Zellen, B-Lymphozyten, aktivierten Makrophagen und Langerhans-Zellen der Haut, vorkommt, interagieren CD4⁺ T-Lymphozyten im Rahmen einer Immunantwort mit diesen APC. CD8⁺ T-Lymphozyten dagegen interagieren mit allen kernhaltigen Zellen des Makroorganismus, da sie alle MHC-Klasse I Rezeptoren an ihrer Oberfläche enthalten (110).

CD4⁺ T-Lymphozyten werden aufgrund ihrer Zytokinsekretion in zwei weitere Subtypen, Typ-1-T-Helferzellen (Th1-Zellen) und Typ-2-T-Helferzellen (Th2-Zellen), aufgeteilt. Diese Subtypen entstehen bei Aktivierung der naiven CD4⁺-Zellen. Th1-Zellen produzieren IL-2, IFN- γ und TNF- β , Th2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. IL-3 und TNF- α werden von beiden Zelltypen produziert. Th-1 Zellen tragen zur zellvermittelten, Th-2 Zellen zur humoralen Immunantwort bei (9).

Fast alle Arten der Immunantwort werden entweder durch T-Helfer Typ 1 oder Typ 2 gesteuert. Dies ist von Individuum zu Individuum verschieden, es spielen genetische Besonderheiten, die Stufe des Infektionsprozesses und die Menge und Herkunft des auslösenden Agents eine Rolle. Obwohl Zytokine in vielen Zelltypen produziert werden, stellen Th-Zellen die Hauptquelle der Zytokinproduktion dar (7;107).

Während der Schwangerschaft variiert die Zytokinproduktion abhängig vom Gestationsalter. So ist eine Th-2 Antwort für das Erhalten der Schwangerschaft sehr wichtig (6;108). Diese Hypothese wird gestützt durch zahlreiche klinische Beobachtungen an Patientinnen mit Erkrankungen, die entweder mit Th-1 oder mit Th-2 Antwort in Zusammenhang stehen. Th-2-assoziierte Erkrankungen, wie HIV und systemischer Lupus erythematosus, verschlechtern sich im Laufe der Schwangerschaft. Die Symptomatik von Th-1-assoziierten Erkrankungen, wie Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis dagegen verbessert sich. Die höheren Konzentrationen von Th-2 Zytokinen in

der Gruppe mit unkomplizierten Schwangerschaften im Vergleich mit der Gruppe mit Spontanaborten, bei denen dafür die Konzentrationen von Th-1 Zytokinen höher waren, zeigt, dass die Th-2 Zytokine für das Erhalten der Schwangerschaft eine wichtige Rolle spielen (109;114).

1.5.1 Zytokine

Die Zellen des Immunsystems kommunizieren untereinander und mit Zellen anderer Organe über die Sekretion von Zytokinen.

Zytokine sind lösliche, meist glykosylierte Proteine, die von Immunzellen als auch von anderen Zellen gebildet und sezerniert werden. Sie regulieren autokrin, parakrin oder endokrin die Immunabwehr der unterschiedlichsten Zielzellen nach Bindung an ihre zelloberflächenständigen Rezeptoren. Sie wirken als Wachstumshormone und aktivieren und deaktivieren verschiedene Zellen. So beeinflussen sie die Bildung von weiteren Zytokinen. Die Wirkungsrichtung kann synergistisch und antagonistisch sein. Zytokine führen zur Induktion von Proliferation und Differenzierung der Zielzelle. Sie regulieren die Immunantwort indem sie eine Sekretion von anderen Zytokinen auslösen oder stoppen. Im Weiteren werden Zytokine beschrieben, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden (98;112).

1.5.1.1 Interleukin-1 (IL-1)

Von Interleukin-1 (IL-1) sind zwei Formen beschrieben: IL-1 α und IL-1 β , die zwar in ihrer Aminosäuresequenz nur um 26% übereinstimmen, jedoch an die gleichen Rezeptoren binden und deshalb identische biologische Wirkungen entfalten. IL-1 wird vorwiegend von Makrophagen und Monozyten, aber auch von Endothelzellen, B-Zellen, Fibroblasten und neutrophilen Granulozyten sezerniert. IL-1 wirkt insgesamt proinflammatorisch. Die Produktion von IL-1 kann durch bakterielle Endotoxine, Pilze und andere Zytokine (TNF- α) stimuliert werden. Es wirkt als Mediator lokaler Entzündungen, aktiviert T-Zellen, steigert die Proliferation von B-Zellen und die zytotoxische Aktivität

von NK und wirkt als starker Chemoattraktant für Leukozyten. IL-1 führt zu Freisetzung von IL-6 und IL-8. In dieser Studie untersuchtes IL-1 β ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 17 kDa. IL-1 β wird auch in Zervix produziert, wo es die Synthese von Kollagenase und Elastase fördert (128;154).

1.5.1.2 Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra)

Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra) ist ein glykosyliertes Protein mit Molekulargewicht 23-25 kDa, das von Monozyten und Makrophagen sezerniert wird. Es bindet an Rezeptoren (Typ I sowie Typ II) für IL-1 α und IL-1 β , initiiert aber keine Signaltransduktion und wirkt dadurch antagonistisch zu IL-1. IL-1ra gehört zu den antiinflammatorischen Zytokinen. Die Konzentration von IL-1ra ist während des 3. Trimesters im Fruchtwasser erhöht. IL-1ra wird in Amnion, Chorion und Dezidua synthetisiert (50;153).

1.5.1.3 Interleukin-4 (IL-4)

Interleukin-4 (IL-4) ist ein Glykoprotein mit Molekulargewicht 15-19 kDa. Es wird von einer Subpopulation der ausgereiften CD⁺ Th2-Zellen und Mastzellen produziert. IL-4 hemmt die Synthese von IL-1, IL-6 und IL-8 und zeigt damit antiinflammatorische Eigenschaften. IL-4 hat auch einige proinflammatorische Fähigkeiten, so fördert es zum Beispiel die Proliferation und Differenzierung von aktivierten B-Zellen und stimuliert so die Synthese von Antikörpern, führt zur vermehrten Synthese von Oberflächenproteinen (MHS-Klasse II) in ruhenden B-Zellen, die der Antigenpräsentation dienen, wirkt als Wachstumsfaktor auf T-Zellen und unterstützt die Reifung von Mastzellen. Wegen seiner pleiotropen Wirkung spielt IL-4 eine wichtige Rolle im Zytokinnetzwerk und ist in die Mechanismen der Allergie involviert, da es die Synthese von IgE stimuliert (86;136).

1.5.1.4 Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Polypeptid mit Molekulargewicht von ca. 26 kDa. Es wird von T- und B-Zellen, Monozyten, Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, Mesangialzellen und Astrozyten synthetisiert und sezerniert. IL-6 reguliert das Wachstum und die Differenzierung von vielen Zelltypen. Dieses proinflammatorische Zytokin ist der Hauptmediator der Akuten-Phase-Reaktion. Im Gegensatz zu IL-1 induziert IL-6 keine Zytokinexpression, sondern wirkt auf die Zellantwort. IL-6 führt zur Differenzierung von B-Zellen, der Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber und der Synthese von Glykokortikoiden.

IL-6 dient als Hauptmediator in der Immunabwehr von Infektionen. Er wird in Stromazellen in Endometrium, dezidualen Zellen und Makrophagen als Antwort auf IL-1 und TNF- α Sekretion sezerniert. IL-6 kann während der normalen Schwangerschaft in niedrigen Konzentrationen im Fruchtwasser während des 2. und 3. Trimesters bestimmt werden. Während der Spontangeburt am Termin steigt die IL-6 Konzentrationen deutlich, was auf eine verstärkte Sekretion der Amnion- bzw. Chorionzellen an IL-6 und Prostaglandin-E₂ bei intrauteriner Aktivierung zurückzuführen ist. IL-6 und Prostaglandin-E₂ kann von allen gestationsspezifischen Geweben (Amnion, Chorion, Dezidua und Trophoblast) gebildet werden (59;64;122).

1.5.1.5 Interleukin-8 (IL-8)

Interleukin-8 (IL-8) ist ein Glykoprotein mit Molekulargewicht von 8 kDa (129). IL-8 wird von aktivierten Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und NK sezerniert. Dieses Zytokin wirkt proinflammatorisch und ist als starkes Chemoattraktant für neutrophilen Granulozyten, Basophilen und T-Zellen bekannt. IL-1 steigert die Synthese von IL-8, während IL-4 seine Produktion hemmt.

IL-8 spielt eine wichtige Rolle im Reifungsprozess der Zervix und dementsprechend in der Geburtsauslösung. Dadurch kann IL-8 wie

Prostaglandine für die pharmakologische Geburtseinleitung verwendet werden (18;70;130).

1.5.1.6 Interleukin-10 (IL-10)

Interleukin 10 (IL-10) ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 18 kDa. Er ist als „Cytokine Synthesis Inhibitory Factor“ bekannt. IL-10 wird durch Monozyten aber auch durch T-Lymphozyten und B-Zellen produziert. IL-10 führt zur Suppression der Sekretion von IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12 und trägt dadurch zur Regulation der Frühphase der Entzündung bei, indem es sie hemmt.

Die Produktion von IL-10 in T-Zellen wird von IL-12, IL-4 und IL-10 gesteigert. Die monozytare Produktion von IL-10 dagegen wird von IL-4 und IL-10 inhibiert.

IL-10 stimuliert die Synthese von IL-1ra. Diese Tatsachen zeigen, dass IL-10 eine Verschiebung der Produktion von proinflammatorischen zu antiinflammatorischen Mediatoren induziert (27;87;93).

1.5.1.7 Interleukin-12 (IL-12)

Interleukin-12 (IL-12) ist ein Lymphokin mit einem Molekulargewicht von 75 kDa. Es wird von Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen sezerniert. IL-12 besteht aus zwei Heterodimeren mit 40 kDa und 35 kDa. IL-12 ist nur in dimerisierter Form biologisch aktiv. IL-12 induziert die Expression von IL-10, die zur Suppression von IL-12 führt.

Die Hauptquelle von IL-12 in der Vagina sind APS, insbesondere Makrophagen. IL-12 wird schnell nach dem Auftreten einer Infektion produziert und wirkt proinflammatorisch, indem es die Synthese von $\text{INF}\gamma$ erhöht und Proliferation und Zytotoxizität von NK und T-Lymphozyten steigert (42).

IL-12 führt zur Senkung von IL-4 - aktivierter IgE-Synthese und wirkt damit antiallergisch.

IL-12 stimuliert Th1 Immunantwort, indem es die Produktion von $\text{IFN}\gamma$, von T-Lymphozyten und NK-Zellen steuert und IL-4-Synthese von Th2-Lymphozyten inhibiert. IL-12 induziert die Synthese von IL-8, IL-10 .(44;81)

1.5.2 Zytokine und *Candida spp.*

Die lokale Immunität spielt eine sehr wichtige Rolle in der Abwehr des Makroorganismus gegen Candidose. Dies wird durch anatomische Besonderheiten der Vagina ermöglicht.

Das Vaginalepithel besteht aus 5 Schichten, und einem System von intrazellularen Kanälen, welches die Migration von Zellen und Makromolekülen von Basallamina zur Vaginallumen ermöglicht. Basallamina enthält Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazyten, Langerhans-Zellen und Mastozyten. Die Konzentration von Zellen ist abhängig vom hormonellen Status. Der Nachweis von Zellen zeigt, dass in der Vagina eine lokale Immunantwort generiert werden kann (150).

Die Immunabwehr des Makroorganismus gegen Infektionen, die von *C. albicans* verursacht werden, wird hauptsächlich durch PMNL und Makrophagen gesteuert. Antigene von *Candida spp.* stimulieren die Proliferation von Lymphozyten und Zytokinsynthese, welche die candidazide Wirkung von Phagozyten aktivieren.

Experimente mit Zellkulturen demonstrierten, dass lebendige Stämme von *C. albicans* und *C. krusei* die monozytäre Produktion von IL-10, IL-1 β und TNF- α induzieren. *C. krusei* stimuliert auch die Synthese von IL-12, wobei *C. albicans* sie nur minimal beeinflusst (158). Die Attraktion von PMNL führt zur starken Expression von IL-8, moderater Stimulation von IL-1 β , IL-6 und Hypoproduktion von IL-10 im Gegensatz zur erhöhten Synthese dieses Zytokines in PMNL (115).

Es wird vermutet, dass die Virulenz von *C. albicans* auch auf dessen Fähigkeit zur Stimulation der monozytären Produktion von Typ 2 Zytokine

IL-10 mit selektiver Inhibition von IL-12 zurückgeführt werden kann, was eine effektive Immunabwehr Typ 1 einschränken kann (159).

Die Produktion von proinflammatorischen IL-6 in infizierten Zellkulturen steigt sehr stark im Vergleich mit Zellkulturen, die nicht mit *Candida spp.* infiziert wurden (126).

Mäuse, die IL-12 nicht produzieren, sind hochempfindlich für *Candida*-Gastroenteritis und produzieren eine erhöhte Menge an IL-4. Bei der Verabreichung von IL-12 stieg die Resistenz gegen eine *Candida*-Infektion (94).

Es wird vermutet, dass die Eigenschaft von *C. albicans*, ihre Morphologie zwischen hyphaler und filamentöser Form zu wechseln, den Hauptfaktor darstellt, der die Virulenz bestimmt (141). Diese Fähigkeit wird als Schlüsselfaktor des Wechsels von Kommensalismus zur Virulenz angesehen. Hyphen scheinen weniger effektiv als Hefezellen die Produktion von IL-8 und anderen Substanzen in Makrophagen zu stimulieren, was an der unterschiedlichen Struktur der Zellwand von Hyphae und Hefezelle liegt. Die Expression von Beta-1,6 Glucan an der Oberfläche von Hyphae ist wesentlich niedriger als die von Hefezellen. Dieses Polysaccharid gehört zur mächtigsten Chemokineninduktoren von *Candida albicans*. Deswegen kann die Minimierung der Induktion von Chemokinen durch den Wechsel zur hyphalen Form die Immunantwort des Makroorganismus auf *C. albicans* senken (139). Als einer der wichtigsten Faktoren einer Besiedlung und chronischen Infektion wird die Prostaglandinproduktion während der Infektion angesehen. Eine Quelle von Prostaglandine sind menschliche Zellen, die Erreger sind jedoch fähig, selber Prostaglandine zu produzieren, die zur erhöhten Synthese von IL-10 und Senkung der Produktion von anderen Zytokinen führen. Dadurch können Pilze die Immunantwort des Makroorganismus steuern. Dies ist wichtig für das Verstehen der Mechanismen chronischer Infektionen, da diesen Prostaglandine als Kofaktoren für die Krankheitsentwicklung dienen (101).

Mukosale Infektionen lösen Th-1 Zytokinsynthese aus, die eine protektive Wirkung gegen systemische Änderungen hat. Bei systemischen Candidosen bei Mäusen führt Th-1 Typ der Immunantwort (IL-2) zur Resistenz gegen Reinfektionen, Th-2 Typ der Immunantwort dagegen (IL-4, IL-6, IL-10) trägt zur Chronisation bei (5).

Die Persistenz von *Candida spp.* in der Vagina kann zur chronischen Aktivierung von vaginalen T-Zellen und Makrophagen führen was die Synthese von Zytokinen fördert (149).

2 Aufgabenstellung

Die Kolonisierung und Infektion der Vagina mit *Candida spp.* führt zur Aktivierung der zellvermittelten Immunabwehr. Eine Reihe von Studien mit nichtschwangeren Patientinnen zeigte, dass mehrere Zytokine in die Immunantwort des Makroorganismus auf diesen Erreger involviert sind. Es gibt nur wenige Studien, die die Konzentration der Zytokine auf lokalem Niveau im Laufe der Schwangerschaft beschreiben. In diesem Zusammenhang wurde in vorliegender Arbeit die Immunantwort im Vaginallavage und im Serum im Verlauf der Schwangerschaft untersucht. Dabei wurden folgende Fragen gestellt:

- Wie verändern sich die Konzentration von IL-1 β , IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 im Vaginallavage und im Serum bei intaktem Schwangerschaftsverlauf?
- Wie verändert sich die Konzentration von IL-1 β , IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 im Vaginallavage und im Serum bei Schwangeren mit Kolonisation der Vagina mit *Candida spp.*?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen Kolonisation der Vagina mit *Candida spp.* und dem Schwangerschaftsoutcome?

Da bei schwangeren Patientinnen nicht nur der symptomatischen Candidose, sondern auch einer asymptomatischen Besiedlung aufgrund der Übertragungsgefahr auf das Neugeborene eine Bedeutung zukommt, wurden in die Studie Schwangere mit folgenden Formen der Vaginalcandidose aufgenommen:

- Asymptomatische Formen
 - Kolonisation: Keinerlei Beschwerden, aber *Candida spp.* mittels kultureller Anzucht oder PCR nachgewiesen.
 - Latente Vaginalcandidose: Zu dem Zeitpunkt der Untersuchung keine Beschwerden und keine klinischen Symptome, aber mindestens eine

Episode von akuter Candidose in der Vergangenheit. *Candida spp.* mittels kultureller Anzuchtung oder PCR nachgewiesen.

- Rezidivierende Form:
 - Episoden der Candidose trotz antimykotischer Therapie in der Vergangenheit. Keine oder ganz leichte klinische Beschwerden während jetziger Schwangerschaft, wodurch von der Therapie abgesehen werden kann. *Candida spp.* mittels kultureller Anzuchtung oder PCR nachgewiesen.

3 Material und Methodik

3.1 Patientinnen

Diese prospektive longitudinale Beobachtungsstudie wurde in der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde des Universitätsklinikum Großhadern von März 2002 bis Oktober 2004 durchgeführt. Das Studienkollektiv bestand aus 134 Frauen mit Einlingsschwangerschaften, die zur Schwangerenvorsorge kamen. Alle Frauen wurden zwischen der 6. und 16. Schwangerschaftswoche (SSW) rekrutiert und zwischen der 24. und 28. sowie der 35. und 38. SSW nachuntersucht, um die entsprechenden Proben zu gewinnen.

Folgende Ausschlusskriterien galten zur Kontrolle für mögliche Confounder (Störfaktoren), die das Ergebnis verzerren könnten:

- Schwangere, die Medikamente für eine antibakterielle oder antimykotische Therapie 4 Wochen vor einem der drei Untersuchungstermine eingenommen hatten
- Schwangere, die bekannte Risiken für Frühgeburten wie Zervixinsuffizienz, Mehrlingsschwangerschaften, Plazentationsstörungen, fetale Missbildungen oder Uteruspathologie, Hypertonie, Diabetes mellitus oder Niereninsuffizienz aufwiesen
- Frauen mit einer Frühgeburt < 24. SSW in Anamnese (wegen der Vermutung, dass solche Schwangerschaftskomplikationen auf nicht diagnostizierte Zervixinsuffizienz zurückzuführen sind)
- Behandlung mit Medikamenten, die das Immunsystem beeinflussen (Kortikosteroide, Interferone, Zytostatika)
- Anamnestisch bekannter Immundefekt
- Anamnestisch bekannte maligne Erkrankungen (Akute Leukämie, n=1)
- Klinische oder anamnestische Hinweise auf Infektionen in den vorausgegangenen 14 Tagen

Darüber hinaus wurden Frauen mit nicht kompletten Untersuchungsergebnissen oder im Fall von lost to follow-up aus der Auswertung ausgeschlossen.

Die statistische Auswertung wurde mit Untersuchungsergebnissen von insgesamt 98 Schwangeren durchgeführt.

Es wurde die Anamnese bezüglich zurückliegender Schwangerschaften, bisherigem Schwangerschaftsverlauf, Allergien, somatischen Erkrankungen und Nikotinabusus berücksichtigt. Das Untersuchungsdatum und das Datum des errechneten Geburtstermins bzw. des aufgrund der Ultraschalluntersuchung korrigierten Termins wurden erfasst, um das Gestationsalter berechnen zu können.

Für die Bestimmung von Zytokinen bei der Kolonisation mit *Candida spp.* wurden die Gruppen je nach Befund bei PCR-Amplifikation bei jeder Untersuchung neu sortiert.

Für die Abschätzung von Zytokinkonzentrationen im Verlauf der Schwangerschaft wurden bei der ersten Untersuchung zwei Gruppen festgelegt. Die Studiengruppe bestand aus Frauen, bei denen im Rahmen der ersten Untersuchung eine Kolonisation mit *Candida spp.* nachgewiesen werden konnte. Keine der Patientinnen hatte subjektive Beschwerden. Schwangere, die während der ersten Untersuchung keine Kolonisation mit *Candida spp.* hatten, wurden in die Kontrollgruppe aufgenommen, unabhängig davon, ob im weiteren Verlauf der Schwangerschaft *Candida spp.* nachgewiesen wurde.

3.2 Proben

Alle Schwangere wurden über das Ziel der Studie, die benötigte Proben und die Datenschutzmaßnahmen aufgeklärt. Die Proben wurden bei allen Patientinnen auf gleiche Weise entnommen.

3.2.1 Blutproben

Von jeder untersuchten Person wurden nach freiwilligem Einverständnis 5 ml Venenblut abgenommen. Nachdem sich die Blutzellen abgesetzt hatten, wurde Plasma bei 10900 U/m. 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand für die spätere Bestimmung der Konzentrationen der Zytokine bei -70° C eingefroren.

3.2.2 Vaginalabstriche

Von jeder Schwangeren wurden insgesamt 3 Vaginalabstriche entnommen:

- für die sofortige Bestimmung des Reinheitsgrades im Nativpräparat
- für die Anreicherung von Hefezellen in Sabouraud-Flüssigmedium (Bio Merieux, Marcy l'Etoile / Frankreich) zur späteren mykologischen Untersuchung auf *Candida* spp.
- für die mikrobiologische Untersuchung auf pathogene Keime im mikrobiologischen Labor der Klinik

Nach dem Vaginalabstrich wurde eine Vaginallavage mit 2 ml 0,9% NaCl durchgeführt, indem die Lösung in die Vagina eingespritzt und mit einem sterilen Abstrichtupfer das Material von den hinteren und lateralen Scheidenwänden gesammelt und zurückgezogen wurde. Die dermaßen gewonnenen Proben wurden auf zwei Eppendorfgefäße verteilt, 5 min. bei 10900 U/m. zentrifugiert und der Überstand sowie der Pellet eingefroren. Alle Proben wurden innerhalb von 3 Stunden nach der Entnahme bearbeitet.

3.3 Kulturelle Anzuchtung

Für die primäre Anzuchtung wurde Sabouraud 2-% Glukose-Agar verwendet (Bio Merieux, Marcy l'Etoile / Frankreich, versetzt mit Gentamycin (0,1 g/l) und Chloramphenicol (0,05 g/l)). Alle Hefen der Gattung *Candida* wachsen auf diesem Medium als elfenbeinfarbene, meist glatte, unterschiedlich große Kolonien ohne Luftmyzel. Zuerst wurde der in den Sabouraud-Flüssig-Agar getauchte Watteträger 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen auf Sabouraud-Agarplatten überimpft, um diese für weitere 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C zu inkubieren. Im Falle eines positiven Kulturergebnisses wurden die Pilzkolonien zur weiteren Candidaspezifizierung auf eine CHROM-Agar-Platte überimpft, die im Dunklen aufbewahrt wurde (Becton Dickinson, Sparks / USA, BBL ChromagarTM Candida). Auf CHROM-Agar-Platten können *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* und *C. tropicalis* aufgrund ihrer Pigmentbildung, die durch Hydrolyse von chromogenen Substraten zustande kommt, voneinander unterschieden werden. Nach einer Inkubationszeit von 24-48 Stunden konnte durch, für die jeweilige *Candida*-Spezies typische Farbreaktion, eine Identifizierung der verschiedenen *Candida*-Stämme erfolgen:

<i>C. albicans</i>	grüne Kolonien
<i>C. glabrata</i>	rosa Kolonien
<i>C. tropicalis</i>	blaue Kolonien
<i>C. krusei</i>	hellrosa Kolonien

3.4 PCR

Für den molekularbiologischen Nachweis der unterschiedlichen Infektionserreger wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) genutzt, bei der ausgewählte Sequenzen in der DNA amplifiziert und detektiert werden.

Die PCR basiert auf wiederholten Zyklen von Denaturierung der Doppelstrang-DNA, der Anlagerung definierter Startermoleküle (Primer) und der Synthese neuer DNA-Stränge durch das Enzym Taq-Polymerase. Die so erfolgte Amplifikation der zu testenden Sequenz führt zu einer im Vergleich zu anderen Methoden deutlich höheren Sensitivität des Nachweises.

Die bisher beschriebenen PCR-Verfahren für den Nachweis von *Candida spp.* nutzen unterschiedliche Zielsequenzen, wie beispielsweise Abschnitte der nukleären als auch der ribosomalen DNA (5.8S und 2.8S ribosomale Regionen), multi-copy-Gen, die für das Aktin oder das Hitzeschockprotein 90 kodieren und das single-copy-Gen für das Enzym Cytochrom P-450-Lanosterol- α -Demethylase.

Jeder PCR-Nachweis besteht aus drei wesentlichen Arbeitsschritten:

- der Probenaufbereitung (DNA-Extraktion)
- der Amplifizierung geeigneter Zielsequenzen
- der Charakterisierung des amplifizierten Produkts

3.4.1 Vorbereitung der DNA der Candidazellen zur PCR (Candida processing)

Um die Candidazellen für die PCR und den Überstand für die Bestimmung der Zytokine zu gewinnen, wurde Vaginallavage gevortext, auf zwei Eppendorfgefäße verteilt und 2 Minuten bei 10900 U/m zentrifugiert. Danach wurde der Überstand auf zwei neue Eppendorfgefäße verteilt, abzentrifugierte Zellen wurden in 0,5 ml PBS aufgelöst und bei -70° C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren. Aufgetaute Proben wurden gevortext, zentrifugiert und

nach dem Verwerfen des Überstandes zweimal mit Aqua a.i. gewaschen, anschließend in 100 µl Lytikaselösung suspendiert und 1 Stunde bei 37° C im Wasserbad inkubiert, um die Zellwände von *Candida* zu zerstören. Dann folgte ein einmaliges Waschen mit PBS, indem der Überstand abpipettiert und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert wurde. Nach dem Zentrifugieren wurde jeder Sediment 10 Minuten mit 0,2 ml Tris-HCl Lysis-Puffer bei Raumtemperatur gelöst, um offene Zellwände zu brechen und DNA zu gewinnen. Zunächst wurden die Proben zweimal mit PBS gewaschen und nach dem letzten Dekantieren mit 10 µl Proteinase K und 240 µl NID Puffer gemischt, mit 2 Tropfen Mineralöl bedeckt und 1 Stunde bei 56° C in Thermocycler inkubiert. Diese Inkubation dient dem Abbau der zellulären Proteine und der Inaktivierung zellulären Nukleasen. Am Ende erfolgte die Erhitzung der Proben bis 96° C für 10 Minuten zur Inaktivierung der Proteinase K. Derart gewonnene DNA wurde bei -70° C für spätere PCR-Durchführung eingefroren.

3.4.2 *Candida* Primer

Die Primer für die PCR stammten von Invitrogen Life Technologies, Strathclyde, UK.

Es wurden die syntetischen Oligonucleotide Primer ITS3 5' und ITS4 3' mit den folgenden Sequenzen verwendet:

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

In den Proben wurde ein Großteil der 5.8S-ITS und ein geringerer Teil der 2.8S-ITS ribosomalen DNA Regionen amplifiziert, wodurch Produkte mit 330 bp für *C. albicans* und 410 bp für *C. glabrata* entstanden.

Die in Pulverform gelieferten Primer wurden vor Durchführung der PCR in sterilem Wasser aufgelöst und in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt.

3.4.3 PCR-Mischung für Candida-PCR

Der Master-Mix für Candida-PCR wurde nach folgendem Schema hergestellt:

Reagenzien	Volumina (μ l)
H ₂ O	6,75
MgCl ₂	3,00
10xPuffer	5,00
NTP`s	8,00
ITS3 5`Primer	1,00
ITS4 5`Primer	1,00
Taq-Polymerase	0,25
Gesamtvolumen	25,00

Jede PCR wurde mit 4 positiven Kontrollen (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) und einer negativen Kontrolle (steriles Wasser) durchgeführt.

25 μ l Master-Mix, 5 μ l aufbereiteter Patientenprobe oder Candida-DNA für positive Kontrolle und 20 μ l Aqua a.i. bzw. 25 μ l Aqua a.i. für die negative Kontrolle je Ansatz wurden in jedes Eppendorfgefäß einpipettiert, wodurch sich ein Gesamtvolumen von 50 μ l ergab.

PCR wurde mit 40 Zyklen durchgeführt:

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

Am Ende des letzten Zyklus wurden die Proben auf 4°C gekühlt (11;23;85;120;147).

3.4.4 Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der PCR-Produkte wurde 1,5%-iges Agarosegel (0,5 x 15 x 10 cm) verwendet. Die Agarose wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle in 1XTBE-Puffer vollständig gelöst und nach leichter Abkühlung und Zugabe von 3µl Ethidiumbromid (1%) in eine Gelschale gegossen. Als Laufpuffer wurde 1XTBE-Puffer verwendet. Als Molekulargewichtsmarker wurde die Mischung aus 9µl 1XTE-Puffer, 2µl DNA-Auftragspuffer und 0,2µl DNA-Längenstandard benutzt. 2µl Bromphenolblaulösung wurden mit jeweils 9µl der Proben versehen und hiervon ebenfalls 9µl in die dafür vorgesehenen Vertiefungen gegeben. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte bei konstanter Spannung von 300 Volt und einer Stromstärke von 120 mA für 20 min. Nach den Elektrophoresen wurden die Ethidiumbromid-DNA-Banden auf den Gelen unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera fotografiert.

3.5 Zytokinbestimmung

Die Konzentrationen der folgenden Interleukinen (IL) wurden im Vaginalsekret und Serum mit den jeweiligen ELISA-Kits von Biosorce International, Camarillo, CA/USA bestimmt:

IL-1 β , IL-1 ra, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12.

3.5.1 Das Wirkungsprinzip eines ELISAs (Enzyme-linked-immunosorbent-assay)

Die Patientenproben und Standards werden auf eine mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (AK) gegen das entsprechende Protein beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Wenn das gesuchte Protein in der Probe vorhanden ist, entstehen an der Platte haftende Antikörper-Protein Komplexe, die mit aufpipettierten biotinierten sekundären monoklonalen Antikörpern aus der löslichen Phase AK-Protein-AK Komplexe bilden. Die Platten werden mit der Klebfolie geschützt und inkubiert. Ungebundene

Moleküle werden beim folgenden Waschvorgang entfernt. Danach wird Enzym Streptavidin-Peroxydase zugegeben, das zur Bildung eines vierteiligen „Sandwiches“ führt. Nach der zweiten Inkubation und dem zweiten Waschvorgang, um die überflüssigen sekundären Antikörper zu eliminieren, wird Substratlösung dazu pipettiert, die sich an die entstandenen Komplexe bindet und dann in einem weiteren Schritt mit entsprechendem Farbsubstrat sichtbar gemacht wird. Die Intensität von Farbe ist direkt proportional zur Konzentration von entsprechenden Proteinen in der Probe. Die optische Dichte der Lösung wird mit einem Spektralphotometer bestimmt und in Bezug zur Standardverdünnungsreihe gesetzt, um die Konzentrationen des Interleukins in den Proben zu berechnen.

3.5.2 Protokoll der Zytokinbestimmung mittels ELISA

3.5.2.1 Reagenzien

- IL-1 β , IL-1 r.a., IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 Antikörper-beschichtete Mikroplatten
- Humanes IL-1 β , IL-1 ra, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 Standard (Std) Puffer zur Verdünnung des Standards
- IL-1 β , IL-1 ra, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 Biotin Konjugat
- Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- Lösung zur Verdünnung der Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- Gepufferte Waschlösung (25xKonzentrat)
- Tetramethylbensidin (TMB) – Substratlösung
- Stopplösung
- Klebefolie

3.5.2.2 Vorbereitung von Reagenzien

Standardlösungen

Zur Herstellung der Standardlösungen wurden die entsprechenden IL-Standards in der auf der jeweiligen Flasche angegebenen Menge Standardpuffer aufgelöst. Zunächst erfolgte eine Mischung des aufgelösten Standards mit einer entsprechenden Menge Puffer, so dass eine Standardlösung mit der Konzentration 500 pg/ml für IL-4, IL-6, IL-10 und IL-12, 1000 pg/ml für IL-8, 250 pg/ml für IL-1 β und 2000 pg/ml für IL-1 ra entstand. Dann wurde je eine Standardverdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen hergestellt:

IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, pg/ml	IL-1 β , pg/ml	IL-8, pg/ml	IL-1 ra, pg/ml
500	250	1000	2000
250	125	500	1000
125	62,5	250	500
62,5	31,2	125	250
31,2	15,6	62,5	125
15,6	7,8	31,2	62,5
7,8	3,9	15,6	31,25
0	0	0	7,8

Streptavidin-Peroxidase

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

Gepufferte Waschlösung

Eine Einheit des 25xWaschpufferkonzentrats wurde mit 24 Einheiten Wasser gemischt.

Alle weiteren Reagenzien wurden gebrauchsfertig geliefert.

3.5.2.3 Durchführung der Untersuchung

Alle Reagenzien und Proben wurden auf Raumtemperatur aufgewärmt.

Zuerst wurde eine ausreichende Zahl von Streifen mit je 8 Vertiefungen für Standards und Proben vorbereitet.

Je 50 µl (IL-1β, IL-8, IL-10, IL-12) oder 100 µl (IL-1 ra, IL-4, IL-6) wurden in die jeweiligen Vertiefungen einpipettiert. Anschließend wurden 50 µl (IL-4, IL-6, IL-1 ra) oder 100 µl (IL-1β, IL-8, IL-10, IL-12) entsprechende Ligandmarkierte Antikörperlösung hinzugefügt. Für die Bestimmung von IL-10 wurden die Proben und Standards vor diesem Schritt 2 Stunden mit einem Inkubationspuffer inkubiert. Die Platten wurden mit Klebefolie abgedeckt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 4 Absaug-Spül-Vorgänge mit je 400 µl Waschpuffer pro Vertiefung durchgeführt, um alle ungebundenen Moleküle zu entfernen.

Zunächst wurden 100 µl Streptavidin-HRP-Lösung pro Vertiefung pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem zweiten Waschvorgang wurden 100 µl TMB-Substratlösung hinzugefügt und die Platte wurde 30 Minuten in der Dunkelheit inkubiert. Die Reaktion wurde danach durch die Zugabe von 100 µl der Stop-Lösung pro Vertiefung angehalten, was zum Farbumschlag von blau nach gelb führte. Anschließend wurden innerhalb von 30 Minuten mit einem Spektralphotometer die optische Dichten bei einer Wellenlänge von 450 nm und einem Wellenlängeausgleich von 492 nm gemessen. Für eine Auswertung der Messergebnisse wurde eine Standardkurve erstellt und die optischen Dichten der Standards gegenüber ihren bekannten Zytokinkonzentrationen dargestellt. Aus den einzelnen optischen Dichten wurden die Konzentrationen der unbekannt Patientensproben ermittelt.

3.6 Statistische Analyse

Die Mittelwerte von normalverteilten Daten wurden mittels t-Tests für unverbundene Stichproben verglichen.

Die Ergebnisse der Zytokinmessungen waren nicht symmetrisch verteilt. Sie wiesen eine Schiefe und Wölbung auf, weshalb der Mann-Whitney U Test für unverbundene Stichproben bzw. der Vorzeichen-Rangtest von Wilcoxon für verbundene Stichproben für die Auswertungen verwendet wurde. Es wurden für alle Variablen Datenprüfungen sowie Plausibilitätsprüfungen durchgeführt. Alle Werte waren plausibel. Grobe Mess- oder Eingabefehler konnten nicht festgestellt werden.

Der p-Wert wurde auf 5% festgelegt und die Unterschiede mit $p < 0,05$ als signifikant bewertet.

Zur statistischen Bearbeitung wurde das Programm SAS 9.1 (Leibniz Rechenzentrum, München) angewendet (40).

4 Ergebnisse

4.1 Demographische Charakteristika

Die finale Auswertung wurde mit den Daten von 98 der ursprünglich 134 schwangeren Patientinnen durchgeführt. Gründe für ein Ausscheiden aus der Analyse waren unter anderem die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung, die asymptomatische bakterielle Infektionen nachweisen konnten, schwerer Harnwegsinfekt, induzierte Frühgeburt infolge Spätgestose und lost to follow-up.

Die relevanten demographischen und anamnestischen Parameter sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3 Demographische Charakteristika

	Candidagruppe	Kontrollgruppe	P-Wert
1. Untersuchung*	n=24	n=74	
Alter (Jahre)**	32,7±3,97	33,7±4,05	0,14
Gravidität**	2,1±1,6	1,9±0,9	0,55
Parität**	1,5±0,6	1,6±0,7	0,97
Gestationsalter bei der Entbindung**	38,5±1,7	38,4±2,0	0,87
Gewicht bei der Geburt**	3318,5±490,2	3194,4±618,6	0,54
2. Untersuchung	n=33	n=65	
Alter (Jahre)**	32,4±3,8	33,6±4,2	0,16
Gravidität**	2,14±1,5	1,95±0,8	0,4
Parität**	1,6±0,7	1,5±0,8	0,83
Gestationsalter bei der Entbindung**	38,6±1,6	38,3±2,0	0,76
Gewicht bei der Geburt**	3325,5±493,5	3190,4±579,6	0,48
3. Untersuchung	n=41	n=57	
Alter (Jahre)**	32,6±3,8	33,8±3,9	0,19
Gravidität**	2,09±1,5	1,96±0,9	0,6
Parität**	1,56±0,62	1,58±0,7	0,9
Gestationsalter bei der Entbindung**	38,4±1,8	38,5±1,9	0,82
Gewicht bei der Geburt**	3321,5±510,2	3178,4±603,6	0,51

* Die Werte gelten auch für die Auswertung von Konzentrationen der Zytokine im Verlauf der Schwangerschaft

** Mittelwert ± Standardabweichung

Die Studiengruppen sind gut vergleichbar und unterscheiden sich nicht bezüglich Alter, Gravidität, Parität, Gestationsalter bei der Entbindung und Geburtsgewicht des Kindes. Obwohl sieben Frauen in dem Patientenkollektiv eine Frühgeburt erlitten haben, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Candidagruppe und Kontrollgruppe festgestellt werden.

4.2 Candidanachweis

4.2.1 Kultur

Die Kolonisation der Vagina mit *Candida spp.* wurde mittels kultureller Anzuchtung auf Sabouraud-Agarplatten und im Falle positiver Ergebnisse auf CHROM-Agarplatten für die weitere Spezifizierung der Kolonien festgestellt. Zwischen *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* und *Candida tropicalis* konnte durch entsprechende Verfärbung der Kolonien unterschieden werden, wie es im Absatz 3.3 beschrieben ist. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der kulturellen Anzuchtung zusammengefasst.

Tabelle 4 Ergebnisse der kultureller Anzuchtung mit Candidaspezifizierung mittels CHROM-Agar in drei Schwangerschaftstrimestern

	<i>Candida</i> positiv, n (%)	<i>Candida</i> negativ, n (%)
1. Trimester (n=98)	18 (18,3)	80 (81,7)
<i>C. albicans</i>	13 (13,2)	
<i>C. glabrata</i>	5 (5,3)	
2. Trimester (n=98)	25 (25,5)	73 (74,5)
<i>C. albicans</i>	19 (19,4)	
<i>C. glabrata</i>	6 (6,1)	
3. Trimester (n=98)	30 (30,6)	68 (69,4)
<i>C. albicans</i>	24 (24,5)	
<i>C. glabrata</i>	6 (6,1)	

Während des 1. Trimesters wurden *Candida spp.* bei 18 (18,3%) der Frauen nachgewiesen, wobei in 13 (72,2%) Fällen *Candida albicans* und in 5 (27,8%) Fällen *Candida glabrata* gefunden wurde. Im 2. Trimester stieg die Nachweisrate auf 25,5% (25 Patientinnen), wobei 19 (76%) der Schwangeren *C. albicans* und 6 (24%) *C. glabrata* hatten. Im 3. Trimester wurden *Candida spp.* bei 30 (30,6%) Schwangeren gefunden, *C. albicans* hatten 24 (80%) und *C. glabrata* 6 (20%) Frauen. *C. krusei* und *C. tropicalis* wurden im Studienkollektiv nicht nachgewiesen.

4.2.2 PCR

Parallel zur mykologischen Untersuchung wurde mit jeder Probe eine Amplifizierung der genomischen DNA mittels PCR durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5 Ergebnis der PCR-Untersuchungen in drei Schwangerschaftstrimestern

	<i>Candida</i> positiv, n (%)	<i>Candida</i> negativ, n (%)
1. Trimester (n=98)	25 (25,5)	73 (74,5)
<i>C. albicans</i>	18 (18,1)	
<i>C. glabrata</i>	7 (7,4)	
2. Trimester (n=98)	33 (33,7)	65 (66,3)
<i>C. albicans</i>	25 (25,5)	
<i>C. glabrata</i>	7 (7,1)	
3. Trimester (n=98)	41 (41,8)	57 (58,2)
<i>C. albicans</i>	32 (32,6)	
<i>C. glabrata</i>	8 (8,2)	

Alle Proben, die bei der kulturellen Anzucht positiv waren, hatten auch ein positives PCR-Ergebnis. Dagegen sind einige Proben, die bei der kulturellen Untersuchung negativ waren, bei der PCR-Untersuchung positiv ausgefallen,

was auf sehr kleine Mengen von *Candida spp.* in den Proben und eine hohe Sensitivität der Methode zurückzuführen ist.

Während des 1. Trimesters waren in der Gesamtkohorte 25 Schwangere (25,5%) mit *Candida spp.* kolonisiert, 18 davon (72,0%) hatten *C. albicans* und 7 (28,0%) *C. glabrata*. 73 Schwangere wiesen keine Kolonisation auf. Im 2. Trimester konnte bei 33 (33,7%) Patientinnen eine Kolonisation der Vagina mit *Candida spp.* (25 (75,7%) mit *C. albicans*, 8 (24,3%) mit *C. glabrata*) festgestellt werden. 65 Schwangeren waren pilzfrei. Während des 3. Trimesters ist die Kolonisationsrate mit *Candida spp.* weiter gestiegen: 41 (41,8%) Patientinnen waren positiv für *Candida spp.* bei der PCR-Untersuchung, in 32 (78%) Fällen wurde *C. albicans* und in 9 (22%) Fällen wurde *C. glabrata* identifiziert. 57 Frauen wiesen bis Ende der Schwangerschaft keine Kolonisation mit *Candida spp.* auf.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse von kultureller Anzucht mit PCR-Amplifizierung wurde gezeigt, dass mittels PCR in 29,1%, 24,2% bzw. 26,8% der Fälle *Candida spp.* nachgewiesen wurde, wobei die kulturelle Anzucht negativ war.

Tabelle 6 Vergleich der Ergebnissen von kultureller Anzucht und PCR *Candida spp.* nachgewiesen

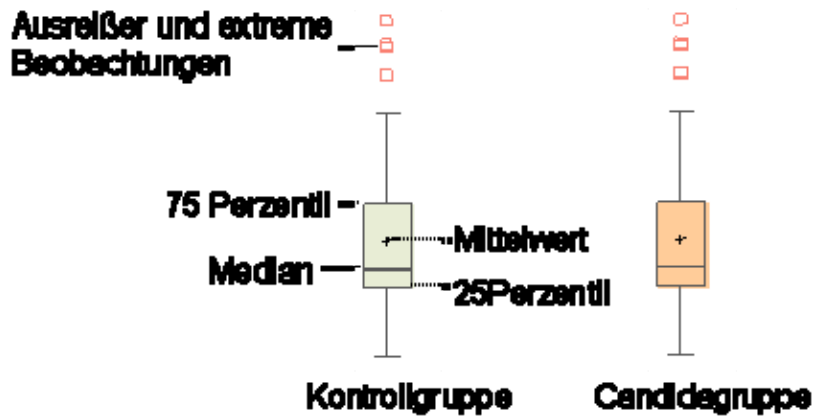
	1. Trimester, n (%)	2. Trimester, n (%)	3. Trimester, n (%)
Kultur	18 (18,3)	25 (25,5)	30 (30,6)
PCR	25 (25,5)	33 (33,7)	41 (41,8)

Diese Ergebnisse sind mit einer höheren Sensitivität der PCR-Methode zu erklären, die weniger Erreger in der Probe benötigt.

4.3 Bestimmung der Zytokine

Die Konzentrationen der Zytokine IL-1 β , IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 im Vaginallavage und im Serum werden im Folgenden erläutert.

Legende (für Abbildungen 2-15):



4.3.1 Interleukin-1 β im Vaginallavage und im Serum

Abbildung 2 zeigt im Vergleich die Konzentration von proinflammatorischem IL-1 β im Vaginallavage in den verschiedenen Schwangerschaftstrimestern bei Frauen mit und ohne Kolonisation mit *Candida spp.* Der Mann-Whitney U Test für unverbundene Stichproben ergibt einen hochsignifikanten Unterschied zwischen Candidagruppe und Kontrollgruppe im 1. ($p=0,0002$) und 3. Trimester ($p=0,0005$), wobei die Werte in der Candidagruppe höher liegen. Dagegen konnte im 2. Trimester kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,056$).

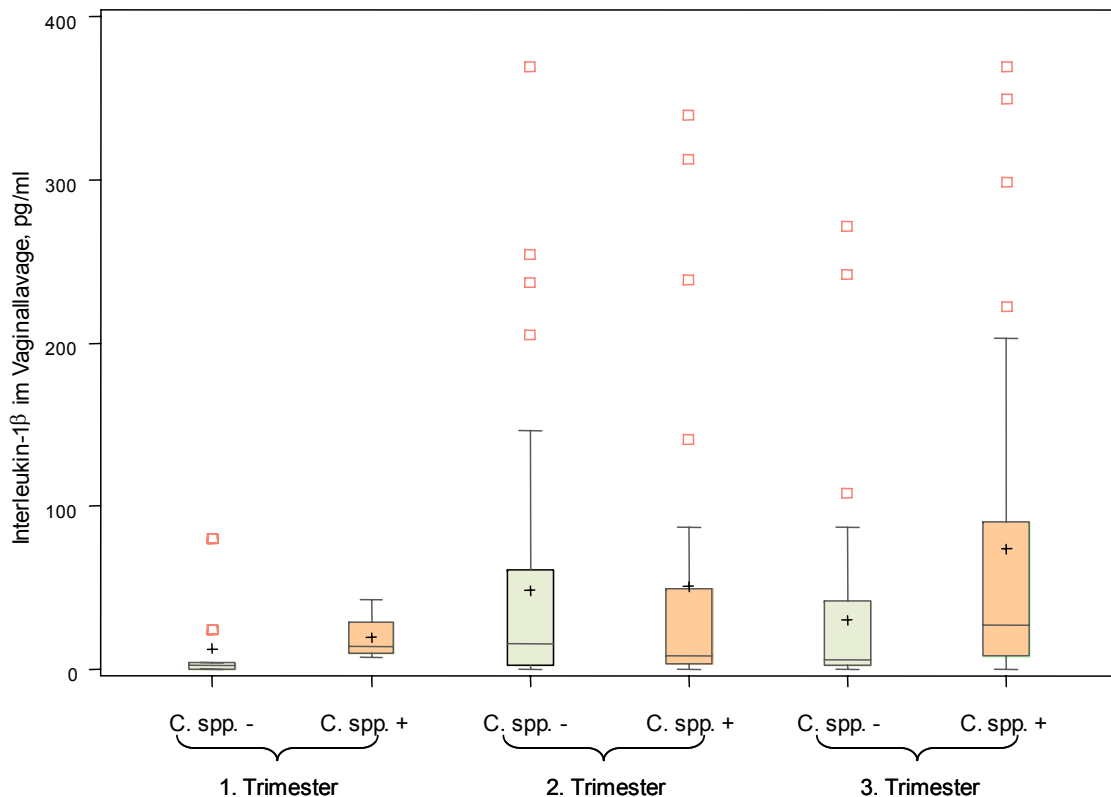


Abbildung 2 Konzentrationen von IL-1 β (pg/ml) im Vaginallavage in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit *Candida spp.*

Laut dem Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon für verbundene Stichproben sind die Werte in der Kontrollgruppe im 2. Trimester signifikant höher als im 1.

Trimester (Vorzeichen-Rang = 637; $p < 0,0001$). Dagegen konnten wir keinen signifikanten Unterschied in der Candidagruppe zwischen dem 1. und 2. Trimester finden (Vorzeichen-Rang = 93; $p = 0,073$). Ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ergibt sich zwischen dem 2. und 3. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1284; $p = 0,14$), dafür aber in der Candidagruppe, wobei die Werte im 3. Trimester höher liegen (Vorzeichen-Rang = 14; $p = 0,019$).

Tabelle 7 Vaginale Kolonisierung mit *Candida spp.* und Konzentrationen von IL-1 β im Vaginallavage

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-1 β	14,2 (10,25-29,05)*	3,2 (0,0-4,4)*	0,0002
n positiv	24 (100%)	56 (75,7%)	
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-1 β	7,9 (2,2-63,8)*	14,5 (2,9-73,8)*	0,056
n positiv	31 (93,9%)	56 (86,5%)	
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-1 β	27,4 (7,9-87,3)*	7,3 (2,3-34,0)*	0,0005
n positiv	40 (97,5%)	49 (85,9%)	

* Median (25-75 Perzentil)

Abbildung 3 zeigt im Vergleich die Konzentrationen von IL-1 β im Serum in beiden Gruppen. Der Mann-Whitney U Test für unverbundene Stichproben ergibt einen signifikanten Unterschied zwischen Candida- und Kontrollgruppen nur im 2. Trimester ($p=0,036$), aber nicht im 1. ($p=0,3$) und 3. ($p=0,29$) Trimester.

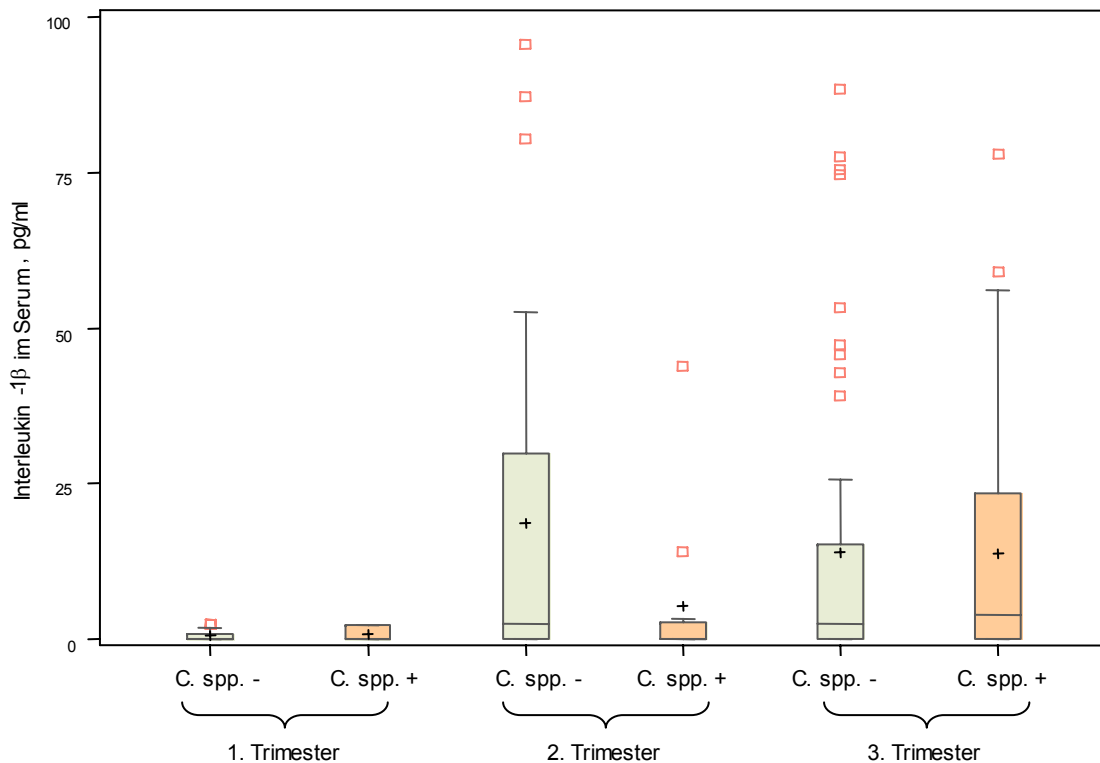


Abbildung 3 Konzentrationen von IL-1 β (pg/ml) im Serum in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit *Candida spp.*

Der Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon für verbundene Stichproben ergibt einen signifikanten Unterschied zwischen 1. und 2. Trimester in der Kontrollgruppe, wobei die Werte im 2. Trimester höher sind (Vorzeichen-Rang = 694; $p=0,0001$), jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 106; $p=0,34$). Ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ergibt sich zwischen 2. und 3. Trimester in der

Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1534; p=0,07) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 98; p=0,13).

Tabelle 8 Vaginale Kolonisierung mit *Candida spp.* und Konzentrationen von IL-1 β im Blutserum

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-1 β	0 (0,0-2,3)*	0 (0,0-0,9)*	0,3
n positiv	14 (53,8%)	44 (59,4%)	
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-1 β	0 (0,0-2,7)*	2,35 (0,0-30,30)*	0,036
n positiv	21 (63,3%)	43 (66,1%)	
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-1 β	3,85 (0,0-23,5)*	2,4 (0,0-15,2)*	0,29
n positiv	29 (70,7%)	42 (53,7%)	

* Median (25-75 Perzentil)

4.3.2 Interleukin-1ra im Vaginallavage und im Serum

IL-1ra konnte bei allen Schwangeren in hohen Konzentrationen sowohl im Vaginalsekret als auch im Blutserum nachgewiesen werden.

Abbildung 4 zeigt im Vergleich die Konzentrationen von antiinflammatorischem IL-1ra im Vaginallavage in den verschiedenen Schwangerschaftstrimestern bei Frauen mit und ohne Kolonisation mit *Candida spp.* Der Mann-Whitney U Test für unverbundene Stichproben ergibt keinen Unterschied zwischen Candida- und Kontrollgruppen im 1. ($p=0,38$), 2. ($0,32$) und 3. ($p=0,15$) Trimester.

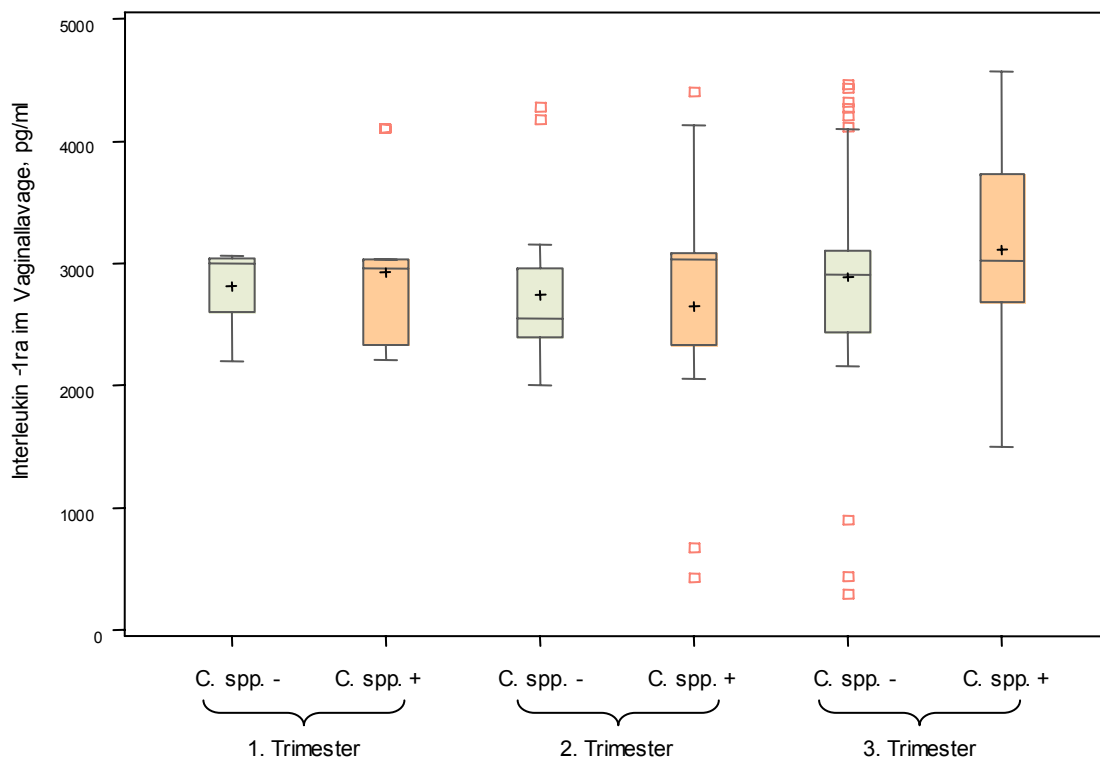


Abbildung 4 Konzentrationen von IL-1ra (pg/ml) im Vaginallavage in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit *Candida spp.*

Der Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon für verbundene Stichproben ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen 1. und 2. Trimester in der

Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1032; p=0,058) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 94; p=0,07). Keinen signifikanten Unterschied ergibt sich auch zwischen 2. und 3. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1249; p=0,17) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 147; p=0,2).

Tabelle 9 Vaginale Kolonisierung mit *Candida spp.* und Konzentrationen von IL-1ra im Vaginalsekret

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-1ra	2958,1 (123,80-3028,5)*	2921,7 (2601,85-3037,35)*	0,38
n positiv	24 (100%)	74 (100%)	
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-1ra	2927,45 (2336,2-3081,3)*	2577,63 (2396,6-2954,35)*	0,32
n positiv	33 (100%)	65 (100%)	
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-1ra	3025,7 (2676,8-3726,2)*	2907,8 (2431,1-3102,1)*	0,15
n positiv	41 (100%)	57 (100%)	

* Median (25-75 Perzentil)

Abbildung 5 zeigt im Vergleich die Konzentrationen von IL-1ra im Serum in beiden Gruppen. Der Wilcoxon-Rangsummen Test für unverbundene Stichproben ergibt einen signifikanten Unterschied zwischen Candida- und Kontrollgruppen nur im 1. Trimester, wobei die Werte in der Candidagruppe höher sind ($p=0,0047$), dagegen keinen im 2. ($p=0,38$) und 3. ($p=0,4$) Trimester.

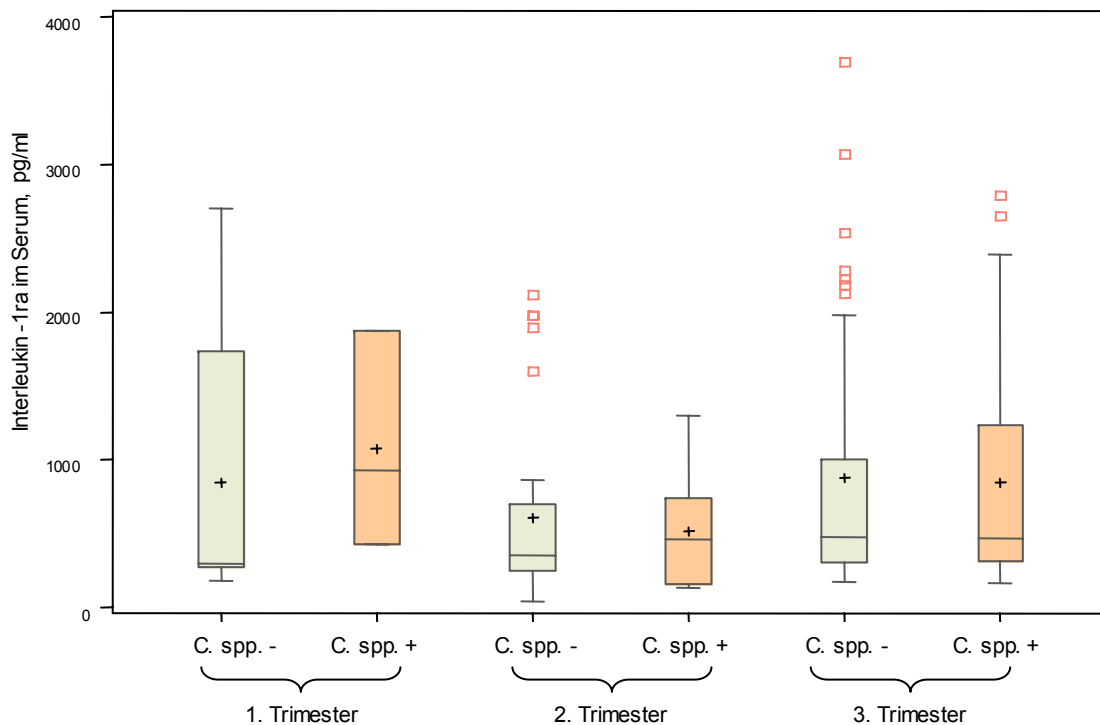


Abbildung 5 Konzentrationen von IL-1ra (pg/ml) im Serum in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit *Candida spp.*

Der Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon für verbundene Stichproben ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen 1. und 2. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 984; $p=0,27$) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 193; $p=0,39$). Dagegen ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen 2. und 3. Trimester in der Kontrollgruppe, wobei die Werte im 3. Trimester höher liegen (Vorzeichen-Rang = 454; $p=0,015$), jedoch nicht in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 219; $p=0,24$).

Tabelle 10 Vaginale Kolonisierung mit *Candida spp.* und Konzentrationen von IL-1ra im Blutserum

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-1ra	930,60 (423,7-1872,5)*	408,7 (275,5-1736,5)*	0,0047
n positiv	24 (100%)	74 (100%)	
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-1ra	498,2 (153,2-741,8)*	403,35 (246,3-698,5)*	0,38
n positiv	33 (100%)	65 (100%)	
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-1ra	467,35 (312,45-1230,6)*	478,6 (307,4-1002,7)*	0,4
n positiv	41 (100%)	57 (100%)	

* Median (25-75 Perzentil)

Für jede Schwangere wurde bei jedem Untersuchungspunkt das Verhältnis von IL-1ra:IL-1 β errechnet, um einen neuen, dimensionslosen Parameter zu erhalten. Dieser Parameter wurde dann zwischen Candida-Gruppe und Kontrollgruppe verglichen, was in Tabellen 11 und 12 beschrieben ist.

Man sieht signifikante Unterschiede im Verhältnis IL-1ra: IL-1 β zwischen Candidagruppe und Kontrollgruppe im Vaginallavage in drei Untersuchungszeitpunkten. In der Candidagruppe ist das Verhältnis IL-1ra: IL-1 β niedriger, als in der Kontrollgruppe (Tabelle 11).

Tabelle 11 Verhältnis IL-1ra: IL-1 β im Vaginalsekret

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-1ra: IL-1 β	249,97 (123,80-376,15)*	869,80 (611,5-1120,0)*	<0.0001
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-1ra: IL-1 β	274 (75,95-784,35)*	416,62 (40,5-791,5)*	0,035
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-1ra: IL-1 β	306,23 (53,70-459,95)*	595,89 (89,1-1022,50)*	0,02

* Median (25-75 Perzentil)

Im Serum dagegen konnten keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (Tabelle 12).

Tabelle 12 Verhältnis IL-1ra: IL-1 β im Serum

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-1ra: IL-1 β	421,83 (141,2-814,1)*	331,31 (61,6-901,6)*	0,17
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-1ra: IL-1 β	151,97 (43,3-267,2)*	102,23 (10,9-132,7)*	0,16
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-1ra: IL-1 β	174,65 (33,3-170,9)*	173,35 (28,7-240,4)*	0,34

* Median (25-75 Perzentil)

4.3.3 Interleukin-4 im Vaginallavage und im Serum

Abbildung 6 zeigt die Konzentrationen von IL-4 im Vaginallavage bei Schwangeren mit und ohne *Candida*-Kolonisation in drei Schwangerschaftsperioden. Der Mann-Whitney U Test für unverbundene Stichproben ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen im 1. Trimester ($p=0,26$). Die Werte in der Candidagruppe sind dagegen signifikant höher im 2. und 3. Trimester als in der Kontrollgruppe ($p=0,049$ und $p=0,041$).

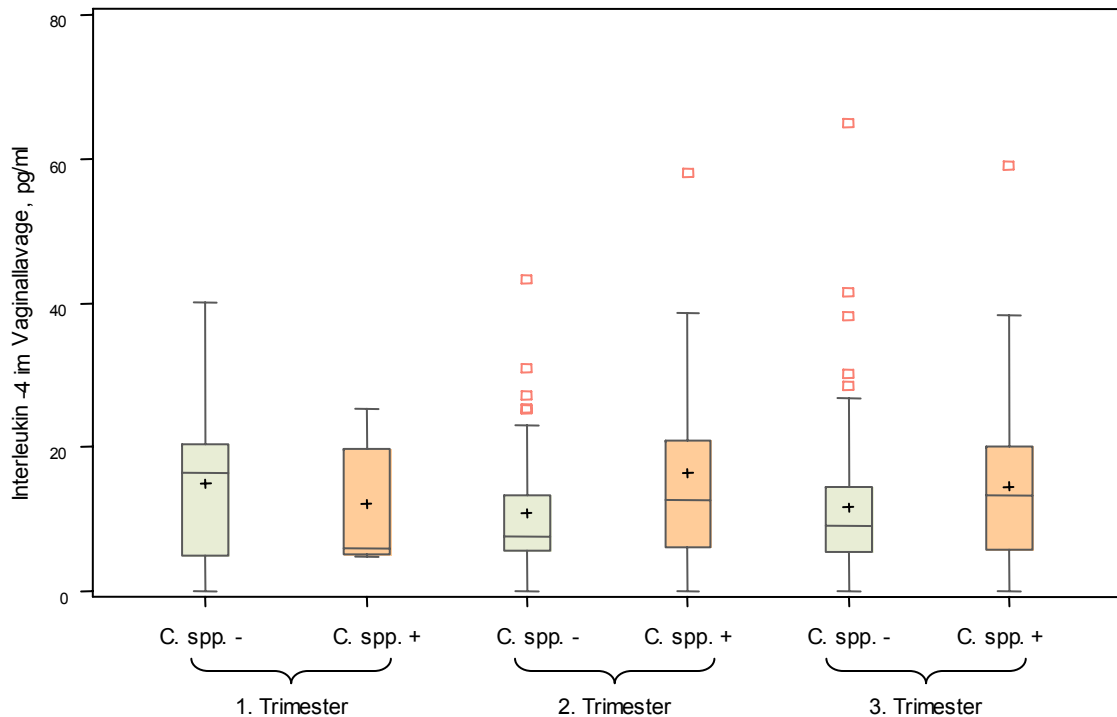


Abbildung 6 Konzentrationen von IL-4 (pg/ml) im Vaginallavage in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit *Candida spp.*

Laut dem Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon für verbundene Stichproben sind die Werte im 2. Trimester in der Kontrollgruppe signifikant niedriger, als im 1. Trimester (Vorzeichen-Rang = 209; $p=0,0154$). Ein signifikanter Unterschied ergibt sich auch zwischen 1. und 2. Trimester in der Candidagruppe, wobei die Werte im 2. Trimester höher sind (Vorzeichen-

Rang = 31; p=0,021). Keinen signifikanten Unterschied hingegen ergibt sich zwischen 2. und 3. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1033; p=0,35) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 173; p=0,12).

Tabelle 13 Vaginale Kolonisierung mit *Candida spp.* und Konzentrationen von IL-4 im Vaginallavage

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-4	7,1 (5,1-19,8)*	14,2 (5,0-20,4)*	0,26
n positiv	24 (100%)	70 (94,6%)	
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-4	11,8 (6,1-20,85)*	7,2 (5,6-13,3)*	0,049
n positiv	30 (90,9%)	60 (92,3%)	
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-4	13,3 (5,7-20,1)*	9,0 (5,5-14,5)*	0,041
n positiv	38 (92,6%)	50 (87,7%)	

* Median (25-75 Perzentil)

Abbildung 7 zeigt die Konzentrationen von IL-4 im Serum. Bei der Auswertung wurden keine Unterschiede zwischen Candidagruppe und Kontrollgruppe in allen Untersuchungspunkten festgestellt ($p=0,39$, $p=0,34$, $p=0,34$)

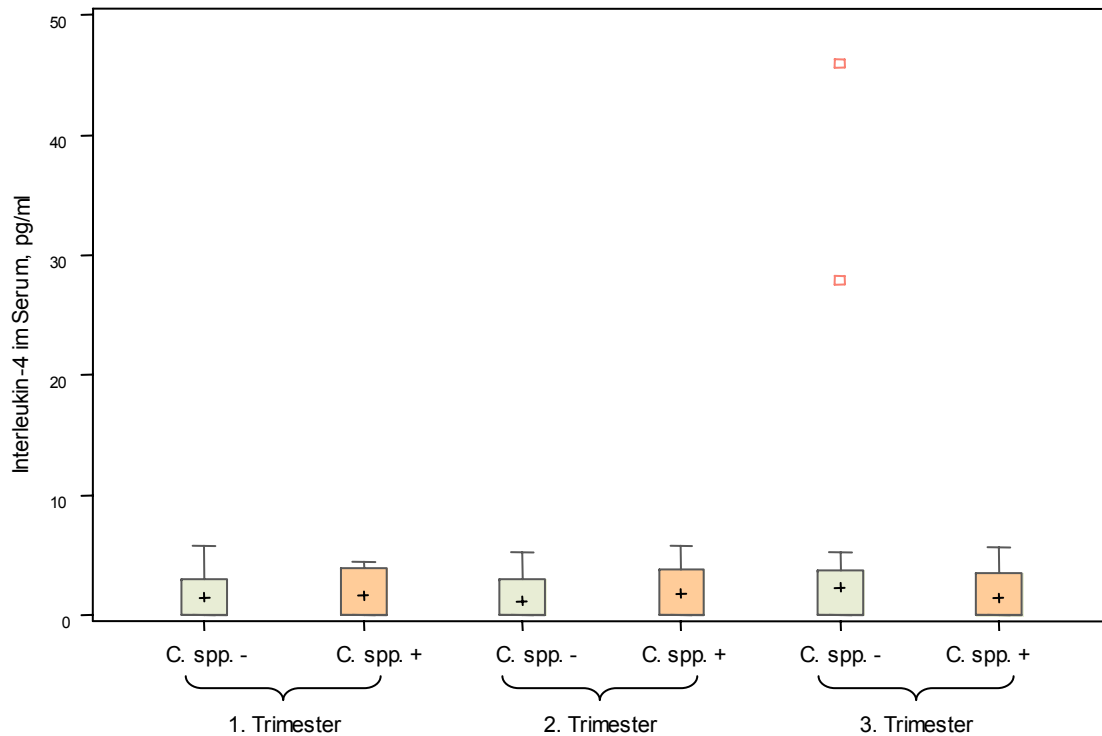


Abbildung 7 Konzentrationen von IL-4 (pg/ml) im Serum in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit *Candida spp.*

Der Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon für verbundene Stichproben ergibt weder einen signifikanten Unterschied zwischen 1. und 2. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1096; $p=0,34$) noch in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 188; $p=0,26$). Ebenso ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen 2. und 3. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1098; $p=0,34$) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 224; $p=0,37$).

Tabelle 14 Vaginale Kolonisierung mit *Candida spp.* und Konzentrationen von IL-4 im Blutserum

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-4	0 (0,0-3,9)*	0 (0,0-3,0)*	0,39
n positiv	10 (41,7%)	29 (39,1%)	
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-4	0 (0,0-3,8)*	0 (0,0-3,0)*	0,34
n positiv	12 (36,3%)	17 (26,2%)	
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-4	0 (0,0-3,5)*	0 (0,0-3,75)*	0,34
n positiv	12 (29,2%)	19 (33,3%)	

* Median (25-75 Perzentil)

4.3.4 Interleukin-6 im Vaginallavage und im Serum

Abbildung 8 zeigt im Vergleich die Konzentrationen von proinflammatorischem IL-6 im Vaginallavage in den verschiedenen Schwangerschaftstrimestern bei Frauen mit und ohne Kolonisation mit *Candida spp.* Der Mann-Whitney U Test für unverbundene Stichproben ergibt einen signifikanten Unterschied zwischen Candida- und Kontrollgruppen mit höheren Werten in der Candidagruppe im 1. ($p=0,024$) und 3. ($p=0,0053$), aber nicht im 2. Trimester ($p=0,47$).

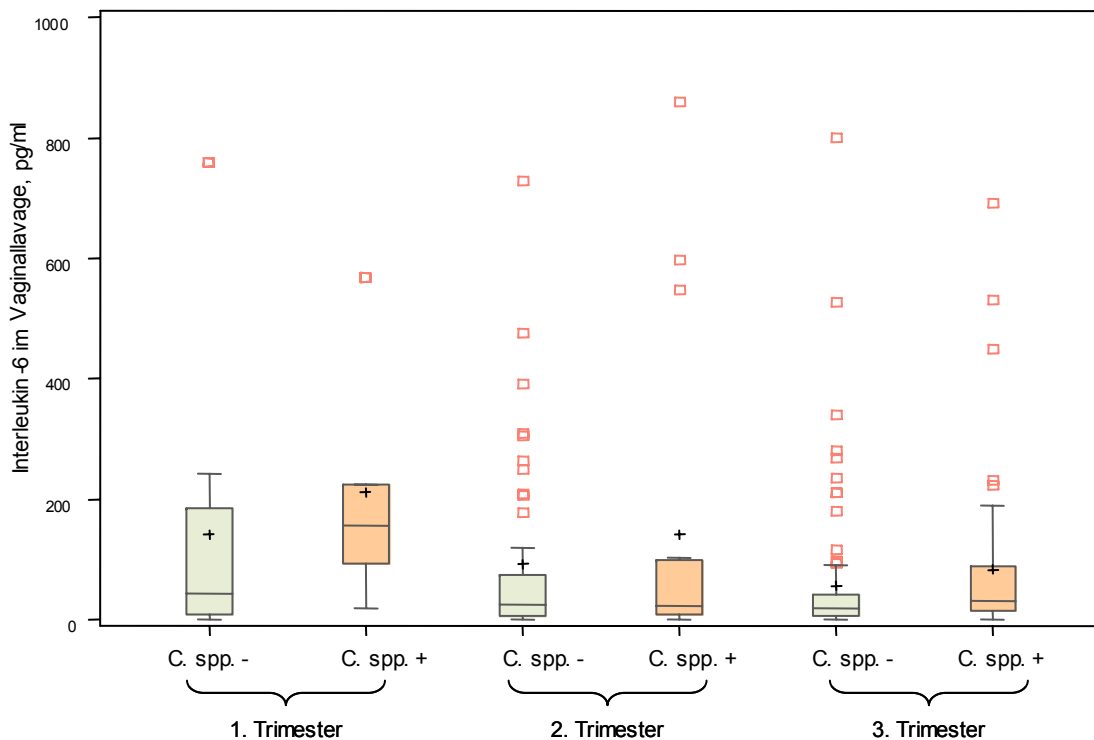


Abbildung 8 Konzentrationen von IL-6 (pg/ml) im Vaginallavage in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit *Candida spp.*

Der Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon für verbundene Stichproben ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen 1 und 2 Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 939; $p=0,19$) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 96; $p=0,064$). Es ergibt sich außerdem ein signifikanter

Unterschied zwischen 2. und 3. Trimester mit höheren Werten im 2. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 209; $p=0,0035$) jedoch kein signifikanter Unterschied in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 368; $p=0,43$).

Tabelle 15 Vaginale Kolonisierung mit *Candida spp.* und Konzentrationen von IL-6 im Vaginallavage

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-6	156,4 (92,8-223,2)*	46,1 (7,6-185,4)*	0,024
n positiv	24 (100%)	67 (90,5%)	
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-6	22,9 (7,6-99,7)*	23,5 (7,0-73,5)*	0,47
n positiv	32 (97%)	60 (92,5%)	
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-6	30,5 (14,9-88,6)*	18,8 (6,7-41,2)*	0,0053
n positiv	39 (95,1%)	50 (87,7%)	

* Median (25-75 Perzentil)

Abbildung 9 zeigt im Vergleich die Konzentrationen von IL-6 im Serum in den Gruppen. Der Mann-Whitney U Test für unverbundene Stichproben ergibt keinen Unterschied zwischen Candida- und Kontrollgruppe in allen Schwangerschaftstrimestern ($p=0,13$, $p=0,22$, $p=0,3$).

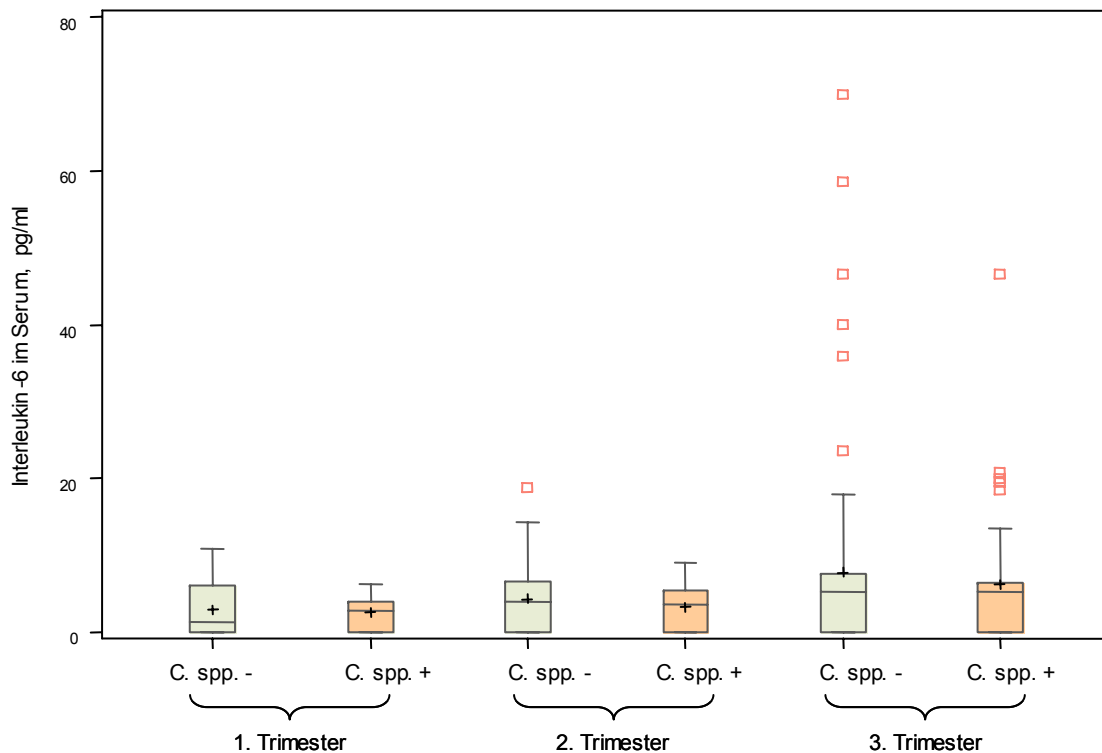


Abbildung 9 Konzentrationen von IL-6 (pg/ml) im Serum in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit *Candida spp.*

Der Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon für verbundene Stichproben ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen 1 und 2 Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1634; $p=0,06$) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 139; $p=0,27$). Ebenfalls ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen 2. und 3. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1891; $p=0,09$) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 97; $p=0,19$).

Tabelle 16 Vaginale Kolonisierung mit *Candida spp.* und Konzentrationen von IL-6 im Blutserum

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-6	2,8 (0,0-4,0)*	3,9 (0,0-6,1)*	0,5
n positiv	15 (62,5%)	47 (63,5%)	
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-6	5,4 (0,0-5,5)*	5,5 (0,0-6,55)*	0,22
n positiv	24 (72,7%)	44 (67,7%)	
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-6	5,2 (0,0-6,4)*	5,35 (0,0-7,5)*	0,3
n positiv	29 (70,7%)	40 (70,2%)	

* Median (25-75 Perzentil)

4.3.5 Interleukin-8 im Vaginallavage und im Serum

Abbildung 10 zeigt im Vergleich die Konzentrationen von proinflammatorischem IL-8 im Vaginallavage in den verschiedenen Schwangerschaftstrimestern bei Frauen mit und ohne Kolonisation mit *Candida spp.* Der Mann-Whitney U Test für unverbundene Stichproben ergibt einen hochsignifikanten Unterschied zwischen Candida- und Kontrollgruppen im 1. ($p=0,0075$), 2. ($p = 0,026$) und 3. ($p = 0,0003$) Trimester, wobei die Werte in der Candidagruppe höher liegen.

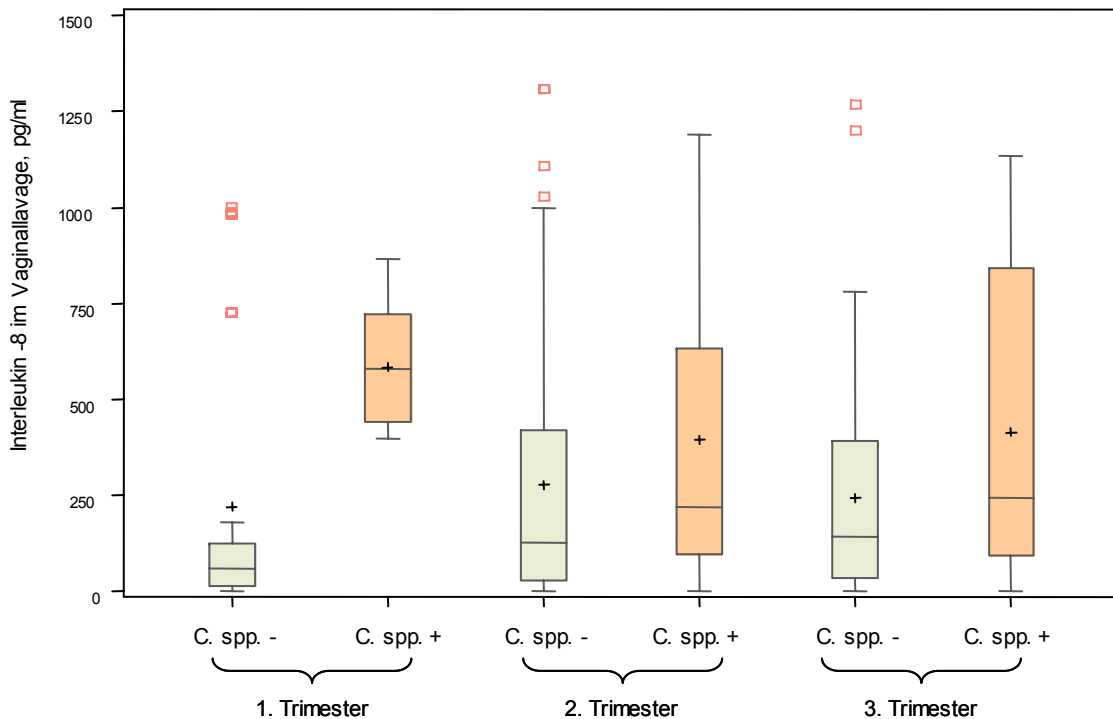


Abbildung 10 Konzentrationen von IL-8 (pg/ml) im Vaginallavage in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit *Candida spp.*

Der Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon für verbundene Stichproben ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen 1. und 2. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1214; $p=0,06$) und einen signifikanten Unterschied in der Candidagruppe mit höheren Werten im 1. Trimester

(Vorzeichen-Rang = 9; p=0,0046). Er ergibt sich keinen signifikanten Unterschied zwischen 2. und 3. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 2319; p=0,48) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 291; p=0,44).

Tabelle 17 Vaginale Kolonisierung mit *Candida spp.* und Konzentrationen von IL-8 im Vaginallavage

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-8	606,82 (447,1-734,5)*	87,6 (14,0-123,1)*	0,0075
n positiv	24 (100%)	71 (95,9%)	
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-8	217,4 (24,7-639,8)*	127,0 (31,9-370,0)*	0,026
n positiv	32 (97%)	57 (87,7%)	
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-8	377,1 (94-846,5)*	108,3 (26,6-356,2)*	0,0003
n positiv	40 (97,5%)	52 (91,2%)	

* Median (25-75 Perzentil)

Abbildung 11 zeigt im Vergleich die Konzentrationen von IL-8 im Serum in beiden Gruppen. Der Mann-Whitney U Test für unverbundene Stichproben ergibt keinen Unterschied zwischen Candida- und Kontrollgruppen in allen Schwangerschaftstrimestern ($p = 0,45$, $p = 0,17$, $p = 0,1$).

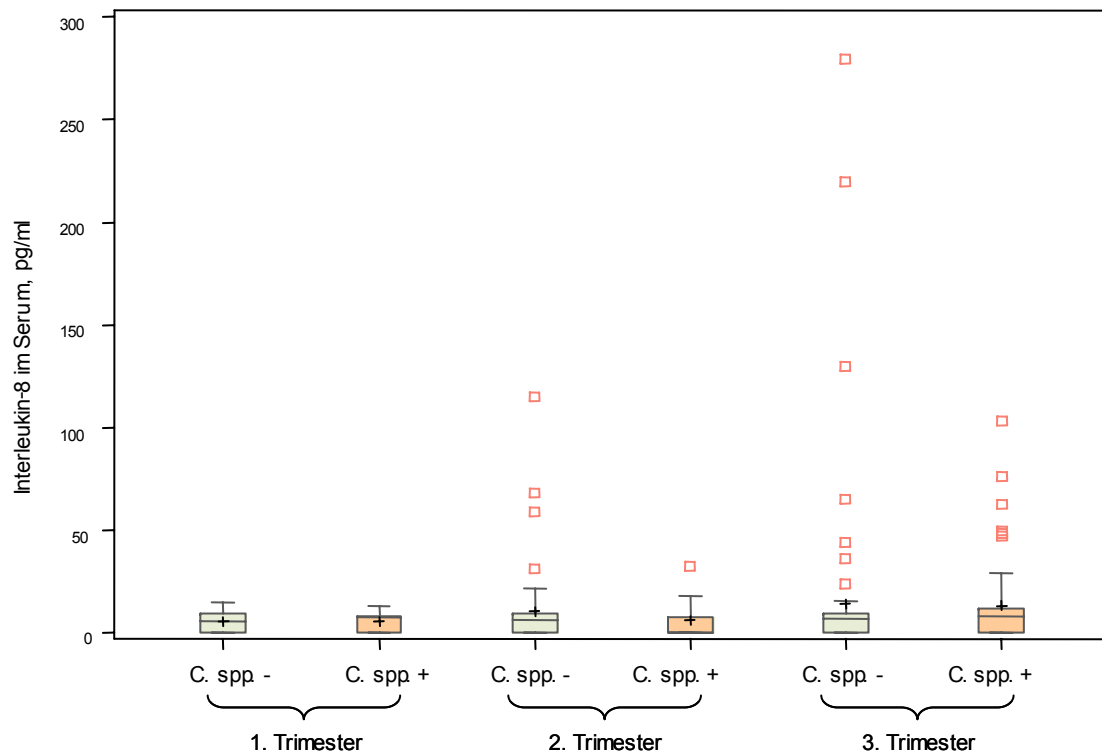


Abbildung 11 Konzentrationen von IL-8 (pg/ml) im Serum in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit *Candida spp.*

Der Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon für verbundene Stichproben ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen 1. und 2. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1942; $p=0,41$) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 178; $p=0,37$) sowie keinen signifikanten Unterschied zwischen 2. und 3. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 2013; $p=0,46$) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 134; $p=0,15$).

Tabelle 18 Vaginale Kolonisierung mit *Candida spp.* und Konzentrationen von IL-8 im Blutserum

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-8	7,2 (0,0-8,0)*	5,4 (0,0-9,0)*	0,45
n positiv	15 (62,5%)	46 (62,2%)	
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-8	0 (0,0-7,7)*	6,8 (0,0-9,5)*	0,17
n positiv	23 (69,6%)	38 (58,5%)	
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-8	7,95 (0,0-12,0)*	7,0 (0,0-9,0)*	0,1
n positiv	28 (68,3%)	34 (59,6%)	

* Median (25-75 Perzentil)

4.3.6 Interleukin-10 im Vaginallavage und im Serum

Abbildung 12 zeigt im Vergleich die Konzentrationen von IL-10 im Vaginallavage in den verschiedenen Schwangerschaftstrimestern bei Frauen mit und ohne Kolonisation mit *Candida spp.* Der Mann-Whitney U Test für unverbundene Stichproben ergibt keinen Unterschied zwischen Candida- und Kontrollgruppen im 1. ($p=0,36$), 2. ($p=0,2$), aber im 3. Trimester ($p=0,02$), was an einer Streuung der Werte sowie an Ausreißern in der Candidagruppe liegen kann.

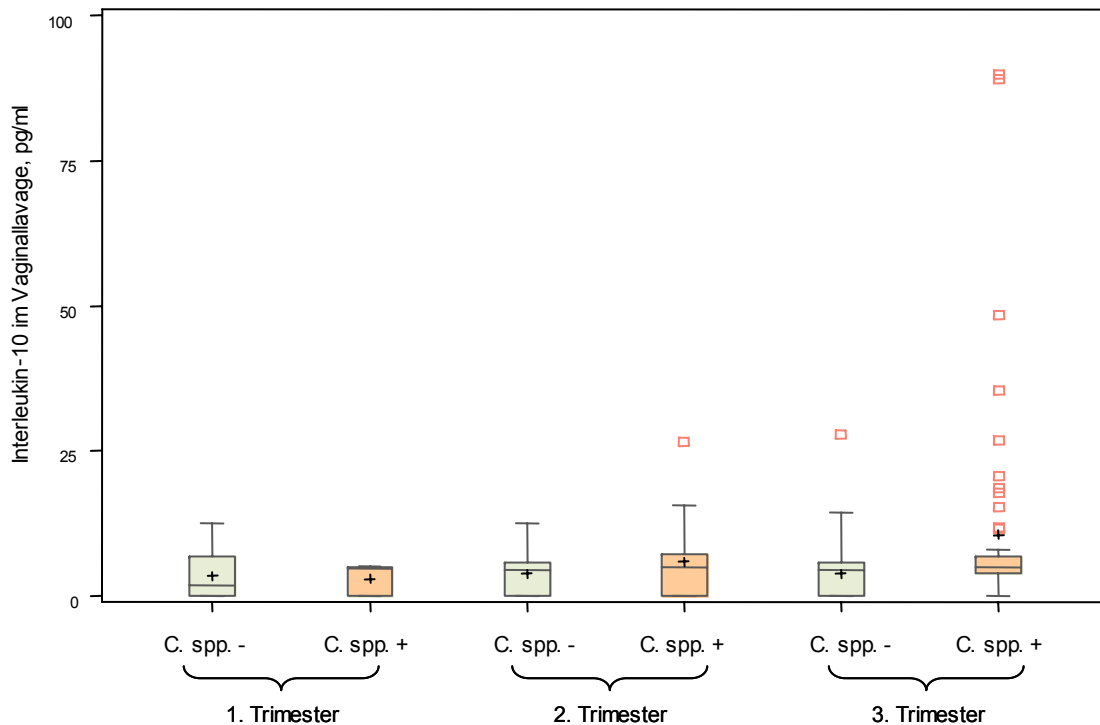


Abbildung 12 Konzentrationen von IL-10 (pg/ml) im Vaginallavage in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit *Candida spp.*

Der Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon für verbundene Stichproben ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen 1. und 2. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1645; $p=0,44$) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 163; $p=0,23$), sowie ebenfalls keinen signifikanten

Unterschied zwischen 2. und 3. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1128; p=0,14) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 98; p=0,08).

Tabelle 19 Vaginale Kolonisierung mit *Candida spp.* und Konzentrationen von IL-10 im Vaginallavage

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-10	5,6 (0,0-5,7)*	2,96 (0,0-5,9)*	0,36
n positiv	12 (50%)	49 (66,2%)	
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-10	4,3 (0,0-7,2)*	4,4 (0,0-5,8)*	0,2
n positiv	20 (60,6%)	40 (62%)	
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-10	4,9 (3,9-6,8)*	4,6 (0,0-5,8)*	0,02
n positiv	31 (75,6%)	39 (68,5%)	

* Median (25-75 Perzentil)

Abbildung 13 zeigt im Vergleich die Konzentrationen von IL-10 im Serum in beiden Gruppen. Der Mann-Whitney U Test für unverbundene Stichproben ergibt keinen Unterschied zwischen Candida- und Kontrollgruppen in allen Schwangerschaftstrimestern ($p=0,17$, $p=0,48$, $p=0,12$).

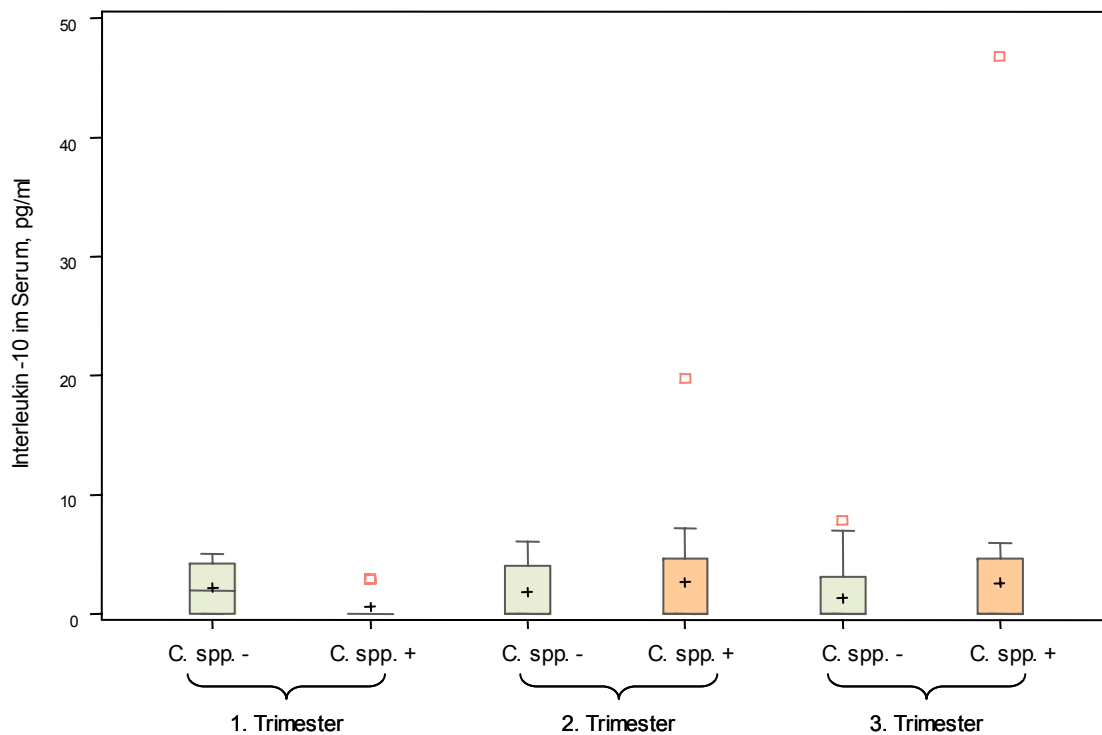


Abbildung 13 Konzentrationen von IL-10 (pg/ml) im Serum in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit *Candida spp.*

Der Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon für verbundene Stichproben ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen 1. und 2. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1021; $p=0,053$) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 183; $p=0,38$), sowie keinen signifikanten Unterschied zwischen 2. und 3. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1134; $p=0,078$) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 148; $p=0,23$).

Tabelle 20 Vaginale Kolonisierung mit *Candida spp.* und Konzentrationen von IL-10 im Blutserum

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-10	0 (0,0-0,6)*	2,8 (0,0-4,9)*	0,17
n positiv	5 (20,8%)	43 (58,1%)	
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-10	0 (0,0-4,6)*	0 (0,0-4,05)*	0,48
n positiv	11 (33,3%)	19 (29,2%)	
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-10	0 (0,0-4,6)*	0 (0,0-3,1)*	0,12
n positiv	14 (34,2%)	15 (26,3%)	

* Median (25-75 Perzentil)

4.3.7 Interleukin-12 im Vaginallavage und im Serum

Abbildung 14 zeigt im Vergleich die Konzentrationen von IL-12 im Vaginallavage in den verschiedenen Schwangerschaftstrimestern bei Frauen mit und ohne Kolonisation mit *Candida spp.* Der Mann-Whitney U Test für unverbundene Stichproben ergibt keinen Unterschied zwischen Candida- und Kontrollgruppen im 1. ($p=0,45$), 2. ($0,23$) und 3. ($p=0,31$) Trimester.

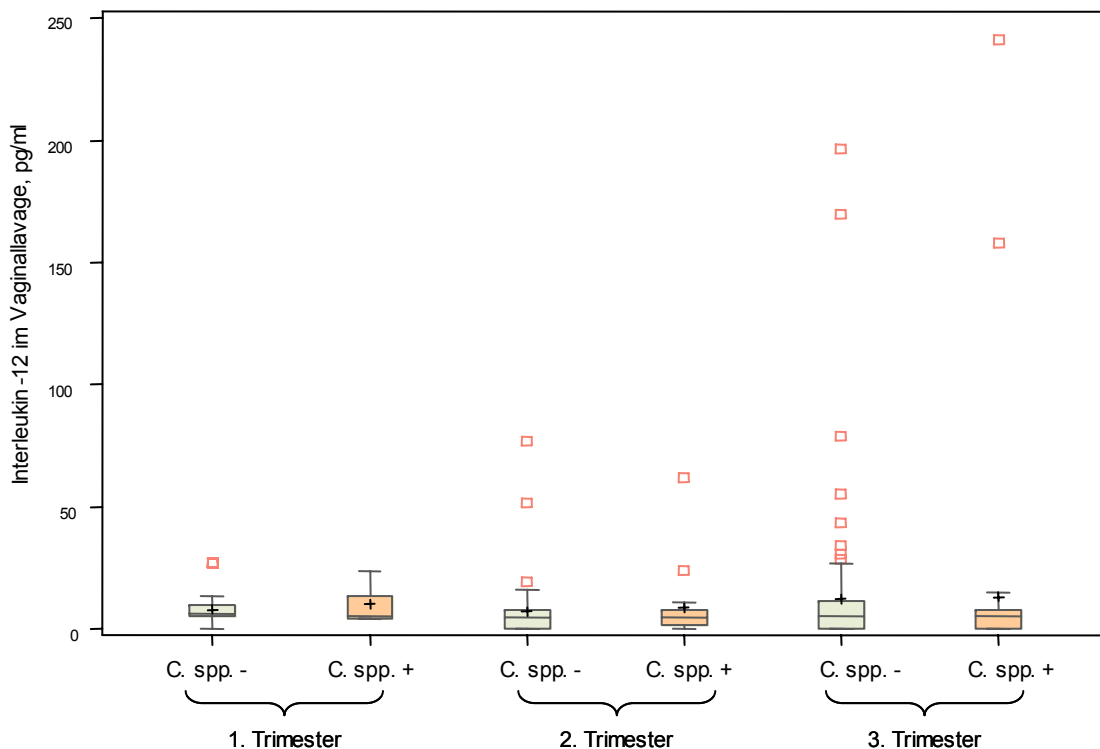


Abbildung 14 Konzentrationen von IL-12 (pg/ml) im Vaginallavage in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit *Candida spp.*

Der Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon für verbundene Stichproben ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen 1. und 2. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1008; $p=0,07$) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 194; $p=0,29$). Keinen signifikanten Unterschied ergibt

sich zwischen 2. und 3. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1530; p=0,11) und in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 316; p=0,41).

Tabelle 21 Vaginale Kolonisierung mit *Candida spp.* und Konzentrationen von IL-12 im Vaginallavage

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-12	4,6 (4,3-13,5)*	5,6 (5,0-9,7)*	0,45
n positiv	16 (66,7%)	59 (80%)	
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-12	4,56 (1,5-7,9)*	4,6 (0,0-7,6)*	0,23
n positiv	23 (69,7%)	39 (60%)	
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-12	5,4 (0,0-7,5)*	5,42 (0,0-11,4)*	0,31
n positiv	26 (63,4%)	36 (63,2%)	

* Median (25-75 Perzentil)

Abbildung 15 zeigt im Vergleich die Konzentrationen von IL-12 im Serum in beiden Gruppen. Der Mann-Whitney U Test für unverbundene Stichproben ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen Candida- und Kontrollgruppe im 1. Trimester ($p=0,18$), sowie im 2. ($p=0,097$) und 3. ($p=0,07$) Trimester.

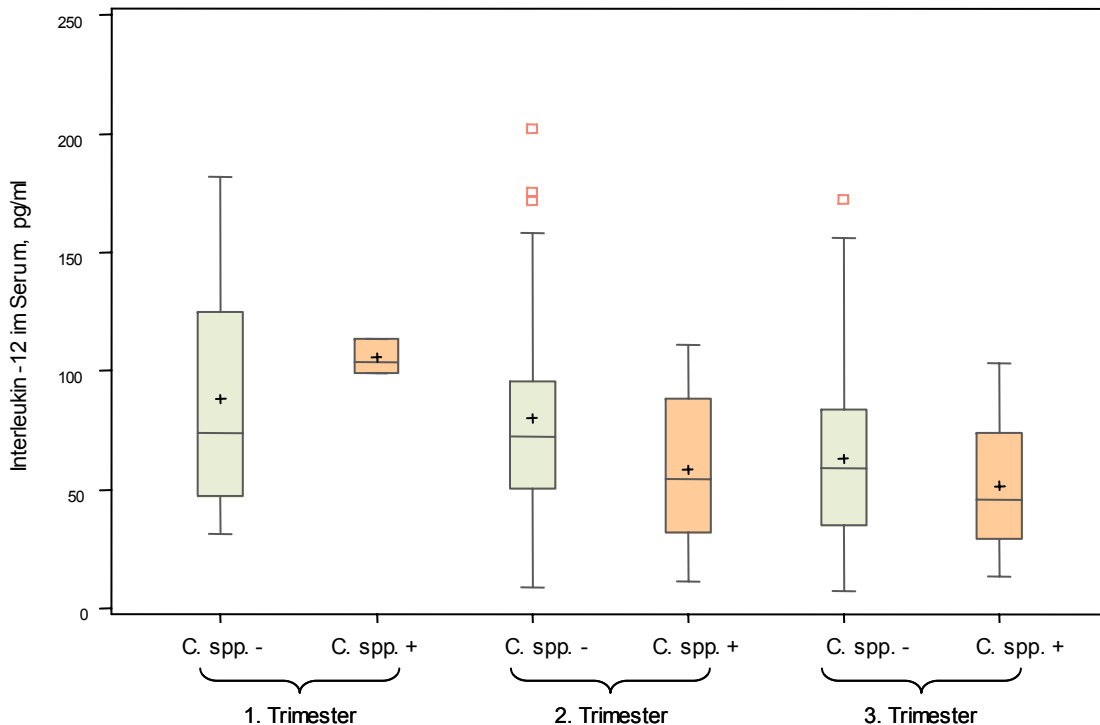


Abbildung 15 Konzentrationen von IL-12 (pg/ml) im Serum in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit *Candida spp.*

Der Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon für verbundene Stichproben ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen 1. und 2. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 1131; $p=0,24$), aber einen signifikanten Unterschied mit höheren Werten im 1. Trimester in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 11; $p=0,024$). Es ergibt sich außerdem ein signifikanter Unterschied zwischen 2. und 3. Trimester mit höheren Werten im 2. Trimester in der Kontrollgruppe (Vorzeichen-Rang = 91; $p=0,0001$), jedoch kein

signifikanter Unterschied in der Candidagruppe (Vorzeichen-Rang = 389; p=0,36).

Tabelle 22 Vaginale Kolonisierung mit *Candida spp.* und Konzentrationen von IL-12 im Blutserum

	<i>Candida spp.</i> nachgewiesen	<i>Candida spp.</i> nicht nachgewiesen	P-Wert
1. Trimester	n=24	n=74	
IL-12	104,0 (99,2-113,7)*	95,8 (47,5-127,0)*	0,18
n positiv	24 (100%)	74 (100%)	
2. Trimester	n=33	n=65	
IL-12	51,0 (31,90-88,50)*	71,0 (50,3-95,8)*	0,097
n positiv	33 (100%)	65 (100%)	
3. Trimester	n=41	n=57	
IL-12	45,6 (29,4-73,8)*	58,95 (34,80-84,0)*	0,07
n positiv	41 (100%)	57 (100%)	

5 Diskussion

In dieser Studie wurde die Identifikation von *Candida spp.* mittels kultureller Anzuchtung auf Sabouraud-Agar und weiterer Spezifizierung auf CHROM-Agar Platten sowie DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die Nachteile von kulturellen Methoden der Identifizierung sind a) der große Zeitaufwand, da bis zur Identifizierung 3-5 Tage vergehen können und b) die geringere Sensitivität im Vergleich zur PCR-Analyse. Für die Hefen-Diagnostik sind die DNA-Amplifikationsmethoden auf Gattungs-Spezies- und Subspezies-Ebene adaptiert worden, was eine präzise und schnelle Diagnostik ermöglicht (11;56;121). Ein mikroskopischer Nachweis von *Candida spp.* im Nativpräparat wurde in Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt, da aus den Literaturrecherchen gefolgert werden kann, dass die Mikroskopie von Nativpräparaten weniger sensitiv im Vergleich mit der kulturellen Anzuchtung ist und zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann (82).

In der untersuchten Kohorte stieg die Kolonisationsrate während der Schwangerschaft laut Ergebnissen der kulturellen Anzuchtung von 18,3% im 1. Trimester bis auf 25,5% bzw. 30,6% im 2. und 3. Trimester. Diese Ergebnisse stimmen mit den Literaturdaten überein, was im Kapitel Epidemiologie erläutert ist. Bei der PCR-Amplifizierung konnte der Anstieg der Kolonisationsrate in der gleichen Kohorte von 25,5% im 1. Trimester bis auf 33,7% bzw. 41,8% im 2. und 3. Trimester beobachtet werden. Der Vergleich der Ergebnisse von kultureller Anzuchtung und PCR zeigte, dass 29,1%, 24,2% bzw. 26,8% der positiven Proben unentdeckt bleiben, wenn nur eine kulturelle Anzuchtung durchgeführt wird, was auf geringe Mengen von *Candida spp.* in der Probe zurückzuführen ist. In der Literatur ist beschrieben, dass für positive Ergebnisse bei kultureller Anzuchtung mindestens 1000 Hefezellen in der Probe vorhanden sein müssen, DNA-Amplifikationsmethoden dagegen können den Erreger ab 10 Zellen in der Probe identifizieren (53;55;57).

In vorliegender Studie wurde eine Reihe von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen untersucht. Eine der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine war dabei IL-1 β , da dieses Zytokin die Frühphase der Entzündungsreaktion steuert und damit eine Schlüsselfunktion in der Entwicklung der proinflammatorischen Kaskade hat. IL-1 β induziert die Synthese von IL-6, IL-8 und PGE₂. Es zählt deshalb als Hauptfaktor bezüglich der Initiierung der Frühgeburt, da PGE₂ unter anderem zur unstillbaren vorzeitigen Wehentätigkeit und einem vorzeitigen Blasensprung führt (131;152;156).

Bei der Auswertung der Daten von Konzentrationen von IL-1 β konnte festgestellt werden, dass dieses Zytokin in Vaginallavage in beiden Untersuchungsgruppen nachgewiesen wurde, was zeigt, dass es bei der physiologischen Schwangerschaft synthetisiert wird. Allerdings waren Konzentrationen von IL-1 β im Vaginallavage in der Candidagruppe höher als in der Kontrollgruppe entsprechenden Gestationsalters, obwohl während des 2. Trimesters dieser Unterschied nicht signifikant war. In der Candidagruppe haben 100%, 93,9% bzw. 97,5% der Schwangeren in der Vagina IL-1 β produziert. In der Kontrollgruppe dagegen 75,7%, 86,5% bzw. 85,9%. Diese zwei Beobachtungen lassen vermuten, dass die Synthese IL-1 β in Anwesenheit von *Candida spp.* aktiviert wird. Da IL-1 β eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Unterstützung der Frühphase der Entzündungsreaktionen spielt, kann man behaupten, dass aufgrund unserer Befunde die Aktivierung des Zytokinnetzwerks in der Candidagruppe vermutet werden kann.

Die Arbeitsgruppe von Donders hat sich mit Konzentrationen von IL-1 β im Verlauf der Schwangerschaft beschäftigt. Sie berichteten, dass die Spiegel von IL-1 β im Verlauf der normalen Schwangerschaft bei Frauen ohne pathologische Mikroflora unverändert blieb (36). Dies stimmt mit unseren Ergebnissen für die Kontrollgruppe überein, da obwohl wir einen signifikanten Unterschied zwischen 1. und 2. Trimester beobachtet haben, keinen aber

zwischen 2. und 3. Trimester. Der signifikante Unterschied zwischen 1. und 2. Trimester ist aus unserer Sicht auf große Schwankungen, individuelle Abweichungen und Ausreißer im 2. Trimester zurückzuführen.

In der Candidagruppe dagegen wurde kein signifikanter Unterschied von 1. zum 2. Trimester beobachtet, aber ein signifikanter Anstieg der IL-1 β Konzentration zum 3. Trimester. Diese Tatsache und die Beobachtung, dass die Konzentration von IL-1 β in der Candidagruppe im Vergleich mit Kontrollgruppe auch signifikant höher war, stellt aus unserer Sicht ein sehr interessantes Ergebnis dar, wenn man die Bedeutung dieses Zytokins in Reifungsprozess der Zervix berücksichtigt.

Die Arbeitsgruppe von Tanaka et al untersuchte die prognostische Wertigkeit von zervikovaginalen Zytokinen IL-8 und IL-1 β bei Frühgeburten im Vergleich mit normalen Geburten. Sie stellte fest, dass die Konzentration von IL-1 β während der Entbindung signifikant höher war, sowohl bei früh- als auch rechtzeitigen Geburten. Die gleichen Beobachtungen machten Gonzales et al. IL-1 β wird in Zervix produziert und stimuliert die Synthese von Kollagenase und Elastase, was zur Degradation von Kollagen und dementsprechend zur Reifung der Zervix führt. In diesem physiologischen Entzündungsprozess ist auch IL-8 involviert, was später beschrieben wird. Unsere Beobachtung über höhere Werte in der Candidagruppe lassen vermuten, dass im Falle der Kolonisation der Vagina mit *Candida spp.* die Reifung des unteren Segments und eine Geburtauslösung nicht ausgeschlossen werden können (19;132).

Im Serum konnte IL-1 β in 53,8-70,7% in der Candidagruppe und in 53,7-66,1% in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Spiegel von IL-1 β im Serum waren wesentlich geringer, als im Vaginallavage. Wir haben zwar signifikante Unterschiede zwischen Candidagruppe und Kontrollgruppe im 2. Trimester festgestellt, nicht aber im 1. und 3. Trimester. Diese Schwankungen während des 2. Trimesters können nicht auf *Candida spp.* zurückgeführt werden, da in der Vagina zum gleichen Zeitpunkt keine Unterschiede

festgestellt wurden und sind demnach im Rahmen dieser Studie nicht zuzuordnen.

Im Verlauf der Schwangerschaft wurden keine Veränderungen des IL-1 β -Spiegels im Serum in der Candidagruppe nachgewiesen. In der Kontrollgruppe stieg der Spiegel im 2. Trimester im Vergleich zum 1. Trimester. Dies ist aus unserer Sicht auf Ausreißer und extreme Beobachtungen zurückzuführen.

IL-1 β wird von IL-10, INF γ und IL-6 inhibiert. Das wichtigste regulatorische Molekül ist jedoch IL-1ra, das in 10-100-fachen Mengen produziert wird. IL-1ra bindet an die gleichen Rezeptoren wie IL-1 β , ohne die biologische Wirkung auszulösen, und reguliert damit die proinflammatorische Kaskade (151;157).

IL-1ra kann im Serum von gesunden Probanden in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Dies wird damit erklärt, dass zirkulierende IL-1ra unnötige Aktivierungen einer proinflammatorischen Antwort vorbeugen.

IL-1ra konnte in dieser Studie bei allen Schwangeren in hohen Konzentrationen sowohl im Vaginalsekret als auch im Serum nachgewiesen werden.

Bei der Auswertung der Konzentrationen von IL-1ra im Vaginallavage fällt auf, dass sie zwar hoch sind, sich aber im Laufe der Schwangerschaft in keiner der Untersuchungsgruppen verändern. Es ergibt sich auch bei keinem der Untersuchungszeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen Candida- und Kontrollgruppe.

Ähnliche Ergebnisse bekam Arbeitsgruppe von Donders et al (37). Sie stellte fest, dass Konzentrationen von IL-1ra im Vaginalsekret sehr stabil im Verlauf der Schwangerschaft bleiben.

Da IL-1ra ein spezifischer Antagonist von IL-1 β ist, scheint es deswegen entscheidend zu sein, nicht nur rohe Konzentrationen von IL-1 β und IL-1ra zu

messen, sondern auch das Verhältnis IL-1ra:IL-1 β zu bestimmen. Dieses Verhältnis scheint entzündliche Reaktionen wesentlich besser zu beschreiben als die Betrachtung der Einzelwerte. Es wird vermutet, dass eine Senkung des IL-1ra:IL-1 β Verhältnisses zu einer Verlängerung, Chronisierung und einem schwereren Verlauf von Entzündungen auf lokaler Ebene führt (54).

Bei Frauen mit pathologischer Mikroflora in der Vagina, korreliert ein niedriges IL-1ra:IL-1 β Verhältnis mit dem Schweregrad der Abweichungen vom normalen Milieu. Eine Unausgewogenheit zwischen proinflammatorischer und antiinflammatorischer Immunantwort spielt ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese von Frühgeburten. In einer Studie von Genc wurde gezeigt, dass die Disproportionalität in der Synthese von IL-1 β und IL-1ra bei Schwangeren mit einer Bakteriellen Vaginose mit Frühgeburten korreliert. Frauen mit erhöhter IL-1 β Konzentration oder niedriger IL-1ra:IL-1 β Verhältnis erlitten mit höherer Wahrscheinlichkeit eine Frühgeburt. In Tierversuchen wurde gezeigt, dass die Verabreichung von IL-1ra die IL-1 β induzierte Geburt inhibieren kann (33;54;76;155). Das niedrige IL-1ra:IL-1 β Verhältnis kann auch als Marker für Entzündungsprozesse im Uterus dienen, wenn die Mikrorisse in der Fruchtblase ermöglichen, das Zytokine aus dem Fruchtwasser in der Vagina präsent sind.

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass das IL-1ra:IL-1 β Verhältnis im Vaginallavage während aller drei Untersuchungstermine signifikant niedriger in der Gruppe mit Kolonisation der Vagina mit *Candida spp.* als in der Kontrollgruppe war. Es beweist, dass die Disproportionalität in der Synthese von IL-1 β und IL-1ra bei Frauen mit Kolonisation der Vagina mit *Candida spp.* zur Senkung des IL-1ra:IL-1 β Verhältnisses führt. Das gleiche Verhältnis im Serum ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Diese Tatsache zeigt, dass ein lokales Immundefizit in der Vagina

vorliegt, wodurch eine ausreichende Eliminierung der Erreger nicht erreicht werden kann.

Als eines der Th-2 Zytokine wurde IL-4 im Vaginallavage und im Serum bestimmt. IL-4 ist insofern ein sehr wichtiges Zytokin, da es alle Reaktionen der Th-2 Immunantwort auslösen kann, ohne andere Zytokine dazu zu benötigen (47).

IL-4 wird von aktivierten T-Zellen, Mastzellen und Basophilen produziert. Es besitzt zwei wichtige Eigenschaften: Es reguliert die Differenzierung von naiven CD4+ T-Zellen zu Th-2-Zellen und die Produktion von IgE durch B-Zellen. Die überflüssige Produktion von IL-4 ist mit einer Hyperproduktion von IgE und Allergien assoziiert (113;125). Diese Fähigkeiten von IL-4 sind für den Outcome der Erkrankung wichtig. Die Tendenz in Richtung der Differenzierung zu Th-2-Zellen kann zu einem Misserfolg beim Auskurieren der Infektionen und zur Immunopathologie führen (111).

Bei Betrachten der Konzentrationen von IL-4 im Vaginallavage sieht man, dass fast alle Frauen in beiden Gruppen dieses Zytokin produzieren, obwohl die Werte nicht hoch sind. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Candidagruppe und Kontrollgruppe im 1. Trimester, jedoch im 2. und 3. Trimester, bei denen die Spiegel von IL-4 in der Candidagruppe höher waren. Dies zeigt, dass in Anwesenheit von *Candida spp.* die Synthese von IL-4 aktiviert wird.

IL-4 hemmt unter anderem die Aktivität von Th-1-Zellen und führt zu Störungen der lokalen zellvermittelten Immunität. Die erhöhte Synthese von IL-4 im Vaginallavage in der Candidagruppe trägt auch dazu bei, dass eine lokale vaginale Immunsuppression entsteht, die eine Vermehrung von *Candida spp.* in der Vagina begünstigt. Diese Tatsache wurde auch von Tascini et al bestätigt. Sie stellten fest, dass Neutrophilen, die mit humanem IL-4 und IL-10 inkubiert wurden, geminderte candidazide Wirkungen aufwiesen, wobei die Stärke der Wirkung mit der Inkubationszeit korrelierte (135).

Die Spiegel von IL-4 im Serum verändern sich nicht im Verlauf der Schwangerschaft. Es konnten auch keine signifikanten Unterschiede zwischen Candidagruppe und Kontrollgruppe des entsprechenden Gestationsalters festgestellt werden. Außerdem konnte IL-4 bei wenigen als der Hälfte der Probandinnen im Serum gemessen werden.

Marzi et al. beobachteten die Erhöhung von IL-4-Konzentrationen im Serum im Verlauf der normalen Schwangerschaft (90). Dies kann damit erklärt werden, dass die absolute Zahl von IL-4 synthetisierenden T-Helferzellen und zytotoxischen T- Lymphozyten sich während der Schwangerschaft erhöht.

Andererseits zeigten Shimaoka et al, dass IL-4-Konzentrationen im Serum im Laufe der Schwangerschaft im Vergleich mit nichtschwangeren Personen niedriger waren, insbesondere während des 2. Trimesters (117). Wir haben in unserer Studie nur Schwangere eingeschlossen, deshalb fehlt uns diese Art von Vergleichsgruppe. Da die gemessenen Werte im Serum aber niedrig sind und unter 10 pg/ml liegen, könnte vermutet werden, dass IL-4 im Serum während der Schwangerschaft nicht aktiviert wird.

Das proinflammatorische Zytokin IL-6 wurde als ein weiteres Th-2-Zytokin im Vaginallavage und im Serum gemessen. IL-6 wird häufig als Marker für infektionsbedingte Frühgeburten angesehen. Es wird in geringen Mengen im Fruchtwasser im 3. Trimester nachgewiesen, steigt aber während der Geburt an, und besonders stark bei intrauterinen Infektionen (59;63).

Bei einem Großteil des Patientenkollektives konnte dieses Zytokin im Vaginallavage nachgewiesen werden. Allerdings hatten Schwangere mit Besiedlung der Vagina mit *Candida spp.* in 95,1%-100% der Fälle im Gegensatz zu 87,7%-92,5% in der Kontrollgruppe IL-6 produziert. Auch die Werte in der Candidagruppe lagen während der ganzen Schwangerschaft höher als in der Kontrollgruppe, obwohl der Unterschied im 2. Trimester nicht

signifikant war. Dies lässt trotzdem vermuten, dass IL-6 zur Immunantwort auf *Candida spp.* beiträgt.

Im Laufe der Schwangerschaft sanken die Spiegel von IL-6 im Vaginallavage kontinuierlich vom 1. bis zum 3. Trimester sowohl in der Candidagruppe als auch in der Kontrollgruppe, obwohl signifikante Unterschiede nur in der Kontrollgruppe und nur zwischen 2. und 3. Trimester festgestellt wurden.

Donders et al. haben gezeigt, dass die Konzentrationen von IL-6 und IL-8 im Vaginalsekret von gesunden Schwangeren während des 2. Trimesters supprimiert waren und am Ende des 3. Trimesters stiegen (34).

Arbeitsgruppen von Kalinka et al. und Simhan et al. haben festgestellt, dass die supprimierte Immunfunktion in der Vagina bei Frauen mit pathologischer Mikroflora während der Frühschwangerschaft, was anhand einer niedrigen Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen IL-6 und IL-8 gesehen werden kann, einen Risikofaktor für Chorioamnionitis und Frühgeburt darstellt (67;123). Donders et al. haben außerdem gezeigt, dass der Anstieg des IL-6 mit erhöhter Produktion von Prostaglandinen und Geburtauslösung assoziiert ist. So konnte die erhöhte Synthese von IL-6 bei einer bakteriellen Vaginose als ein Risikofaktor für eine Frühgeburt definiert werden (35).

Unsere Studie hat diese Beobachtungen für IL-6 nicht bestätigt. Dies könnte aber daran liegen, dass bei keiner Schwangeren die Geburt innerhalb von wenigen Tagen nach der letzten Untersuchung stattgefunden hat und keine infektionsbedingte Geburtskomplikationen in der Kohorte auftraten. Dies ist ein Beweis dafür, dass alle Frauen intakte Fruchtblasen hatten. Da fetales Fibronectin in der Vagina als Marker für eine Frühgeburt zählt und auf mikroskopische Risse in der Fruchtblase verweisen kann, konnte vermutet werden, dass die Zytokine in der Vagina im Falle von Mikrorissen die Konzentration im Fruchtwasser und nicht die wahre Konzentration in der zervikovaginalen Sekretion spiegeln (65). Der Anstieg des IL-6 im

Vaginalsekret kurz vor der Geburt kann auf diese Mikrorisse zurückgeführt werden.

Im Serum konnten wir keine Unterschiede in den Konzentrationen von IL-6 zwischen Candidagruppe und Kontrollgruppe feststellen. IL-6 Spiegel veränderten sich auch nicht im Laufe der Schwangerschaft.

Nowak et al. beobachteten, dass Konzentrationen von IL-6 und IL-8 im Serum sich in normalen Schwangerschaften nicht veränderten. Jedoch stiegen Konzentrationen von IL-6 im Serum während der Entbindung sehr stark an (102).

IL-8 spielt wie IL-1 β eine wichtige Rolle in der Reifung der Zervix, da es ein starkes Chemoattraktant für Neutrophilen ist. Die Neutrophile in der Zervix sind die Hauptquelle für Fermente Kollagenase und Elastase, die zur Geburt führende strukturelle Veränderungen in der Zervix verursachen. Wenn es frühzeitig zur Dilatation der Zervix führt, kann eine Frühgeburt entstehen. Dabei steigt die Konzentration von Neutrophilen zur Beginn der Geburt sehr stark an. Die Synthese von IL-8 in der Zervix wird von IL-1 β stimuliert (16;133).

In klinischen Situationen, in denen eine Geburtauslösung notwendig ist, kann eine pharmakologische Reifung der Zervix mittels einer lokalen Applikation von PGE₂-erhaltenden Medikamenten oder IL-8 erreicht werden. Die Geburt kann allerdings durch direkte Wirkung von PGE₂ auf Myometrium bei vaginaler Anwendung ausgelöst werden. Diese Tatsachen lassen vermuten, dass die erhöhte Synthese von PGE₂ und IL-8 sowie IL-1 β zur frühzeitigen Geburtauslösung beitragen kann (69).

Die erhöhten Konzentrationen von IL-8 im Vaginalsekret können zur Infiltration der Zervix mit Neutrophilen führen, was zur Degradation von Kollagen durch Freisetzung von Fermenten Kollagenase und Elastase führt. Es hat die Reifung der Zervix zufolge und kann Frühgeburten auslösen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die erhöhten Konzentrationen von IL-1 β und IL-8 zur früheren Reifung der Zervix führen können. IL-1 β löst die

Produktion von Kollagenase aus und stimuliert die Synthese von Elastase in Fibroblasten. Romero und Maradny haben beschrieben, dass erhöhte Konzentrationen von IL-8 mit der Verlängerung des unteren Uterinsegmentes und mit der Geburt assoziiert sind (17;134).

In unserer Studie wurde gezeigt, dass sich die Konzentrationen von IL-8 im Vaginallavage im Laufe der Schwangerschaft in der Gruppe ohne Kolonisation mit *Candida spp.* in verschiedenen Untersuchungsterminen nicht signifikant voneinander unterscheiden, obwohl es tendenziell zur Steigung der Werte kommt. In der Candidagruppe dagegen waren die Konzentrationen von IL-8 während des 1. Trimesters im Vergleich mit dem 2. Trimester erhöht, sanken dann und blieben bis zum Ende des 3. Trimesters unverändert.

Der Vergleich der Candidagruppe mit der Kontrollgruppe zeigt, dass Frauen mit einer Kolonisation der Vagina mit *Candida spp.* mehr IL-8 produzieren.

Donders et al. haben gezeigt, dass die Konzentrationen von IL-8 im Vaginalsekret bei gesunden Schwangeren während des 2. Trimesters supprimiert waren und am Ende des 3. Trimesters stiegen (38). Wir haben dies in der vorliegenden Studie nicht beobachtet. Die höheren Werte in der Candidagruppe reichen vermutlich nicht aus, um Frühgeburten auszulösen.

Als weiteres antiinflammatorische Zytokin wurde IL-10 im Vaginallavage und im Serum gemessen.

IL-10 wird in der Vagina von aktivierten Monozyten und T-Zellen produziert. Es ist als Hauptinhibitor der Immunantwort beschrieben, obwohl es auch einige stimulierende Wirkungen aufweist. IL-10 inhibiert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-12 von Monozyten und Neutrophilen und hat pleiotrope Wirkung auf T-Zellen. IL-10 ist ein Schlüsselzytokin in der Regulation der Th-2 Immunantwort, da es die Expression von Th-1 Zytokine IL-12 und IFN γ senkt (28).

Betrachtet man die Konzentrationen von IL-10 im Vaginallavage, lässt sich feststellen, dass sie sich im Verlauf der Schwangerschaft sowohl in der Candidagruppe als auch in der Kontrollgruppe nicht verändern.

Ein Vergleich von Kontrollgruppe und Candidagruppe zeigt, dass signifikante Unterschiede nur im 3. Trimester festzustellen sind. Die Konzentration von IL-10 in der Candidagruppe ist hierbei höher.

Es kann damit erklärt werden, dass zu diesem Zeitpunkt die Synthese von IL-10 von *Candida* spp. in der Vagina stimuliert wird, was die inflammatorische Immunantwort auf dieses Pathogen limitiert. Die gleichen Ergebnisse wurden in der Arbeit von Weissenbacher et al. in der Gruppe von nichtschwangeren Patientinnen mit chronisch-rezidivierenden Vulvovaginalcandidose beschrieben (144).

Die erhöhte Synthese von IL-10 konnte durch eine dauerhafte Irritation und Entzündung von Gewebe entstehen. Dies führt auch zur Senkung der Produktion von Th-1 Zytokinen und schafft dadurch die Voraussetzungen für Persistenz (78;144).

Das kann auch mit Beobachtungen von Tascini et al bestätigt werden. Sie zeigten, dass Neutrophile, die mit humanem IL-4 und IL-10 inkubiert wurden, geminderte candidacide Wirkung aufwiesen, wobei die Stärke der Wirkung mit der Inkubationszeit korrelierte (137).

Die Konzentrationen von IL-10 im Blutserum verändern sich nicht im Laufe der Schwangerschaft. Es können auch keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

Die Arbeitsgruppe von Elenkov konnte keinen Unterschied in der Produktion von IL-10 zwischen schwangeren und nichtschwangeren sowie postpartalen Frauen feststellen, obwohl die Studie von Marzi zeigte, dass die Konzentration von IL-10 im Serum während der Schwangerschaft im Vergleich mit nichtschwangeren Frauen höher war. Das kann mit Unterschieden in den Untersuchungsmethoden erklärt werden, da die Studie von Elenkov durch LPS-Stimulation die monozytare Produktion von IL-10

abgeschätzt hat, wogegen die Studie von Marzi durch Stimulation mit Mitogenen höchstwahrscheinlich die lymphozytare Produktion gemessen hat (41;89). Die Studie von Holmes et al untersuchte die Bedeutung von IL-10 im Serum während der Schwangerschaft und hat ähnliche Ergebnisse wie die Arbeitsgruppe von Marzi erhalten. Es wurde gezeigt, dass die Konzentration von IL-10 im Plasma sich zwar während der Schwangerschaft nicht verändert hat, aber signifikant höher war als in der Gruppe von Nichtschwangeren. Das beweist, dass die Erhöhung des IL-10 Niveaus während der Schwangerschaft physiologisch ist und wahrscheinlich laut Theorie über die Th-2-Dominanz für das Überleben des Kindes sorgt (62). Dies wurde auch in einer Studie von Marzi et al bestätigt. Hier wurde in der Gruppe mit Spontanaborten eine Senkung der IL-10 Spiegel beobachtet (88).

Tagawa et al. stellten dagegen fest, dass die Konzentration von IL-10 im Serum während der Schwangerschaft im Vergleich zur postpartalen Periode supprimiert war und sich im Laufe der Schwangerschaft auch nicht veränderte (127).

In vorliegender Studie wurden freigesetzte Zytokine gemessen, deswegen ist es unmöglich zu sagen, welche Zellen IL-10 produziert haben. Die von uns gemessenen Konzentrationen reflektieren den Zytokinüberschuss im Serum und erlauben keine Beschreibung der zellulären Produktion.

Laut Literatur kann IL-10 nicht bei jeder Patientin im Serum nachgewiesen werden, was zeigt, dass Zytokine zwar die Änderungen auf lokalem Niveau beschreiben, sich aber nicht als Marker solcher Änderungen auf einem systemischen Niveau eignen.

IL-12 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das die Induktion einer Th1 Immunantwort verursacht, indem es zur Differenzierung von CD4⁺ Th1-Zellen führt. Auf diese Weise wird auch in der Vagina die lokale zellvermittelte

Immunantwort stimuliert. Die Hauptquelle von IL-12 sind APS, insbesondere Makrophagen (43).

In dieser Studie war IL-12 das einzige Zytokin, das in der Vagina in deutlich niedrigeren Konzentrationen als im Serum produziert wurde. Deswegen werden die Ergebnisse im Serum zuerst diskutiert.

Im Serum konnte bei 100% aller Frauen IL-12 nachgewiesen werden. Die Konzentrationen von IL-12 sanken tendenziell mit der Erhöhung des Gestationsalters in beiden Gruppen. Wir konnten jedoch keine Unterschiede zwischen Candidagruppe und Kontrollgruppe zu jedem Untersuchungszeitpunkt feststellen.

Die Studie von Elenkov et al. zeigte, dass eine monozytäre Produktion von IL-12 während des 3. Trimesters der Schwangerschaft 3-fach niedriger war, als nach der Entbindung. Die Konzentration von IL-12 bei nichtschwangeren Frauen war ebenfalls höher als während der Schwangerschaft, obwohl zwischen diesen Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde. Dies könnte allerdings auf eine breite intraindividuelle Variabilität in der Synthese der IL-12 bei gesunden Frauen zurückgeführt werden. Die Senkung der Produktion der IL-12 ist auf hormonelle Veränderungen während der Schwangerschaft zurückzuführen, insbesondere auf eine Erhöhung von Cortisol und Norepinefrin, da diese Hormone die Synthese von IL-12 und $TNF\alpha$ in Monozyten, Makrophagen und Th1-Zellen inhibieren (45).

Die verminderte Aktivität der Th1-Lymphozyten in der Schwangerschaft besteht offensichtlich nicht nur auf der systemen Ebene, sondern auch lokal in der Vagina, was unsere Ergebnisse für die Candidagruppe bestätigen.

IL-12 spielt eine wichtige Rolle in der lokalen proinflammatorischen Immunabwehr gegen *Candida spp* (95). Wir konnten jedoch keine Unterschiede in den IL-12-Spiegeln zwischen Candidagruppe und

Kontrollgruppe feststellen. Die Konzentrationen von IL-12 im Vaginallavage veränderten sich auch nicht im Laufe der Schwangerschaft.

Die Tatsache, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen Candidagruppe und Kontrollgruppe gab, lässt vermuten, dass die beschriebenen hormonellen Änderungen in der Schwangerschaft zur Senkung der natürlichen Abwehrmechanismen in der Vagina und zu einem lokalen Immunodefizit führen, wodurch *Candida spp.* nicht ausreichend eliminiert werden kann.

Ein interessanter Vergleich ist die Situation bei Patientinnen mit chronisch-rezidivierenden Vulvovaginalcandidose. Es wurde gezeigt, dass diese Patientinnen aufgrund einer geminderten oder fehlenden Produktion von Th1-Zytokinen unfähig sind, den Erreger zu eliminieren. Lilic et al haben beobachtet, dass diese Patienten nicht fähig sind, IL-12 zu synthetisieren, jedoch erhöhte Mengen an IL-6 und IL-10 produzieren. Es zeigt, dass das Fehlen der protektiven zellvermittelten Immunantwort zur Persistenz des Erregers führt (79;145).

Da die Th-1 Immunantwort, insbesondere IL-12 protektiv, gegen Infektionen mit *Candida spp.* wirkt und Th-1 Lymphozyten während der Schwangerschaft weniger aktiv sind, kommt es zur Proliferation von Erregern in der Vagina bei Progression der Schwangerschaft. Dazu tragen auch die lokalen Voraussetzungen bei, da durch Änderungen der vaginalen Mikroflora, die in der Einleitung beschrieben sind, die Vermehrung von *Candida spp.* begünstigt wird (48;80;145;168).

Der Zusammenhang zwischen Infektionen der Vagina und Schwangerschaftskomplikationen, u.a. Frühgeburten, ist seit langem bekannt. Nicht alle Frauen mit pathologischer Mikroflora entwickeln Komplikationen und manche entwickeln sie trotz Behandlung und prophylaktischen Maßnahmen. Dies ist auf die unterschiedlichen Arten einer Aktivierung der

Immunantwort der Wirte zurückzuführen, was wiederum von der genetischen Variabilität abhängig ist. Polymorphismus in Genregionen, die Zytokine kodieren, kann eine Chronisation oder asymptomatische Kolonisation bei verschiedenen Frauen erklären (39).

Die Bedeutung von *Candida spp.* in der Vagina während der Schwangerschaft und ihre mögliche Rolle als Risikofaktor für eine Frühgeburt wird bis jetzt kontrovers angesehen.

Aus unserer Sicht wichtige Ergebnisse lieferte die Arbeitsgruppe von Kiss et al (71). Sie hat sich mit dem allgemeinen Screening auf asymptomatische Infektionen während der Schwangerschaft beschäftigt. Neben Schwangeren mit bakterieller Vaginose wurden auch Frauen mit *Candida spp.* in der Vagina behandelt. Die Erreger wurden mittels Gramfärbung des Vaginalabstriches identifiziert.

Die durchgeführte Subgruppenanalyse hat überraschend gezeigt, dass die Frühgeburtenrate nicht nur in der Gruppe mit bakterieller Vaginose signifikant zurückging, sondern auch in der Gruppe von Frauen, die nur *Candida spp.* in der Vagina aufwiesen.

Ergebnisse von früheren Studien haben allerdings keine Assoziation zwischen einer Kolonisation mit *Candida spp.* und einer Frühgeburt feststellen können (29).

Die Ergebnisse von Kiss et al. könnten darauf zurückgeführt werden, dass die Frauen in der Interventionsgruppe unter genauerer Beobachtung der Ärzte standen und dadurch andere Frühgeburtsrisiken rechtzeitig diagnostiziert und behandelt wurden.

Aufgrund unserer Beobachtungen konnten wir nicht sagen, ob *Candida spp.* wirklich zu Frühgeburt beiträgt, da in der untersuchten Kohorte nur 7 Fälle von Frühgeburten zwischen der 26. und 36+6 SWW beobachtet wurden. Dies sind 7,1% in der Endkohorte, was den statistischen Zahlen für Bayern entspricht, da im Jahr 2003 insgesamt 5,4% Frühgeburten und 9,8%

Frühgeburten in Universitätskliniken beobachtet wurden (1). Um diese Frage beantworten zu können, sollte eine Kohortenstudie mit ungefähr 2000 Personen durchgeführt werden. Eine Fall-Kontroll-Studie ist für diese Fragestellung nicht geeignet, da die Fälle (Frauen, die eine Frühgeburt erlitten), nicht im Voraus identifiziert werden können. Da die Spiegel der Zytokine sich schnell ändern können, ist es bei diesem Studiendesign unmöglich zu entscheiden, welche Zytokine als Marker für die Risikopopulation gewählt werden können.

Es ist aus unserer Sicht wichtig, weitere Studien zur Bedeutung von Zytokine während der Schwangerschaft durchzuführen. Wenn die Rolle der Zytokine besser verstanden wird, können sie unter Umständen auch für Therapien gegen Frühgeburten eingesetzt werden. Dabei ist die rezeptorvermittelte Wirkung von Zytokinen von großer therapeutischer Bedeutung, da eine Unterbrechung der Entzündungskaskade mittels exogenen spezifischen Rezeptorantagonisten als therapeutische Möglichkeit bei Frühgeburten denkbar ist.

Es ist auch sehr wichtig das Gestationsalter bei einer Bestimmung der Zytokine zu berücksichtigen, da nur in diesem Fall die gemessenen Werte richtig interpretiert werden konnten.

6 Zusammenfassung

Fragestellung: Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Assoziation zwischen einer Kolonisierung der Vagina mit *Candida spp.* und den Konzentrationen von vaginalen Interleukinen IL-1 β , IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 in Relation zur Schwangerschaftsperiode zu beschreiben.

Studiendesign: Diese prospektive longitudinale Beobachtungsstudie wurde in der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde des Universitätsklinikum Großhadern von März 2002 bis Oktober 2004 durchgeführt. Das Studienkollektiv bestand aus 134 Frauen mit Einlingsschwangerschaften. Alle Frauen wurden zwischen der 6. und 16. Schwangerschaftswoche (SSW) rekrutiert und zwischen der 24. und 28. sowie der 35. und 38. SSW nachuntersucht. Die entsprechenden Vaginalabstriche wurden mittels einer kulturellen Anzucht und PCR-Amplifizierung auf *Candida spp.* getestet. Mittels ELISA wurden im Vaginallavage und im Serum Zytokine IL-1 β , IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 gemessen. Zusätzlich wurde das jeweilige IL-1ra:IL-1 β Verhältnis berechnet. Darüber hinaus wurden anamnestische Daten und die Ergebnisse von mikrobiologischen Untersuchungen erhoben. In die Endauswertung wurden die Daten von 98 Frauen mit vollständigen Ergebnissen und ohne lost to follow up aufgenommen. Für die statistische Analyse wurden der t-Test für unverbundene Stichproben, der Mann-Whitney U Tests für unverbundene Stichproben und der Vorzeichen-Rangtests von Wilcoxon für verbundene Stichproben verwendet.

Ergebnisse: Wir isolierten *Candida spp.* in 18 (18,3%) Fällen im 1. Trimester, in 25 (25,5%) Fällen im 2. Trimester und in 30 (30,6%) Fällen im 3. Trimester mittels einer kulturellen Anzucht bzw. in 25 (25,5%) Fällen im 1. Trimester, in 33 (33,7%) Fällen im 2. Trimester und in 41 (41,8%) Fällen im 3. Trimester mittels PCR-Amplifizierung. Dabei wurden *C. albicans* und *C. glabrata* identifiziert. Die Konzentrationen von IL-1 β im Vaginallavage waren im 1. und 3. Trimester ($p= 0,0002$, $p=0,0005$) in der Candidagruppe

signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Im Serum konnten signifikante Unterschiede nur im 2. Trimester festgestellt werden, wo die Werte in der Kontrollgruppe höher lagen ($p=0,036$). In den Konzentrationen von IL-1ra wurden keine signifikanten Unterschiede im Vaginallavage sowie im Serum festgestellt, mit Ausnahme vom 1. Trimester, wo die Werte in der Candidagruppe höher lagen ($p=0,0047$). Das IL-1ra: IL-1 β Verhältnis im Vaginallavage war jedoch in der Gruppe ohne Candida-Kolonisierung im Vergleich mit der Candidagruppe in allen drei Untersuchungszeitpunkten signifikant höher. Im Serum wurde kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt. Eine signifikante Erhöhung der IL-4-Konzentrationen wurde im 2. und 3. Trimester im Vaginallavage in der Candidagruppe nachgewiesen ($p=0,049$, $p=0,041$). IL-6 war im 1. und 3. Trimester signifikant höher im Vaginallavage in der Candidagruppe ($p=0,024$, $p=0,0053$). Die Konzentrationen von IL-8 im Vaginallavage waren in der Candidagruppe in allen Untersuchungszeitpunkten signifikant höher als in der Kontrollgruppe. IL-10 war im 3. Trimester im Vaginallavage in der Candidagruppe signifikant höher.

Im Serum ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Konzentrationen von IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 sowie IL-12 zwischen den beiden Gruppen. Ebenfalls konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen in den Konzentrationen von IL-12 im Vaginallavage festgestellt werden.

Im Laufe der Schwangerschaft stieg die Konzentration von IL-1 β und IL-8 in der Candidagruppe zum 3. Trimester, was in der Kontrollgruppe nicht beobachtet wurde.

Schlussfolgerungen: Die steigende Prävalenz der Besiedlung der Vagina mit *Candida spp.* im Verlauf der Schwangerschaft kann aufgrund der Ergebnisse dieser Studie folgendermaßen erklärt werden: Einerseits spielen für die Schwangerschaft typische Veränderungen im Scheidenmilieu eine große Rolle. Andererseits begünstigen die Veränderungen der lokalen Immunantwort die Entstehung der Kolonisierung mit *Candida spp.* Die Erhöhung von IL-4 und IL-6 zeigt, dass in Anwesenheit von *Candida spp.* die

Th-2 Immunantwort aktiviert wird. Dies trägt auch zu einer Suppression der lokalen zellvermittelten Immunität bei. Aufgrund signifikant höherer Werte von IL-1 β und IL-8 im Vaginallavage in der Candidagruppe kann die frühzeitige Reifung der Zervix und dementsprechend eine Frühgeburt nicht ausgeschlossen werden. Die Erhöhung der IL-10 in der Candidagruppe und die Tatsache niedriger IL-12-Konzentrationen weist auf eine Senkung der natürlichen Immunabwehr in der Vagina und ein lokales Immundefizit während der Schwangerschaft hin. Unsere Ergebnisse bestätigen auch, dass es wichtig ist, das IL-1ra:IL-1 β Verhältnis zu bestimmen, da bei einer erhöhten Produktion von IL-1 β oder einer supprimierten Synthese von IL-1ra eine Kolonisierung der Scheide mit *Candida spp.* begünstigt wird.

7 Literaturverzeichnis

1. Qualitaetsbericht Geburtshilfe. Jahresauswertung 2003. 2003. Bayerische Arbeitsgemeinschaft für Qualitätssicherung in der stationären Versorgung, Bayerische Landesärztekammer, Arbeitsgemeinschaft der Krankenkassen in Bayern, Bayerische Krankenhausgesellschaft e.V. Ref Type: Report
2. Aboyeji AP, Nwabuisi C. Prevalence of sexually transmitted diseases among pregnant women in Ilorin, Nigeria. *J Obstet Gynaecol* 2003;23:637-9.
3. Akerele J, Abhulimen P, Okonofua F. Prevalence of asymptomatic genital infection among pregnant women in Benin City, Nigeria. *Afr J Reprod Health* 2002;6:93-7.
4. Aloisi F, Ria F, Adorini L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today* 2000;21:141-7.
5. Ashman RB, Papadimitriou JM. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. *Microbiol Rev* 1995;59:646-72.
6. Athanassakis I, Vassiliadis S. Interplay between T helper type 1 and type 2 cytokines and soluble major histocompatibility complex molecules: a paradigm in pregnancy. *Immunology* 2002;107:281-7.
7. Athanassakis I, Vassiliadis S. Interplay between T helper type 1 and type 2 cytokines and soluble major histocompatibility complex molecules: a paradigm in pregnancy. *Immunology* 2002;107:281-7.
8. Balaka B, Agbere AD, Baeta S, Kessie K, Assimadi K. [Bacterial flora in the genital tract the last trimester of pregnancy]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2003;32:555-61.
9. Banchereau J, Steinmann R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
10. Bayo M, Berlanga M, Agut M. Vaginal microbiota in healthy pregnant women and prenatal screening of group B streptococci (GBS). *Int Microbiol* 2002;5:87-90.

11. Becker K. [Molecular biological differentiation of yeasts]. *Mycoses* 2000;43 Suppl 1:40-7.
12. Bell D, Young J, Banchereau J. Dendritic cells. *Adv Immunol* 1999;255-324.
13. Blankhart D, Muller O, Gresenguet G, Weis P. Sexually transmitted infections in young pregnant women in Bangui, Central African Republic. *Int J STD AIDS* 1999;10:609-14.
14. Blaschke-Hellmessen R. [Vertical transmission of *Candida* and its consequences]. *Mycoses* 1998;41 Suppl 2:31-6.
15. Bocking. Preterm labour: recent advances in understanding of pathophysiology, diagnosis and management. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998;10:151-6.
16. Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta* 2002;23:257-73.
17. Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta* 2002;23:257-73.
18. Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta* 2002;23:257-73.
19. Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta* 2002;23:257-73.
20. Braveny, I and Bodey, G. Opportunistische Pilzinfektionen. *Candida, Aspergillus, Cryptococcus*. 5-21. 2001. München, Medco Verlagsgesellschaft.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
21. bu-Elteen KH, bdul Malek AM, bdul Wahid NA. Prevalence and susceptibility of vaginal yeast isolates in Jordan. *Mycoses* 1997;40:179-85.
22. Chrousos G. Stress, chronic inflammation, and emotional and physical well-being: concurrent effects and chronic sequelae. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:275-91.

23. Cirak MY, Kalkanci A, Kustimur S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:1027-32.
24. Cirak MY, Kalkanci A, Kustimur S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:1027-32.
25. Claeys P, Ismailov R, Rathe S et al. Sexually transmitted infections and reproductive health in Azerbaijan. *Sex Transm Dis* 2001;28:372-8.
26. Clemons K, Spearow JL, Parmar R, Espiritu M, Stevensl D. Genetic Susceptibility of Mice to *Candida albicans* Vaginitis Correlates with Host Estrogen Sensitivity. *Infect Immun* 2004;72:4878-80.
27. Clemons KV, Calich VL, Burger E et al. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. *Med Mycol* 2000;38 Suppl 1:99-111.
28. Costeas PA, Koumouli A, Giantsiou-Kyriakou A, Papaloizou A, Koumas L. Th2/Th3 cytokine genotypes are associated with pregnancy loss. *Hum Immunol* 2004;65:135-41.
29. Cotch MF, Hillier SL, Gibbs RS, Eschenbach DA. Epidemiology and outcomes associated with moderate to heavy *Candida* colonization during pregnancy. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:374-80.
30. Daniels W, Glover DD, Essmann M, Larsen B. Candidiasis during pregnancy may result from isogenic commensal strains. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2001;9:65-73.
31. Di BS, Rodriguez M, Sauka D, berto De TR. [Microbiologic profile in symptomatic pregnant women's genital secretions in Gran Buenos Aires, Argentina]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001;19:99-102.
32. Diana A, Epiney M, Ecoffey M, Pfister RE. "White dots on the placenta and red dots on the baby": congenital cutaneous candidiasis--a rare disease of the neonate. *Acta Paediatr* 2004;93:996-9.
33. Donders GG, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Vereecken A, Van BB, Spitz B. Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:872-8.
34. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Spitz B. Vaginal cytokines in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1433-8.
35. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Spitz B. Vaginal cytokines in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1433-8.

36. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Spitz B. Vaginal cytokines in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1433-8.
37. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Spitz B. Vaginal cytokines in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1433-8.
38. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Spitz B. Vaginal cytokines in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1433-8.
39. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Spitz B. Vaginal cytokines in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1433-8.
40. Dufner, J, Jensen, U, and Schumacher, E. *Statistik mit SAS*. 3. Auflage. 2004. Wiesbaden, Teubner Verlag.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
41. Elenkov IJ, Wilder RL, Bakalov VK et al. IL-12, TNF-alpha, and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4933-8.
42. Elenkov IJ, Wilder RL, Bakalov VK et al. IL-12, TNF-alpha, and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4933-8.
43. Elenkov IJ, Wilder RL, Bakalov VK et al. IL-12, TNF-alpha, and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4933-8.
44. Elenkov IJ, Wilder RL, Bakalov VK et al. IL-12, TNF-alpha, and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4933-8.
45. Elenkov IJ, Wilder RL, Bakalov VK et al. IL-12, TNF-alpha, and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4933-8.
46. Fabbri M, Smart C, Pardi R. T lymphocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:1004-8.
47. Fallon PG, Jolin HE, Smith P 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.

48. Fidel PL, Jr. Immunity to *Candida*. *Oral Dis* 2002;8 Suppl 2:69-75.
49. Fidel PL, Jr., Cutright J, Steele C. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* 2000;68:651-7.
50. Fidel PL, Jr., Romero R, Ramirez M et al. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) production by human amnion, chorion, and decidua. *Am J Reprod Immunol* 1994;32:1-7.
51. Fonck K, Kidula N, Jaoko W et al. Validity of the vaginal discharge algorithm among pregnant and non-pregnant women in Nairobi, Kenya. *Sex Transm Infect* 2000;76:33-8.
52. Friebe-Hoffmann U, Bender DP, Sims CJ, Rauk PN. *Candida albicans* chorioamnionitis associated with preterm labor and sudden intrauterine demise of one twin. A case report. *J Reprod Med* 2000;45:354-6.
53. Frutos R, Fernandes-Espinar MT, Querol A. Identification of species of the genus *Candida* by the analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Kluwer Academic Publishers 2004;85:175-85.
54. Genc M, Witkin S, Delaney M et al. A disproportionate increase in IL-1b over IL-1ra in the cervicovaginal secretions of pregnant women with altered vaginal microflora correlates with preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:1191-7.
55. Gharizadeh B, Norberg E, Loffler J et al. Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing technology. *Mycoses* 2004;47:29-33.
56. Giraldo P, von NA, Gomes FA, Linhares I, Neves NA, Witkin SS. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol* 2000;95:413-6.
57. Giraldo P, von NA, Gomes FA, Linhares I, Neves NA, Witkin SS. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol* 2000;95:413-6.
58. Glover DD, Larsen B. Longitudinal investigation of candida vaginitis in pregnancy: role of superimposed antibiotic use. *Obstet Gynecol* 1998;91:115-8.
59. Gonzalez BE, Ferrer I, Valls C, Borrás M, Laila JM. The value of interleukin-8, interleukin-6 and interleukin-1beta in vaginal wash as predictors of preterm delivery. *Gynecol Obstet Invest* 2005;59:175-8.

60. Gurgan T, Diker KS, Hazirolu R, Urman B, Akan M. In vitro infection of human fetal membranes with *Candida* species. *Gynecol Obstet Invest* 1994;37:164-7.
61. Hidalgo LA, Chedraui PA, Chavez MJ. Obstetrical and neonatal outcome in young adolescents of low socio-economic status: a case control study. *Arch Gynecol Obstet* 2004.
62. Holmes VA, Wallace JM, Gilmore WS, McFaul P, Alexander HD. Plasma levels of the immunomodulatory cytokine interleukin-10 during normal human pregnancy: a longitudinal study. *Cytokine* 2003;21:265-9.
63. Inglis SR, Jeremias J, Kuno K et al. Detection of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and fetal fibronectin in the lower genital tract during pregnancy: relation to outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:5-10.
64. Inglis SR, Jeremias J, Kuno K et al. Detection of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and fetal fibronectin in the lower genital tract during pregnancy: relation to outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:5-10.
65. Inglis SR, Jeremias J, Kuno K et al. Detection of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and fetal fibronectin in the lower genital tract during pregnancy: relation to outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:5-10.
66. Ito Vilella FJ, Aguilera ZE, Cuesta Perez-Camino A et al. [Prevalence of vaginal candidiasis in a low-risk obstetric population in Santander]. *Aten Primaria* 2000;25:103-6.
67. Kalinka J, Sobala W, Wasiela M, Brzezinska-Blaszczyk E. Decreased proinflammatory cytokines in cervicovaginal fluid, as measured in midgestation, are associated with preterm delivery. *Am J Reprod Immunol* 2005;54:70-6.
68. Kamara P, Hylton-Kong T, Brathwaite A et al. Vaginal infections in pregnant women in Jamaica: prevalence and risk factors. *Int J STD AIDS* 2000;11:516-20.
69. Kelly RW. Inflammatory mediators and cervical ripening. *J Reprod Immunol* 2002;57:217-24.
70. Kelly RW. Inflammatory mediators and cervical ripening. *J Reprod Immunol* 2002;57:217-24.

71. Kiss H, Petricevic L, Husslein P. Prospective randomised controlled trial of an infection screening programme to reduce the rate of preterm delivery. *BMJ* 2004;329:371.
72. Klufio CA, Amoa AB, Delamare O, Hombhanje M, Kariwiga G, Igo J. Prevalence of vaginal infections with bacterial vaginosis, *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans* among pregnant women at the Port Moresby General Hospital Antenatal Clinic. *P N G Med J* 1995;38:163-71.
73. Kukner S, Kuscu E, Ergin T, Gokmen O. Vaginal thrush and its management in pregnancy. *J Pak Med Assoc* 1995;45:15-6.
74. Kunzelmann V, Tietz HJ, Rossner D et al. [Prerequisites for effective therapy of chronic recurrent vaginal candidiasis]. *Mycoses* 1996;39 Suppl 1:65-72.
75. Laskus A, Mendling W, Runge K, Schmidt A. [Is *Candida* septicemia in premature infants a nosocomial infection?]. *Mycoses* 1998;41 Suppl 2:37-40.
76. Leslie KK, Lee SL, Woodcock SM et al. Acute intrauterine infection results in an imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines in the pregnant rabbit. *Am J Reprod Immunol* 2000;43:305-11.
77. Levett PN. Aetiology of vaginal infections in pregnant and non-pregnant women in Barbados. *West Indian Med J* 1995;44:96-8.
78. Lilic D, Gravenor I, Robson N et al. Deregulated production of protective cytokines in response to *Candida albicans* infection in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Infect Immun* 2003;71:5690-9.
79. Lilic D, Gravenor I, Robson N et al. Deregulated production of protective cytokines in response to *Candida albicans* infection in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Infect Immun* 2003;71:5690-9.
80. Lilic D, Gravenor I, Robson N et al. Deregulated production of protective cytokines in response to *Candida albicans* infection in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Infect Immun* 2003;71:5690-9.
81. Lilic D, Gravenor I, Robson N et al. Deregulated production of protective cytokines in response to *Candida albicans* infection in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Infect Immun* 2003;71:5690-9.

82. Linhares LM, Witkin SS, Miranda SD, Fonseca AM, Pinotti JA, Ledger WJ. Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for *Candida* species by culture. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2001;9:221-5.
83. Lisiak M, Klyszejko C, Pierzchalo T, Marcinkowski Z. [Vaginal candidiasis: frequency of occurrence and risk factors]. *Ginekol Pol* 2000;71:964-70.
84. Makhoul IR, Sujov P, Smolkin T, Lusky A, Reichman B. Epidemiological, clinical, and microbiological characteristics of late-onset sepsis among very low birth weight infants in Israel: a national survey. *Pediatrics* 2002;109:34-9.
85. Mannarelli BM, Kurtzman CP. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *J Clin Microbiol* 1998;36:1634-41.
86. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996;106:127-33.
87. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996;106:127-33.
88. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996;106:127-33.
89. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996;106:127-33.
90. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996;106:127-33.
91. Mayaud P, Uledi E, Cornelissen J et al. Risk scores to detect cervical infections in urban antenatal clinic attenders in Mwanza, Tanzania. *Sex Transm Infect* 1998;74 Suppl 1:S139-S146.
92. McGuire W, Clerihew L, Fowlie PW. Infection in the preterm infant. *BMJ* 2004;329:1277-80.
93. Mencacci A, Cenci E, Del SG et al. IL-10 is required for development of protective Th1 responses in IL-12-deficient mice upon *Candida albicans* infection. *J Immunol* 1998;161:6228-37.

94. Mencacci A, Cenci E, Del SG et al. IL-10 is required for development of protective Th1 responses in IL-12-deficient mice upon *Candida albicans* infection. *J Immunol* 1998;161:6228-37.
95. Mencacci A, Cenci E, Del SG et al. IL-10 is required for development of protective Th1 responses in IL-12-deficient mice upon *Candida albicans* infection. *J Immunol* 1998;161:6228-37.
96. Mendling W, Seebacher C. Guideline vulvovaginal candidosis: guideline of the German Dermatological Society, the German Speaking Mycological Society and the Working Group for Infections and Infectimmunology of the German Society for Gynecology and Obstetrics. *Mycoses* 2003;46:365-9.
97. Merlino J, Tambosis E, Veal D. Chromogenic tube test for presumptive identification or confirmation of isolates as *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1998;36:1157-9.
98. Miksits, K and Hahn, H. Basiswissen medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. dritte, vollständig aktualisierte Auflage, 21-31. 2004. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
99. Nalbanski B, Tsekova K, Ivanov S. [Candidiasis and birth canal injuries]. *Akush Ginekol (Sofia)* 2002;41:23-5.
100. Nguyen MH, Peacock JE, Jr., Morris AJ et al. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 1996;100:617-23.
101. Noverr MC, Phare SM, Toews GB, Coffey MJ, Huffnagle GB. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect Immun* 2001;69:2957-63.
102. Nowak M, Oszukowski P, Szpakowski M et al. [Maternal serum cytokines concentrations during normal pregnancy and labor]. *Ginekol Pol* 1998;69:1283-7.
103. O'Rourke L, Tooze R, Fearon D. Co-receptors of B lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1997;324-9.
104. Peterek J. [Importance of the vaginal ecosystem examination in the first trimester of pregnancy]. *Ginekol Pol* 2003;74:1526-30.
105. Pradeepkumar VK, Rajadurai VS, Tan KW. Congenital candidiasis: varied presentations. *J Perinatol* 1998;18:311-6.

106. Qureshi F, Jacques SM, Bendon RW et al. Candida funisitis: A clinicopathologic study of 32 cases. *Pediatr Dev Pathol* 1998;1:118-24.
107. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000;15:713-8.
108. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000;15:713-8.
109. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000;15:713-8.
110. Reid S, Penna G, Adorini L. The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2000;12:114-21.
111. Reiner SL, Seder RA. T helper cell differentiation in immune response. *Curr Opin Immunol* 1995;7:360-6.
112. Roitt, IM, Brostoff, J, and Male, DK. *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. 3. Auflage. 1995. Stuttgart, Thieme Verlag.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
113. Rosenwasser LJ. Promoter polymorphism in the candidate genes, IL-4, IL-9, TGF-beta1, for atopy and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:268-70.
114. Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 2000;47:87-103.
115. Schaller M, Boeld U, Oberbauer S, Hamm G, Hube B, Korting HC. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis. *Microbiology* 2004;150:2807-13.
116. Scholl P, Geha R. MHC class II signaling in B-cell activation. *Immunol Today* 1994;4:18-22.
117. Shimaoka Y, Hidaka Y, Tada H et al. Changes in cytokine production during and after normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2000;44:143-7.

118. Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol* 1997;35:1454-9.
119. Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol* 1997;35:1454-9.
120. Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol* 1997;35:1454-9.
121. Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol* 1997;35:1454-9.
122. Simhan HN, Caritis SN, Krohn MA, Martinez de TB, Landers DV, Hillier SL. Decreased cervical proinflammatory cytokines permit subsequent upper genital tract infection during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:560-7.
123. Simhan HN, Caritis SN, Krohn MA, Martinez de TB, Landers DV, Hillier SL. Decreased cervical proinflammatory cytokines permit subsequent upper genital tract infection during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:560-7.
124. Simoes JA, Giraldo PC, Faundes A. Prevalence of cervicovaginal infections during gestation and accuracy of clinical diagnosis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1998;6:129-33.
125. Song Z, Casolaro V, Chen R, Georas SN, Monos D, Ono SJ. Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene. *J Immunol* 1996;156:424-9.
126. 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.
127. Tagawa N, Hidaka Y, Takano T, Shimaoka Y, Kobayashi Y, Amino N. Serum concentrations of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate and their relation to cytokine production during and after normal pregnancy. *Clin Chim Acta* 2004;340:187-93.
128. Tanaka Y, Narahara H, Takai N, Yoshimatsu J, Anai T, Miyakawa I. Interleukin-1beta and interleukin-8 in cervicovaginal fluid during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:644-9.

129. Tanaka Y, Narahara H, Takai N, Yoshimatsu J, Anai T, Miyakawa I. Interleukin-1beta and interleukin-8 in cervicovaginal fluid during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:644-9.
130. Tanaka Y, Narahara H, Takai N, Yoshimatsu J, Anai T, Miyakawa I. Interleukin-1beta and interleukin-8 in cervicovaginal fluid during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:644-9.
131. Tanaka Y, Narahara H, Takai N, Yoshimatsu J, Anai T, Miyakawa I. Interleukin-1beta and interleukin-8 in cervicovaginal fluid during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:644-9.
132. Tanaka Y, Narahara H, Takai N, Yoshimatsu J, Anai T, Miyakawa I. Interleukin-1beta and interleukin-8 in cervicovaginal fluid during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:644-9.
133. Tanaka Y, Narahara H, Takai N, Yoshimatsu J, Anai T, Miyakawa I. Interleukin-1beta and interleukin-8 in cervicovaginal fluid during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:644-9.
134. Tanaka Y, Narahara H, Takai N, Yoshimatsu J, Anai T, Miyakawa I. Interleukin-1beta and interleukin-8 in cervicovaginal fluid during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:644-9.
135. Tascini C, Baldelli F, Monari 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.
136. Tascini C, Baldelli F, Monari 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.
137. Tascini C, Baldelli F, Monari 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.
138. Thongkrajai P, Thongkrajai E, Pengsaa P, Pakarasang M. The prevalence of Chlamydia trachomatis infection in rural Thai women. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999;30:52-7.
139. Torosantucci A, Chiani P, Cassone A. Differential chemokine response of human monocytes to yeast and hyphal forms of *Candida albicans* and its relation to the beta-1,6 glucan of the fungal cell wall. *J Leukoc Biol* 2000;68:923-32.
140. van der Poll T, van Deventer S. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999;13:413-26.

141. Villar CC, Kashleva H, Dongari-Bagtzoglou A. Role of *Candida albicans* polymorphism in interactions with oral epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:262-9.
142. Waggoner-Fountain LA, Walker MW, Hollis RJ et al. Vertical and horizontal transmission of unique *Candida* species to premature newborns. *Clin Infect Dis* 1996;22:803-8.
143. Weissenbacher, E. R. and Spitzbart, H. *Mykosen in der Frauenheilkunde. Diagnostik und Therapie. Fluorpraktikum II. 2. überarbeitete Auflage, 7-34. 2001. München, Medifact-Publishing KG. Ref Type: Serial (Book, Monograph)*
144. Weissenbacher S, Witkin SS, Tolbert V 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.
145. Weissenbacher S, Witkin SS, Tolbert V 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.
146. Wiesinger EC, Mayerhofer S, Wenisch C, Breyer S, Graninger W. Fluconazole in *Candida albicans* sepsis during pregnancy: case report and review of the literature. *Infection* 1996;24:263-6.
147. Williams DW, Wilson MJ, Lewis MA, Potts AJ. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol* 1995;33:2476-9.
148. Willinger B, Berger A, Li L et al. Epidemiological analysis of *Candida* yeasts by pulsed-field gel electrophoresis. *Mycoses* 1994;37:401-3.
149. Witkin SS. Immunology of the vagina. *Clin Obstet Gynecol* 1993;36:122-8.
150. Witkin SS. Immunology of the vagina. *Clin Obstet Gynecol* 1993;36:122-8.
151. Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis* 2002;34:204-9.
152. Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis* 2002;34:204-9.

153. Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis* 2002;34:204-9.
154. Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis* 2002;34:204-9.
155. Witkin SS, Gravett MG, Haluska GJ, Novy MJ. Induction of interleukin-1 receptor antagonist in rhesus monkeys after intraamniotic infection with group B streptococci or interleukin-1 infusion. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:1668-72.
156. Witkin SS, Vardhana S, Yih M, Doh K, Bongiovanni AM, Gerber S. Polymorphism in intron 2 of the fetal interleukin-1 receptor antagonist genotype influences midtrimester amniotic fluid concentrations of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1413-7.
157. Witkin SS, Vardhana S, Yih M, Doh K, Bongiovanni AM, Gerber S. Polymorphism in intron 2 of the fetal interleukin-1 receptor antagonist genotype influences midtrimester amniotic fluid concentrations of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1413-7.
158. Xiong J, Kang K, Liu L, Yoshida Y, Cooper KD, Ghannoum MA. *Candida albicans* and *Candida krusei* differentially induce human blood mononuclear cell interleukin-12 and gamma interferon production. *Infect Immun* 2000;68:2464-9.
159. Xiong J, Kang K, Liu L, Yoshida Y, Cooper KD, Ghannoum MA. *Candida albicans* and *Candida krusei* differentially induce human blood mononuclear cell interleukin-12 and gamma interferon production. *Infect Immun* 2000;68:2464-9.
160. Xu B, Pekkanen J, Järvelin MR, Olsen P, Hartikainen AL. Maternal infections in pregnancy and the development of asthma among offsprings. *Int J Epidemiol* 1999;28:723-7.
161. Xu J, Sobel JD. *Candida Vulvovaginitis* in Pregnancy. *Curr Infect Dis Rep* 2004;6:445-9.
162. Xu J, Sobel JD. *Candida Vulvovaginitis* in Pregnancy. *Curr Infect Dis Rep* 2004;6:445-9.
163. Xu J, Sobel JD. *Candida Vulvovaginitis* in Pregnancy. *Curr Infect Dis Rep* 2004;6:445-9.

164. Xu J, Sobel JD. Candida Vulvovaginitis in Pregnancy. *Curr Infect Dis Rep* 2004;6:445-9.
165. Xu J, Sobel JD. Candida Vulvovaginitis in Pregnancy. *Curr Infect Dis Rep* 2004;6:445-9.
166. Xu J, Sobel JD. Candida Vulvovaginitis in Pregnancy. *Curr Infect Dis Rep* 2004;6:445-9.
167. Xu J, Sobel JD. Candida Vulvovaginitis in Pregnancy. *Curr Infect Dis Rep* 2004;6:445-9.
168. Xu J, Sobel JD. Candida Vulvovaginitis in Pregnancy. *Curr Infect Dis Rep* 2004;6:445-9.
169. Yim SF, Lyon DJ, Chung TK, Haines CJ. A prospective study of the microbiological environment of the genitourinary tract in Hong Kong Chinese women during pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1995;35:178-81.

8 Anhang

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Erreger der Mykosen im Genitalbereich.....	9
Tabelle 2	Prävalenz des Nachweises von <i>Candida spp.</i> in verschiedenen Ländern	11
Tabelle 3	Demographische Charakteristika	39
Tabelle 4	Ergebnisse der kultureller Anzüchtung mit Candidaspezifizierung mittels CHROM-Agar in drei Schwangerschaftstrimestern.....	40
Tabelle 5	Ergebnis der PCR-Untersuchungen in drei Schwangerschaftstrimestern.....	41
Tabelle 6	Vergleich der Ergebnissen von kultureller Anzüchtung und PCR	42
Tabelle 7	Vaginale Kolonisierung mit <i>Candida spp.</i> und Konzentrationen von IL-1 β im Vaginallavage.....	45
Tabelle 8	Vaginale Kolonisierung mit <i>Candida spp.</i> und Konzentrationen von IL-1 β im Blutserum	47
Tabelle 9	Vaginale Kolonisierung mit <i>Candida spp.</i> und Konzentrationen von IL-1ra im Vaginalsekret	49
Tabelle 10	Vaginale Kolonisierung mit <i>Candida spp.</i> und Konzentrationen von IL-1ra im Blutserum.....	51
Tabelle 11	Verhältnis IL-1ra: IL-1 β im Vaginalsekret	52
Tabelle 12	Verhältnis IL-1ra: IL-1 β im Serum	52
Tabelle 13	Vaginale Kolonisierung mit <i>Candida spp.</i> und Konzentrationen von IL-4 im Vaginallavage.....	54
Tabelle 14	Vaginale Kolonisierung mit <i>Candida spp.</i> und Konzentrationen von IL-4 im Blutserum	56
Tabelle 15	Vaginale Kolonisierung mit <i>Candida spp.</i> und Konzentrationen von IL-6 im Vaginallavage.....	58

Tabelle 16	Vaginale Kolonisierung mit <i>Candida spp.</i> und Konzentrationen von IL-6 im Blutserum.....	60
Tabelle 17	Vaginale Kolonisierung mit <i>Candida spp.</i> und Konzentrationen von IL-8 im Vaginallavage.....	62
Tabelle 18	Vaginale Kolonisierung mit <i>Candida spp.</i> und Konzentrationen von IL-8 im Blutserum.....	64
Tabelle 19	Vaginale Kolonisierung mit <i>Candida spp.</i> und Konzentrationen von IL-10 im Vaginallavage.....	66
Tabelle 20	Vaginale Kolonisierung mit <i>Candida spp.</i> und Konzentrationen von IL-10 im Blutserum.....	68
Tabelle 21	Vaginale Kolonisierung mit <i>Candida spp.</i> und Konzentrationen von IL-12 im Vaginallavage.....	70
Tabelle 22	Vaginale Kolonisierung mit <i>Candida spp.</i> und Konzentrationen von IL-12 im Blutserum.....	72
Tabelle 23	Konzentrationen der Zytokine im vaginallavage und im Serum	Error! Bookmark not defined.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Prävalenz von Colonisation und Infektion der Vagina mit <i>Candida spp.</i> in verschiedenen Ländern.....	10
Abbildung 2	Konzentrationen von IL-1 β (pg/ml) im Vaginallavage in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit <i>Candida spp.</i>	44
Abbildung 3	Konzentrationen von IL-1 β (pg/ml) im Serum in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit <i>Candida spp.</i>	46
Abbildung 4	Konzentrationen von IL-1ra (pg/ml) im Vaginallavage in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit <i>Candida spp.</i>	48

Abbildung 5	Konzentrationen von IL-1ra (pg/ml) im Serum in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit <i>Candida spp.</i>	50
Abbildung 6	Konzentrationen von IL-4 (pg/ml) im Vaginallavage in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit <i>Candida spp.</i>	53
Abbildung 7	Konzentrationen von IL-4 (pg/ml) im Serum in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit <i>Candida spp.</i>	55
Abbildung 8	Konzentrationen von IL-6 (pg/ml) im Vaginallavage in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit <i>Candida spp.</i>	57
Abbildung 9	Konzentrationen von IL-6 (pg/ml) im Serum in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit <i>Candida spp.</i>	59
Abbildung 10	Konzentrationen von IL-8 (pg/ml) im Vaginallavage in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit <i>Candida spp.</i>	61
Abbildung 11	Konzentrationen von IL-8 (pg/ml) im Serum in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit <i>Candida spp.</i>	63
Abbildung 12	Konzentrationen von IL-10 (pg/ml) im Vaginallavage in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit <i>Candida spp.</i>	65
Abbildung 13	Konzentrationen von IL-10 (pg/ml) im Serum in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit <i>Candida spp.</i>	67
Abbildung 14	Konzentrationen von IL-12 (pg/ml) im Vaginallavage in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit <i>Candida spp.</i>	69

Abbildung 15 Konzentrationen von IL-12 (pg/ml) im Serum in Relation zur Schwangerschaftszeit und Kolonisationsstatus mit *Candida spp.*.....71

8.3 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
Spektralphotometer, Typ Anthos	Anthos Labtec Instruments Österreich
Polaroidkamera, Typ GelCam	UniEquip, München-Martinsried, Deutschland
UV-Leuchtkasten, Typ N 90	UniEquip, München-Martinsried, Deutschland
Vortexgerät, Typ VF 2	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Deutschland
Wasserbad, Typ B3	Haake
Brutschrank, Typ 2770	Köttermann
Mikrowellengerät, Typ MC 653	Udo Classen G.m.b.H, Kempen, Deutschland
Plattenvortexgerät, Typ 301 EVT	A-B Laborsystem, Greiling Deutschland

8.4 Reagenzien

Lytikase

Reagenzien	Hersteller
0,5 M EDTA	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
PBS	Life Technologies, Paisley/Scotland
2% Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
Lytikase	Sigma, St. Louis, Missouri/USA

Nonionic Detergent Puffer (NID Puffer)

Reagenzien	Hersteller
KCl 50 mM	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
Tris-HCl 10 mM	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
MgCl ₂ 2,5 mM	Sigma, St. Louis, Missouri/USA
Polypxyethylenlaurylether	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, Deutschland

Aqua a.i.	Boehringer, Mannheim / Deutschland
CT/NG Lysis	Diagnostics, Branchburg, New Jersey/USA
Mineralöl	Applied Biosystems
Proteinase K 5,0 mg/ml	Sigma, St. Louis, Missouri/USA

DNA-Polymerisationsmix

Reagenzien	Hersteller
MgCl ₂ 25mM	Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey / USA
Desoxynukleosid- 10mM triphosphate (dNTP), (dATP, aTTP, dGTP und dCTP)	Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey / USA

PCR-Primer	Life Technologies, Paisley, Scotland
10X PCR-Puffer (pH 8,3)	Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey / USA
KCl 500mM	
Tris-HCl 100mM	
MgCl 15mM	
Taq-Polymerase: 5 U/μl	Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey / USA
Zusammensetzung des dNTP-Mixes: dATP, dCTP, dGTP und dTTP	Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey / USA

Agarosegel

Reagenzien	Hersteller
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
10XTBE (Tris Boric EDTA) 25ml - Tris-Borat (pH 8,3) 1 M - EDTA 20mM - Deionisiertes Wasser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
1XTE - Tris-HCl 5ml - EDTA 1ml - Aqua a.i. 494 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
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

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im interdisziplinären STD-Labor unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. med. E.R. Weissenbacher, in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum Großhadern, LMU.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. E.R. Weissenbacher für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas, für seine fachliche Unterstützung sowie die wertvollen Anregungen bei der Anfertigung der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. med. H. Spitzbart danke ich für die Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit und für die Ratschläge bezüglich der Korrektur des Manuskriptes.

Den Mitarbeitern des Studienganges „Öffentliches Gesundheitswesen und Epidemiologie“ danke ich für die Vermittlung von wertvollen biometrischen Kenntnissen, die mir die selbständige statistische Bearbeitung der Ergebnisse ermöglicht haben.

Herrn Frank Georgi danke ich ganz herzlich für seine Unterstützung, sein Verständnis und die wertvolle Korrektur der Arbeit.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Tatiana Azbil
geboren am 14.11.1976 in Baku, UdSSR
ledig

Postgraduales Studium

April 2004 – Februar 2006 Postgraduales Studium „Öffentliche Gesundheit und Epidemiologie“, Medizinische Fakultät, LMU
Magisterarbeit zum Thema: „Epidemiologie und Effektivität der Therapie bei Vulvovaginalcandidosen“

Weiterbildung

September 2000 – Oktober 2002 Aspirantur am Lehrstuhl für Geburtshilfe und Frauenheilkunde der Moskauer medizinischen Setschenov Akademie

April 2001 Prüfung: Geburtshilfe und Frauenheilkunde, Note „sehr gut“

Studium

September 1993 - Juni 2000 Studium der Humanmedizin an der Moskauer medizinischen Setschenov Akademie

Staatliche Abschlussprüfungen, Note „sehr gut“

Oktober 1998 - August 1999 Teilnahme am Austauschprogramm zwischen der Moskauer medizinischen Setschenov Akademie und der Ludwig-Maximilians-Universität, München (Begabtenförderung der Regierung von Oberbayern)

Zusatzqualifikation

September 1996 – Juni 2000 Zusätzliche Ausbildung im Rahmen des Studiums im Fach Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Famulaturen

Juli 1997 Arztassistentin in der Reanimationsabteilung und in der Notfallchirurgie, Moskauer medizinische Setschenov Akademie

Juli 1996 Arztassistentin, Innere Abteilung, Moskauer medizinische Setschenov Akademie

Schulbildung

1983 – 1993 Allgemeinbildende Mittelschule Nr. 275 in Moskau, Abschluss mit sehr gutem Erfolg

Veröffentlichungen und Vorträge

Oktober 2005	„Vaginal cytokines in pregnant women with normal vaginal microflora and colonisation with Candida spp. during the course of pregnancy“, 16 th European Student Conference
November 2003	„Differences in concentration of interleukins in cervicovaginal fluid and serum in patients with normal and preterm birth“, 8 th World Congress for infectious and immunological diseases in obstetrics and gynaecology
Juni 2003	„Zytokine bei Schwangeren“, VII. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Infektionen und Infektionsimmunologie in der Gynäkologie Geburtshilfe der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie Geburtshilfe, der European Society for Infectious Diseases in OB/GYN (ESIDOG)
April 2003	„Differences in concentration of interleukins in cervicovaginal fluid and serum in patients with normal and preterm birth“, Eighth Annual Meeting of International Infectious Disease Society for OB/GYN, USA
April 2000	„Das Spektrum und antimikrobielle Empfindlichkeit der Sepsiserreger in der gynäkologischen Klinik“, Auszeichnung mit dem 3. Preis der Wissenschaftsakademie RF für die beste Forschungsarbeit zwischen Nachwuchsforschern.

Praktische Tätigkeiten

Seit Januar 2004	Werkstudentin bei MERG (Medical Economic Research Group), München
August 2004 - September 2004	Werkstudentin bei Accenture GmbH, München
Oktober 2002 – Oktober 2005	Tätigkeit als Dolmetscherin für russischsprachige Patienten
Oktober 2000 – August 2001	Mitarbeit im hämostaseologischen Labor der Moskauer medizinischen Setschenov Akademie

EDV-Kenntnisse

Word, Excel, Access, Power-Point, SAS, DATA

Sprachkenntnisse

Russisch	Muttersprache
Deutsch	fließend in Wort und Schrift
Englisch	gute Kenntnisse