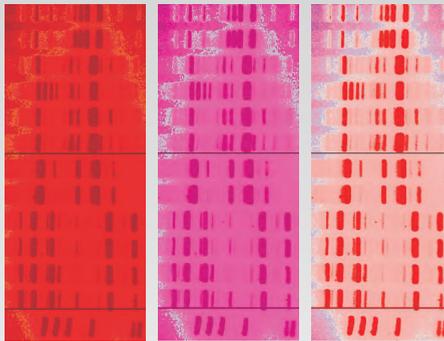


**INA ZÖLLER**

**PCR-TYPISIERUNG VON CANDIDA SPEZIES  
IM ORO-INTESTINAL-TRAKT BEI IMMUN-  
SUPPRIMIERTEN UND ENDOKARDITIS-  
PROPHYLAXEPFLICHTIGEN KINDERN**



**INAUGURALDISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**PCR-Typisierung von *Candida spezies*  
im Oro-Intestinal-Trakt bei immunsupprimierten und  
endokarditisprophylaxepflichtigen Kindern**

**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Ina Zöller, geb. Wienke**  
aus Hannover

Gießen 2009

Aus dem Medizinischem Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
Poliklinik für Kinderzahnheilkunde  
Direktor: Prof. Dr. N. Krämer  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. W.-E. Wetzel

Gutachter: Prof. Dr. A. Reiter

Tag der Disputation: 24.02.2010

## Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zu Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen

Ina Zöller

**Für meine Familie**

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
2.1	Kariesätiologie.....	3
2.2	Candida.....	5
2.3	Candidiasis.....	6
2.4	Bedeutung einer Candidiasis unter Immunsuppression.....	9
2.5	Molekularbiologische Nachweismethoden.....	10
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODE.....</b>	<b>12</b>
3.1	Bezugsstudie/Studienvorbereitung.....	12
3.2	Experimentelle Untersuchungen.....	14
3.2.1	Isolierung chromosomaler DNA.....	14
3.2.2	Isolierung der Pilz-DNA.....	15
3.2.3	RAPD-PCR.....	16
3.2.4	Auswahl der Primer.....	18
3.2.5	DNA-Typisierung.....	21
3.3	Statistik.....	22
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>24</b>
4.1	Ausgangsbefunde (Bezugsstudie).....	24
4.1.1	Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Candida spezies.....	25
4.2	Befunde der vorliegenden Studie.....	26
4.2.1	Gruppenzuordnung der positiven Proben mit <i>C. albicans</i> .....	26
4.2.2	Häufigkeit von <i>C. albicans</i> in den verschiedenen Substanzen.....	27
4.2.3	RAPD-Typisierung der <i>C. albicans</i> -Stämme.....	28
4.2.3.1	Dendrogramm <i>C. albicans</i> .....	30
4.2.3.2	Genetische Übereinstimmung der <i>C. albicans</i> -Stämme.....	31
4.2.3.3	Genetische Identität (100%) der <i>C. albicans</i> -Stämme zwischen den Isolaten.....	32
4.2.3.4	RAPD-Beispiele.....	33

4.2.4	Gruppenzuordnung der positiven Proben mit <i>C. dubliniensis</i> .....	36
4.2.5	Häufigkeit von <i>C. dubliniensis</i> in den verschiedenen Substanzen.....	38
4.2.6	RAPD-Typisierung der <i>C. dubliniensis</i> -Stämme.....	39
4.2.6.1	Dendrogramm <i>C. dubliniensis</i> .....	39
4.2.6.2	Genetische Übereinstimmung der <i>C. dubliniensis</i> -Stämme.....	40
4.2.6.3	Genetische Übereinstimmung der <i>C. dubliniensis</i> -Stämme zwischen den Isolaten.....	41
4.2.6.4	RAPD-Beispiele.....	42
4.3	Falldokumentation.....	44
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>69</b>

## 1 Einleitung und Problemstellung

*Candida albicans*, erstmals 1853 von C. Robin als *Oidium albicans* beschrieben, ist der häufigste Erreger von opportunistischen Sprosspilzinfektionen beim Menschen [20,22]. Dieser fakultativ pathogene Erreger findet sich bei etwa 20-80% aller gesunden Erwachsenen im Orogastrointestinaltrakt, wo er als Saprophyt die Schleimhäute besiedelt [20,35]. Belegt ist auch das vermehrte Vorhandensein von *Candida albicans* in kariösen Zahnläsionen, wodurch es noch zu einer stärkeren Besiedelung des Magen-Darm-Traktes durch das Verschlucken der Erreger kommen kann [24]. Dieselbe Studie belegt, dass durch Behandlung der kariösen Läsionen die Erregerdichte vermindert wird. Windeldermatitis tritt bei einem von vier Kindern auf [63], ausgelöst durch das Verschlucken der Hefekeime und der sich anschließenden Kolonisation im Gastrointestinaltrakt bei entsprechender Disposition [44].

Zu den meist endogen ausgelösten Infektionen kommt es durch eine Reduktion der Gesamtkeimzahl bei gleichzeitig extremer Vermehrung von *Candida albicans*, welche durch verschiedene Faktoren begünstigt werden kann, wie z. B. einer Antibiose, einer Granulozytopenie oder einer allgemeinen Schwächung nach chirurgischen Eingriffen [28,39,61]. Bei einer Kolonisation des Gastrointestinaltraktes kann *Candida albicans* in das Gefäßsystem penetrieren, sich über die Blutbahn ausbreiten und dadurch eine Sepsis verursachen oder weitere Organe befallen [10]. Deshalb stellt gerade bei Immunsupprimierten die Zahnpflege und das Beheben kariöser Läsionen eine wichtige Prävention dar, um die Besiedelung der Mundhöhle mit diesem Keim möglichst gering zu halten. Bei Patienten mit einer fortschreitenden Krebserkrankung liegt die Besiedelung der Mundhöhle mit *Candida albicans* bei 66% [12], wobei das Tragen von Zahnprothesen und eine verminderte Speichelflussrate die größten Risikofaktoren darstellen.

In nur 46 % der Fälle wurde *Candida albicans* durch eine spezifische Polymerasekettenreaktion (PCR= polymerase chain reaction) als Erreger nachgewiesen. Hierbei begründet sich die klinische Relevanz durch höhere Resistenzen der non-*Candida albicans*-Stämme [12], was die Notwendigkeit der diagnostischen Durchführung einer PCR Technik zur Identifizierung der Erreger belegt.

Bei einer anderen Studie zeigte die molekulare Typisierung, dass bei den meisten Patienten, die eine Bestrahlung bei Hals- und Kopfkrebserkrankungen erhalten hatten, ähnliche Candida-Stämme auftraten [42].

Für die vorliegende Studie war die mögliche Korrelation der Candidabesiedelung der Mundhöhle und des Magen-Darm-Traktes von Interesse, wobei sich folgende Fragestellungen unter Bezug auf die speziellen Patientengruppen ergaben:

- Besteht eine Stammverwandtschaft zwischen den Candidakeimen der Mundhöhle und des Magen-Darm-Traktes bei herzkranken, herztransplantierten und chemotherapieversorgten Kindern?
- Unterscheidet sich die Candida-Stammverwandtschaft der obigen Patientengruppen von denen anderer stationär versorgter Kinder?
- Wie häufig lässt sich bei Kindern mit schwerwiegenden Allgemeinerkrankungen auf eine deszendierende Candida-Kolonisation schließen?

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Kariesätiologie

Caries dentium, die Zahnfäule, stellt heute die am weitesten verbreitete Zivilisationskrankheit dar. In ihrem Verlauf kommt es zur progredienten Zerstörung der Zahnhartsubstanz. Die verifizierte und erweiterte chemoparasitäre Theorie zur Ätiologie der Karies von Miller (1898) ist heute allgemein akzeptiert [21].

Karies ist ein multifaktorielles Geschehen mit primär mikrobieller Genese. Vier obligatorische Faktoren müssen zusammentreffen, damit sie entsteht. Nach König (1971) stellen diese die individuellen Faktoren, wie vorhandene Zähne, Verfügbarkeit von Substrat, Zeiteinfluss und azidogene Mikroorganismen dar [29]. Daneben gibt es zahlreiche sekundäre Faktoren, die sowohl die Entstehung als auch die Progression einer kariösen Läsion beeinflussen können. Dazu gehören die Speichelzusammensetzung/Speichelfluss, die Pufferkapazität und der pH-Wert des Speichels, Zahnfehlstellungen/Zahnfehlbildungen, sowie Dauer, Art und Häufigkeit der Nahrungsaufnahme [21].

Zu Beginn einer Karies heften sich Mikroorganismen auf die Cuticula dentis, dem erworbenen Zahnoberhäutchen, an und vermehren sich dort. Bei unzureichender Mundhygiene bildet sich bald ein Aggregat aus Bakterien und deren Stoffwechselprodukten, Speichelproteinen/-glykoproteinen und anorganischen Salzen. Diesen zähen Zahnbelag nennt man Plaque, in welchem anfangs fakultativ anaerobe Bakterien wie *Streptococcus mutans* überwiegen. Mit zunehmendem Alter der Plaque kommen dann obligat anaerobe Mikroorganismen wie Aktinomyzeten, Veillonellen und Fusobakterien hinzu. Auch können Pilze im Plaque-Biofilm nachgewiesen werden, da sie ebenfalls die Fähigkeit besitzen, verschiedene Zucker in Säuren zu metabolisieren und sich so an der Kariesprogression zu beteiligen [48]. Wetzell et al. konnten sogar belegen, dass *C. albicans* bei In-vitro-Imitation des menschlichen Mundhöhlenmilieus eine kariöse Destruktion humanen Zahnschmelzes initial ohne bakteriellen Einfluss bewirkt [65].

Das aus Fructose und Glucose bestehende Disaccharid Saccharose, bekannt als Rohr- und Rübenzucker, wirkt stark kariogen. Durch die Verstoffwechslung dieses und anderer Kohlenhydrate zu organischen Säuren wird das Kristallitengefüge des

Zahnschmelzes zerstört. Es vollzieht sich seine Demineralisation, was zu weißen opaken Flecken führt. Erst später mit weitergehender Zerstörung wird auch eine Kavität sichtbar [21].

Karies entwickelt sich in bestimmten Arealen des Gebisses, die die PlaqueRetention begünstigen und als Prädilektionstellen bezeichnet werden. Dazu gehören Fissuren, Approximalflächen unterhalb der Kontaktpunkte und cervikale Anteile der Glattflächen. Etwa 90% aller kariösen Läsionen bei Kindern finden sich in Fissuren und Grübchen, gefolgt von der Approximalkaries. Glattflächenkaries tritt meist erst bei erhöhtem Kariesrisiko auf und die Prävalenz der Wurzelkaries nimmt erst mit steigendem Lebensalter zu [48]. Eine besondere Situation stellen derzeit die frühen kariösen Gebisszerstörungen des Nursing-Bottle-Syndroms dar, bei denen es bereits im Kleinkindalter zu bevorzugten kariösen Erkrankung der Milchschnitzzähne im Oberkiefer und später auch weiterer Milchzähne kommt. Diese, auf exzessiv nuckelnde Flüssigkeitsaufnahme gezuckerter und/oder säurehaltiger Getränke zurückzuführende, Destruktion wird nach neuerer internationaler Nomenklatur der Early-childhood-Caries Typ II zugeordnet [70].

Für die Kariesätiologie am bedeutsamsten ist die Gruppe der Mutans-Streptokokken, besonders *Streptokokkus mutans* und *Streptokokkus sobrinus*. Als weitere Leitkeime gelten auch Laktobazillen. Mutans-Streptokokken sind in der Lage, extrazellulär unlösliche Polysaccharide (EPS) zu bilden, was zu einer erhöhten Adhärenz an der Zahnhartsubstanz führt. Auch besitzt *Streptokokkus mutans* die Fähigkeit, Polysaccharide intrazellulär in Glykogen-Form (IPS) zu speichern, wodurch er längere Phasen der Nahrungskarenz überstehen kann. *Laktobacillus spp.* sind bevorzugt in fortgeschrittenen kariösen Läsionen auf Grund ihrer Säuretoleranz zu finden. Interdental kommen sie aber meist nur in Gegenwart von *Streptokokkus mutans* vor. Desweiteren zählen *Actinomyces spp.*, andere azidogene Bakterien und Non-mutans-Streptokokken zu den kariogenen Mikroorganismen. *C. albicans* kommt bei 25-50% der Bevölkerung in der Mundhöhle vor und zählt auf Grund seiner Fähigkeit, Zucker zu metabolisieren, ebenfalls zu den kariogenen Mikroorganismen [48].

## 2.2 Candida

Die Gattung *Candida*, zugehörig der Familie der *Candidaceae*, summiert fakultativ pathogene Erreger. Diese Pilze siedeln sich auf Haut und Schleimhäuten des Menschen an und stellen dort einen Teil der physiologischen mikrobiellen Flora. Die Frequenz der *Candida*-Besiedelung der Mundhöhle steht in Abhängigkeit vom Alter, die höchste Besiedelung findet sich circa zwei Monate nach der Geburt und im höheren Erwachsenenalter [27]. Nach einer Langzeitstudie von Russel und Lay steigt die *Candida*-Besiedelung innerhalb der ersten sieben Tage nach der Geburt von 5,7% auf 14,2% und dann weiter auf bis zu 50% während des ersten Lebensjahres [45]. Zu einer oralen *Candidiasis* kommt es meist durch prädisponierende Faktoren, die metabolischer, diätischer, mechanischer, immunologischer oder iatrogener Natur sein können [31].

*Candida albicans* besiedelt überwiegend die Schleimhäute, ist aber generell in der Lage, auch jedes andere menschliche Gewebe anzugreifen. Die Mundschleimhaut ist der häufigste Standort, wo dieser Keim entweder als harmloser Saprophyt oder als Auslöser eines Mundsoors auftritt [9]. Extreme klinische Manifestationen des Nursing-bottle-Syndrom, bei dem es zu einer bevorzugten kariösen Zerstörung der Milchschneidezähne im Oberkiefer durch exzessive Trinkzufuhr von zucker- oder säurehaltigen Getränken aus Saugerflaschen kommt, führen gehäuft zur Ausbildung eines Mundsoors mit Lokalisation an Wangenschleimhaut und Zunge [66]. Weiterführend belegten Wetzell et al. den Zusammenhang, dass es bei kariöser Milchzahnzerstörung der „Zuckertee-Karies“ auch zu periapikalen Erkrankungen an den betroffenen Zähnen und zu allgemeinen körperlichen Beeinträchtigungen bei den Kleinkindern kommen kann [69]. Innerhalb der Mundhöhle ist die Häufigkeit der Konzentrationen von *Candida* unterschiedlich. Bei gesund bezahnten Patienten lassen sich die Hefen bevorzugt vom Zungenrücken isolieren; Wange, Mundboden und Mundwinkel sind dagegen seltener besiedelt [2]. Bei Heranwachsenden in der Adoleszenzphase liegt die durchschnittliche Häufigkeit der *Candida*-Besiedelung bei 58,5%, wobei sich dann *C. albicans* zu 73,8%, *C. tropicalis*, *C. krusei* und *C. kefyr* zu 7,14% und *C. parasilosis* zu 4,76% nachweisen lassen [3]. Zurzeit sind 13 fakultativ humanpathogene *Candida*-Spezies bekannt, wobei *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parasilosis* und *C. dubliniensis*, die höchste medizinische

Bedeutung zukommt. Die einzelnen Spezies unterscheiden sich in ihrer Pathogenität, wobei *C. albicans* und *C. tropicalis* die höchste Virulenz zugeordnet wird. Desweiteren wurde ein enger Zusammenhang zwischen der Adhäsion und der Fähigkeit, eine Infektion auszulösen, herausgefunden. Auch in dieser Hinsicht wies *C. albicans* die größte Adhärenz auf [7,64].

Vorausgegangene Untersuchungen unserer Giessener Arbeitsgruppe belegen schließlich, dass *C. albicans* am häufigsten in kariös erweichter Zahnschmelz/Kariesläsionen vorkommt, weshalb die kariöse Kavität als ein bevorzugtes Biotop dieses Keimes anzusehen ist, aus dem es zu einer kontinuierlichen Weitergabe in den Magen-Darm-Trakt kommen kann [51,67,68].

### 2.3 Candidiasis

Für das Auftreten einer Candidiasis sind nach Samaranayake immer mehrere Virulenzfaktoren verantwortlich, wie zum Beispiel: Persorption, Dimorphismus, Bildung von Keimschläuchen, Wechselwirkung mit dem Komplementsystem und die Produktion von Hydrolasen, Anaphylatoxinen und Killertoxinen [46]. Die Mundhöhle ist mit einer Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt. Alle dort natürlich vorkommenden Keime werden als physiologische Standortflora bezeichnet. Die Bakterien bilden das natürliche Gegengewicht zu einigen Hefen. Auf verschiedenste Art, wie zum Beispiel durch mangelnde Mundhygiene, ungünstige Ernährung, Infektionen im Mundbereich oder ein geschwächtes Immunsystem kann dieses Gleichgewicht gestört werden, sodass sich eine orale Candidiasis oder Candidose manifestiert.

Die orale Candidiasis lässt sich nach Axell et al. klassifizieren [4]. Unterschieden wird zwischen einer primären Form, die auf orale und periorale Bereiche beschränkt ist, und einer sekundären Form, die als Folge einer systemischen mukokutanen Erkrankung auftritt. (Tab. 1).

Tabelle 1: Klassifikation der oralen Candidiasis

<b>Primäre orale Candidiasis</b>	<b>Sekundäre orale Candidiasis</b>
<b>Akute Form</b> - pseudomembranös - erythematös	<b>Orale Manifestationen der systemischen mucocutanösen Candidiasis</b>
<b>Chronische Form</b> - pseudomembranös - erythematös - hyperplastisch knotig plaqueartig	
<b>Candida-assoziierte Läsion</b> - Prothesenstomatitis - Cheilitis angularis - mediane rhomboide Glossitis	
<b>Keratinisierte Läsionen mit Candida superinfiziert</b> - Leukoplakie - Lichen planus - Lupus erythomatosus	

Das klinische Erscheinungsbild des Mundsoors (akute pseudomembranöse Candidose) ist gekennzeichnet durch weiße Beläge auf einer erodierten Oberfläche, die sich durch einen Abstrich entfernen lassen. Lokalisiert ist der Mundsoor meist auf dem harten und weichen Gaumen, auf der Zunge und auf der Wangenschleimhaut (Abb. 1).



Abb. 1: Mundsoor auf dem Zungenrücken (4-jähriges Kind)

Vor allem bei älteren Menschen, Kindern oder bei Patienten mit einem geschwächten Immunsystem ist die orale Candidose eine der häufigsten opportunistischen Infektionen. Gerade bei Kindern mit Krebserkrankungen unter Cytostatika-Therapie kann die orale Candidiasis ein erhöhtes Problem darstellen. So erkrankten 69,35% von ihnen an einer oralen Candidiasis, die am häufigsten von *C. albicans* verursacht wurde [19]. Nicht-albicans Arten sind mit 0-33% seltener anzutreffen. Zu ihnen zählen *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* [30].

Candidazellen können infolge Penetration von Epithelzellen, durch chirurgische Eingriffe oder Polytraumata, bei denen natürliche Körperbarrieren aufgehoben werden, oder über einen Biofilm auf Kunststoffmaterialien (z.B. Kathetern), in die Blutbahn gelangen. Von hier aus kann es dann zu einer Fungämie mit oder ohne Organbeteiligung kommen [33]. Die Sterblichkeit bei einer Candidämie liegt bei 26,7%, wobei *C. albicans* mit 53,6% die höchste Sterblichkeit bei den pädiatrisch onkologischen Kindern hervorruft [8].

## 2.4 Bedeutung einer Candidiasis unter Immunsuppression

Patienten erhalten nach einer Organtransplantation lebenslang Immunsuppressiva, um eine körpereigene Abstoßungsreaktion des transplantierten Organs zu verhindern. Durch eine solche Behandlung wird die Kompetenz des Organismus zur Abwehr pathogener Organismen deutlich herabgesetzt. In der Mundhöhle kann es dann zur Ausbreitung pathogener Keime kommen, die im Körper schwere Komplikationen hervorrufen [11]. Ähnlich stellt sich die Situation bei tumor erkrankten Patienten der Hämatologie unter der aggressiven Therapie dar, bei denen mit zunehmender Neutropeniedauer das Risiko einer invasiven Mykose steigt [40].

Eine systemische Candidose erhöht die Morbidität und Mortalität nach Herztransplantationen, deshalb sollte besonderer Wert auf entsprechende Prophylaxe und Therapie gelegt werden [60]. In den letzten 20 Jahren hat das Risiko einer systemischen Candidose ständig zugenommen [5,6], auch wird die Behandlung der Patienten auf Grund steigender Keimresistenzen immer schwieriger [17].

Der Hauptgrund für eine erhöhte Morbidität stellt nicht die oropharyngeale Candidiasis dar. In ihrer Folge kann es aber durch deszendierende Keimabgabe in den Gastrointestinaltrakt zu einer lebensbedrohlichen Infektion kommen. Meist handelt es sich bei systemischen Mykosen um eine endogene Infektion aus dem Intestinaltrakt des Patienten, wie eine Studie von MAROL et al. belegt [32]. Stellt sich nämlich eine starke Vermehrung humanpathogener Hefen im Darm ein, so besitzen diese Erreger die Fähigkeit, über Persorption in die Blutbahn oder zu anderen Organen zu gelangen. Einen signifikanten Zusammenhang zwischen systemischen und einer vorausgegangenen oropharyngealen Candidiasis konnten DeGREGORIO et al. bei Patienten mit akuter Leukämie bereits 1982 belegen [15]. Auch in diesem Zusammenhang stellt sich bei immunsupprimierten Patienten die Prävention oraler Candida-Infektionen als außerordentlich wichtig dar.

## 2.5 Molekularbiologische Nachweismethode

Die Polymerasekettenreaktion (PCR= polymerase chain reaktion), für deren Entdeckung Mullis 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt, ist heute eine der wichtigsten Techniken zur Analyse von Genen. Ein Gen bezeichnet die genetische Information, die in ein einzelnes DNA-Molekül und am Ende in ein einziges Protein überschrieben wird. Lokalisiert sind die Gene auf Chromosomen. Der Bereich, auf dem sich ein bestimmtes Gen befindetet, nennt man "Locus".

In den meisten Organismen liegt das genetische Material primär als DNA-Doppelstrang in der sogenannten B-Form als rechtsgängige Doppelhelix oder als RNA-Einzelstrang vor. Aufgrund der Zuckerkomponente ihrer Nucleotide werden die beiden Nucleinsäuren DNA und RNA benannt. Ein Nucleotid besteht aus drei Elementen: einem Zucker, einer Phosphatgruppe und einer stickstoffhaltigen Base. Die stickstoffhaltigen Basen sind entweder Purine wie Adenin und Guanin oder Pyrimidine wie Cytosin, Thymin oder Uracil (RNA). In der DNA bilden sich Basenpaare: Adenin paart sich mit Thymin, Guanin mit Cytosin. Dies wird durch die Bindungsverhältnisse der Atome innerhalb der Basen selbst vorgegeben. Durch Wasserstoffbrücken werden die Basen zusammengehalten. Die Nucleotide sind über die 5'-3' Phosphodiesterbindung miteinander verknüpft und geben dem Polynucleotid eine Orientierung [38].

Die Polymerasekettenreaktion stellt eine Methode zur Vermehrung von DNA-Sequenzen dar. Für die PCR benötigt man eine thermostabile DNA-Polymerase, Ausgangs-DNA (template), zwei passende Oligonucleotidprimer, Puffer und Nucleotide. Ein Primer ist ein Oligonukleotid, welches als Startpunkt für DNA replizierende Enzyme wie die DNA-Polymerase dient. Die PCR-Reaktion besteht aus drei Schritten, wobei der erste die Denaturierung bei 94°C mit Trennung der beiden DNA-Stränge darstellt. Der zweite Schritt ist ein „Annealing“, bei dem die Temperatur gesenkt wird und somit die Primer die Möglichkeit erhalten, an die DNA zu hybridisieren. Im dritten Schritt, der Elongation, wird die Temperatur auf das Arbeitsoptimum der Polymerase erhöht, damit ein Zweitstrang synthetisiert werden kann. Dieser Zyklus wird mehrfach wiederholt und findet meist in einem Thermocycler statt.

Das so erhaltene Amplikon wird dann in einer Agarosegel-Elektrophorese, welche die einfachste und effektivste Methode darstellt, in DNA-Fragmente von 0,5 bis 25 Kilo Basen voneinander getrennt. Dem liegt zugrunde, dass Nucleinsäuren, die bei neutralem pH-Wert polyanionisch sind, im elektrischen Feld zum negativen Pol (Kathode) wandern. Durch Anfärben mit Ethidiumbromid lassen sich die Banden danach sichtbar machen. Die Auswertung erfolgt schließlich visuell und/oder mit Hilfe einer Auswertungssoftware am Computer [36].

### **3 Material und Methode**

#### **3.1 Bezugsstudie/Studienvorbereitung**

Die vorliegende Studie basiert auf einem klinischen Untersuchungsprojekt, das im Zeitraum von 2004 bis 2007 von ärztlichen/zahnärztlichen Behandlern der Poliklinik für Kinderzahnheilkunde in Kooperation mit den Abteilungen für Kinderkardiologie und pädiatrischer Onkologie sowie mit dem Institut für medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen, durchgeführt worden ist.

Arbeitsthema war die "Orointestinale und humorale Candidabesiedelung bei immunsupprimierten, endocarditisprophylaxepflichtigen und chemotherapiebehandelten Kindern". Die detaillierte methodische Erläuterung findet sich bei Siah-Benlarbi [53].

Die anonyme individuelle Kennzeichnung der Patienten erfolgte mittels laufender Registriernummer, wobei zur Dokumentation für die erhobenen Daten ein Befund-/Anamnesebogen erstellt wurde (Anhang 1). So ließ sich später die Zuordnung der Befundbögen zu den Patienten und damit auch die Einhaltung der gesetzlichen Bestimmungen des persönlichen Datenschutzes erfüllen. Für die Untersuchungen lag das Einverständnis der Eltern und die Zustimmung der Ethik-Kommission (datiert vom 02.09.2004) am Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (Aktenzeichen: 130/04) vor (Anhang 2 und 3).

Die Alters- und Geschlechtsverteilung, sowie die Gruppenzuordnung der insgesamt 103 Kinder zwischen 2 und 16 Jahren wird aus Tabelle 2 ersichtlich.

Tabelle 2: Alters- und Geschlechtsverteilung in der Bezugsstudie

Gruppe	Patienten	Mädchen		Jungen		Durchschnittsalter in Monaten
	abs.	n	%	n	%	
I Vergleichsgruppe	23	12	52,2	11	47,8	111,3
II herzkranke Kinder – CHD*	24	12	50	12	50	91
III HTx** - Kinder	31	10	32,2	21	67,7	65,7
IV Tumor-Kinder	25	10	40	15	60	117,2
<b>Gesamt</b>	<b>103</b>	<b>44</b>	<b>42,7</b>	<b>59</b>	<b>57,3</b>	<b>103,8</b>

\* CHD = congenital heart disease

\*\* HTx = heart transplantation

Die Kinder der Gruppe I stellten die Vergleichsgruppe dar. Es handelte sich um stationäre Patienten der Kinderklinik, die weder immunsupprimiert, endokarditisprophylaxepflichtig noch chemotherapiebehandelt sein durften. Herzkranken Kinder ohne HTx bildeten die Gruppe II, herztransplantierte (HTx) Jungen und Mädchen die Gruppe III und chemotherapiebehandelte Kinder mit Tumorerkrankungen die Gruppe IV.

Alle Kinder unterzogen sich zwecks Gebissbefunderhebung einer zahnärztlichen Untersuchung, die mit Hilfe von Mundspiegel, Sonde und Stirnleuchte vorgenommen wurde. Zusätzlich wurden folgende Abstriche/Substanzen entnommen und untersucht:

- Speichel mittels Einmalspritze
- Plaque und (falls vorhanden) kariös erweichte Zahnschmelze mittels Löffelexcavator
- Stuhl (Stuhlröhrchen)
- Blut (kinderärztliche Entnahme).

Wurde Candida spezies in den unterschiedlichen Materialien nachgewiesen, erfolgte eine Einteilung in Keimzahlklassen.

Für die vorliegende Untersuchung wurden später die auf Candida spezies abzielenden Ergebnisse der Bezugsstudie zugrunde gelegt. Vergleiche Siahi-Benlarbi [53] und Siahi-Benlarbi et al. [54].

## 3.2 Experimentelle Untersuchungen

Für die gentechnologische Untersuchung wurden die positiven Pilzkulturen der Bezugsstudie zunächst in einer Brain-Heart-Infusion bei  $-17^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Um die DNA-Extraktion und die sich anschließende PCR durchführen zu können, wurden die tiefgefrorenen positiven Pilzkulturen später wieder aufgetaut, auf Sabouraud-Glucose-Agar ausgestrichen und 48 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Die weitere Untersuchung der Pilzkulturen fand dann im Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen, statt.

### 3.2.1 Isolierung chromosomaler DNA

Für die Isolierung von Nucleinsäuren standen verschiedene Methoden zur Auswahl. Welche Methode verwandt wurde, richtete sich nach der Art und der zu isolierenden DNA und dem späteren Verwendungszweck.

Bei den klassischen Verfahren wird das Material rein mechanisch oder chemisch aufgebrochen. Das Prinzip basiert auf der Trennung in eine organisch proteinhaltige und eine wässrig nucleinsäurehaltige Phase. Die Verfahren beinhalten jedoch Nachteile: sie sind sehr aufwändig, die Reproduzierbarkeit ist bei niedriger Nucleinsäure-Konzentration herabgesetzt und die DNA zeigt nur mittelmäßige Qualität. Hochwertige DNA erhält man dagegen durch die Zentrifugation des Nucleinsäure-Rohextraktes im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten.

Neben den klassischen Verfahren finden noch drei weitere Anwendung: 1. die Anionenaustauscher-Chromatographie, 2. das Filtrationsverfahren und 3. das auf Silikagelbasierende Verfahren.

Bei der Anionenaustauscher-Chromatographie kommt es zur Bindung negativ geladener Phosphatgruppen der Nucleinsäuren an positiv geladene Oberflächenmoleküle des Trägermaterials. Vorteile dieses Verfahrens sind die extrem hohe Reinheit der enthaltenen DNA und die große Zeitersparnis im Vergleich zu den klassischen Verfahren.

Bei dem Filtrations-Verfahren erhält man eine qualitativ eher minderwertigere DNA, somit wird das auf Filtration von Lysaten basierende Verfahren nur in der Minipräparation von Plasmid-DNA im Hochdurchsatz angewandt.

Silikagelbasierende Verfahren beruhen auf der Bindung von Nucleinsäuren an Silikaoberflächen bei Vorhandensein hoher Konzentrationen von chaotropen Salzen. Sie sind in Ihrer Anwendung einfach, schnell und zuverlässig. Die DNA weist eine hohe Reinheit auf und kann für viele Anwendungen eingesetzt werden, wie zum Beispiel für die PCR, Southern-Blotting und DNA-Sequenzierung. Das kommerziell erhältliche Kit (Firma Qiagen, Hilden/Deutschland) arbeitet mit einer Silikagelmatrix, die im Vergleich zu anderen Silikamaterialien eine reproduzierbare, einfache und sichere Nucleinsäure-Präparation zulässt [50].

### **3.2.2 Isolierung der Pilz-DNA**

Auf Grund der oben genannten Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden zur Isolierung von DNA, erfolgte in dieser Studie die Isolation der Pilz-DNA mit Hilfe des Qiagen Mini Kits (Qiagen, Hilden/Deutschland) entsprechend der QIAamp-Extraktion. Die Ausgangsmaterialien mussten vor Beginn der gentechnologischen Analyse lysiert werden, da die Nucleinsäuren in Form von DNA erforderlich waren. Die Präparation erfolgte in vier Schritten. Als erstes wurden die Proben lysiert, dann banden die Nucleinsäuren an die Silikamembran; ein Waschschrift hielt im Folgenden die Verunreinigungen gering und am Ende wurde die reine Nucleinsäure eluiert [37].

Im Einzelnen:

Nachdem alle Testbestandteile auf Raumtemperatur gebracht worden waren, wurde eine Pilzkolonie in 180 µl Lyse-Puffer (ATL-Puffer) suspendiert. Zu dem Ansatz kamen 20 µl Proteinase K hinzu, es wurde gut gemischt und bei 56°C im Wasserbad für 15 Minuten inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit kamen 200 µl AL-Puffer hinzu, es wurde wieder gut gemischt und für 10 Minuten bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Nun wurden 200 µl Ethanol dazugeben und gut gemischt. Die Lösung wurde in ein Säulchen gegeben und dieses in ein Collection-Tube gestellt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 8000 U/min für eine Minute. Das Collection-Tube wurde ausgeklopft und 500 µl AW1 Puffer in das Säulchen gegeben. Es schloß sich eine

erneute Zentrifugation bei 8000 U/min für eine Minute an. Wiederum wurde das Collection-Tube ausgeklopft. Nun wurden 500 µl AW2 Salz in das Sälchen gebracht. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 14000 U/min für drei Minuten an. Danach wurde das Sälchen in ein neues Collection-Tube gestellt, 100 µl Puffer AE hinzugefügt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für eine Minute bei 8000 U/min abzentrifugiert. Der auf diese Weise erhaltene DNA-Extrakt wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und bei -20°C eingefroren.

### 3.2.3 RAPD-PCR

Die Proben wurden durch eine auf einer Nukleinsäure basierenden Analyse chromosomal genetischer Elemente epidemiologisch analysiert. Gewählt wurde als PCR-Typisierungssystem, die „Randomly Amplified Polymorphic DNA“, „Ready-to-go“ RAPD Analysis Beads Set (Amersham Pharmacia Biotech/Freiburg, Deutschland). Bei der RAPD-PCR binden die relativ kurzen Oligonucleotide (10 Basen) zufällig an polymorphe DNA und werden dann amplifiziert. Das Prinzip dieser Methode basiert auf einer geringstringenten Annealing Temperatur (37-42°C) in den ersten PCR-Zyklen. Während der weiteren Zyklen wird die Temperatur dann auf über 50°C erhöht, so dass die in den ersten Zyklen synthetisierten Fragmente vervielfältigt werden [50].

Die gelelektrophoretische Auftrennung zeigt ein spezies- und individuumspezifisches Bandenmuster und eignet sich somit gut zur Darstellung von Stammverwandtschaften und Unterschieden im Genom.

Die Kontamination wird durch die RAPD-Kügelchen, die alle Inhaltsstoffe bis auf die Primer enthalten, und die dadurch reduzierten Pipettierschritte möglichst gering gehalten. Somit lässt sich auch eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erzielen.

**Die folgenden Reagenzien wurden verwendet:**

Zur Lagerung der positiven Pilzkulturen:

- BHI- Medium:  
20% Glycerin in Brain-Heart-Infusion (Becton Dickinson, Sparks/USA)

Enthalten im Quiagen-Mini-Kit (Quiagen, Hilden/Deutschland):

- AW1: chaotropes Salz
- AW2: chaotropes Salz
- AL-Puffer: Tris-EDTA (TE)-Puffer
- Proteinase K/ATL-Puffer: zur Zellyse bzw. Deproteinisierung

Für die Gelelektrophorese:

- EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure
- Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  
TE Puffer = Tris-EDTA Puffer:  
10mM Tris HCL pH: 7,4  
1mM EDTA pH: 8,0
- 10 x Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer:  
108g Tris-Puffer  
55g Borsäure  
20ml 0,5M EDTA
- 2%iges Agarosegel:  
2g Agarose, 100ml 1 x TBE-Puffer
- Ficoll = Handelsname für synthetisch hergestelltes Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin  
1,25g Ficoll wurde in 7,5 ml Aqua dest. über Nacht im Kühlschrank gelöst. Am nächsten Tag wurde eine winzige Spatelspitze Bromphenolblau hinzugefügt.
- Gebrauchs Sybr Gold (Cyanin Farbstoff) Lösung:  
Sybr Gold 1:100 mit DMSO (Dimethylsulfoxid) verdünnen
- Auftragspuffer:  
50 µl Gebrauchs Sybr Gold Lösung + 950 µl Ficoll
- Marker:  
Molecular Weight Marker IX (Boehringer, Ingelheim/Deutschland), lagern bei -20°C, Inhalt 200 µl. Vor Gebrauch mit 400 µl Ficoll auffüllen.

### 3.2.4 Auswahl der Primer

Zunächst wurde die Anlagerung der Primer des RAPD-Sets (Firma Amersham Biosciences, Freiburg/Deutschland) getestet. Geliefert wurden die Primer als Lyophilisat in einer Konzentration von 2,5 nmol/tube. Durch das Lösen mit 500 µl sterilem Aqua dest. wurden sie auf eine Endkonzentration von 5pmol/µl gebracht. Für die RAPD Reaktion wurde eine Konzentration von 25pmol eingesetzt. Die gelösten Primer wurden bei -20°C aufbewahrt.

Die Primer bestanden aus 10 beliebigen Nukleotiden mit folgenden Sequenzen:

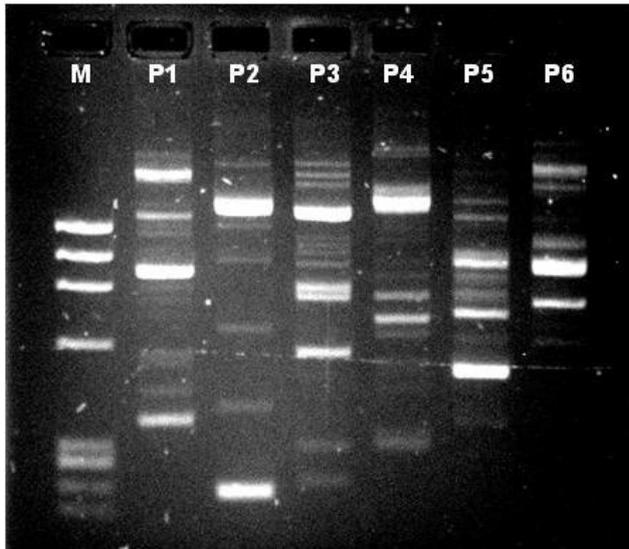
- Primer 1  
5'-d[GGTGC GGAA]-3'
- Primer 2  
5'-d[GTTTCGCTCC]-3'
- Primer 3  
5'-d[GTAGACCCGT]-3'
- Primer 4  
5'-d[AAGAGCCCGT]-3'
- Primer 5  
5'-d[AACGCGCAAC]-3'
- Primer 6  
5'-d[CCCGTCAGCA]-3'

Die Auswahl der Primer erfolgte nach folgenden Kriterien: es wurden die Primer gewählt, die die meisten Banden zeigten und die eine deutliche Abgrenzung der Banden zueinander aufwiesen. Zu jedem Isolat lieferten alle 6 Primer Banden, Primer 1 und Primer 5 wurden nach den oben genannten Kriterien für diese Studie ausgewählt und eingesetzt.

Um eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, erfolgte jede Typisierung zweimal, je einmal mit Primer 1 und Primer 5. Da Primer 1 jedoch die höchste Aussagekraft bot, wurde er für die nachfolgenden Auswertungen im Dendrogramm herangezogen.

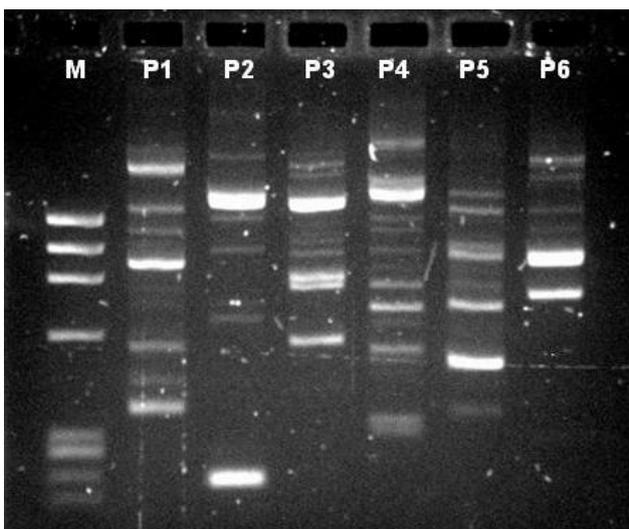
Beispiele zur Primertesting

Für die medizinisch relevanten Keime *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* und *C. krusei* wurden die folgenden Primerausstestungen vorgenommen. Sie ergaben wie bei *C. albicans* alle das gleiche Ergebnis (Abb. 2-5), so dass danach alle Patientenproben mit Primer 1 und 5 ausgetestet wurden.



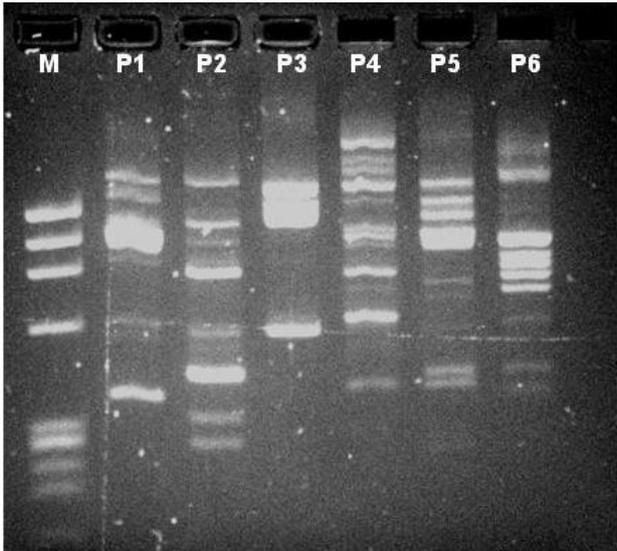
M= Marker, P1-P6= Primer 1-6

**Abb. 2:** RAPD-Bandendarstellung für *C. albicans*



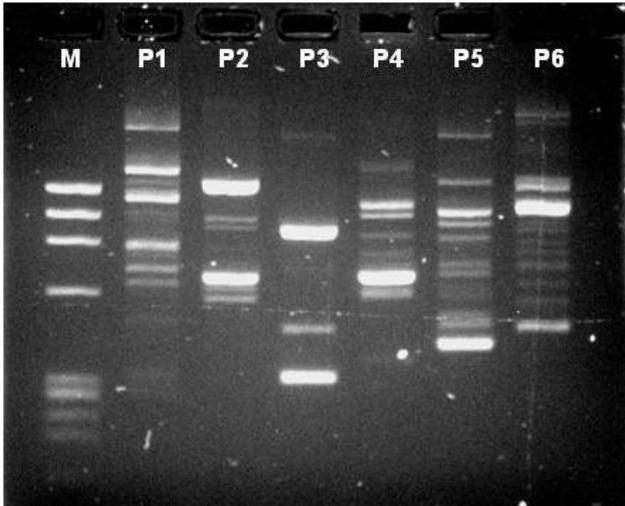
M= Marker, P1-P6= Primer 1-6

**Abb. 3:** RAPD-Bandendarstellung für *C. dubliniensis*



M= Marker, P1-P6= Primer 1-6

Abb. 4: RAPD-Bandendarstellung für C. glabrata



M=Marker, P1-P6= Primer 1-6

Abb. 5: RAPD-Bandendarstellung für C. krusei

### 3.2.5 DNA-Typisierung

Die DNA-Typisierung erfolgte mit dem Ready-To-Go™ RAPD Analysis Kit (Firma Amersham Biosciences, Freiburg/Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers. Zu den „RAPD Analysis Beads“ wurden 17,5 µl Aqua dest., 2,5 µl von Primer 1 oder 5 (25 pmol) und 5 µl des DNA-Extraktes (50 ng) zugegeben. Dieses Gesamtvolumen von 25 µl wurde gut gemischt und mit 50 µl Parafinöl überschichtet. Die Amplifikation erfolgte in einer PCR-Maschine, PCR-Express Gradient/Hybrid (Ashford Middlesex/UK) unter Einhaltung der folgenden Zyklen:

- Einmalig 5 Minuten bei 95°C
- 45 Zyklen: 1 Minute bei 95 °C  
1 Minute bei 36°C  
2 Minuten bei 72°C
- einmalig 5 Minuten bei 72°C
- Halten der Temperatur von 4°C

6 µl der Amplifikate wurden mit 6 µl Auftragspuffer und mit 10 µl Aqua dest. vermischt. 20 µl dieses Ansatzes wurden bei Raumtemperatur auf ein 2%iges Agarosegel in 1xTBE-Puffer aufgebracht und bei 150 Volt für 40 Minuten in einer Elektrophoresekammer aufgetrennt (Abb. 6).

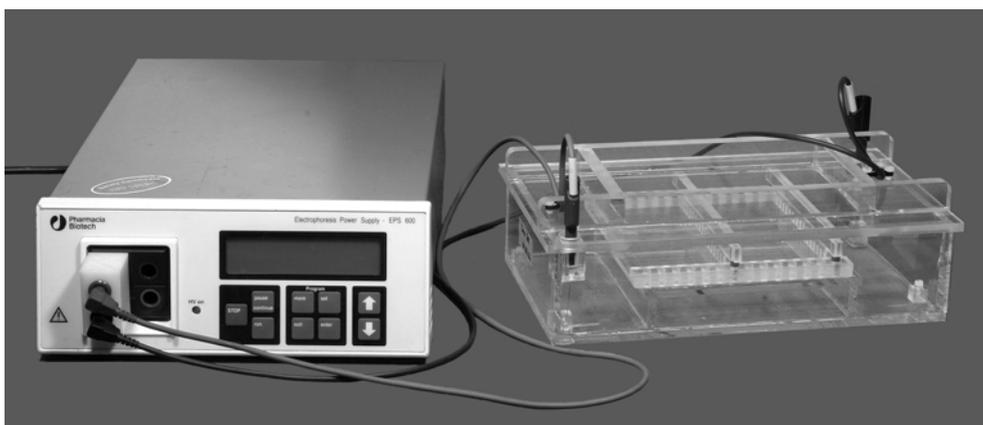


Abb.6: Aufbau der Elektrophoresekammer

Der DNA-Fluoreszenzfarbstoff wurde mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Es wurden Photos (Image Master VDS) auf VDS-Thermal-Film, Fixable Reflection Type (Amersham Pharmacia Biotech, Wien/Österreich), und auch digitale Photos (LISCAP Version 1.0, Pharmacia Biotech, Cambridge/England) erstellt, die im TIFF Format gespeichert wurden.

Die genetischen Bandenmuster wurden zunächst visuell beurteilt und mit dem Programm Gel Compare 4.0 (Applied Maths, Kortrijk/Belgien) an Hand einer Clusteranalyse, welche ein strukturendeckendes, multivariantes Analyseverfahren zur Ermittlung von Gruppen darstellt, ausgewertet. Die Banden wurden dazu am Marker nivelliert, um die Differenzen der unterschiedlichen Gelläufe zu kompensieren. Danach erfolgte eine Einzeichnung der einzelnen Banden der unterschiedlichen Materialien. Mit Hilfe des Assoziationskoeffizienten „Dice“ konnte die Ähnlichkeit berechnet werden. Die statistische Auswertung der Clusteranalyse erfolgte nach dem UPGMA (= unweighted pair group method analysis), wobei eine genetische Identität bei 100%, die Zugehörigkeit zu einem Cluster bei  $\geq 85\%$  und eine genetische Homologie bei  $\geq 70\%$  gegeben ist.

Die genetischen Verwandtschaftsverhältnisse wurden graphisch mit einem Dendrogramm dargestellt.

### **3.3 Statistik**

Die Erfassung der Daten sowie die Erstellung der Grafiken erfolgte mit Microsoft Excel 2003. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS® für Windows, Version 15.0 in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Informatik an der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Die kategorialen Merkmale wurden mit Hilfe von absoluten und relativen Häufigkeiten dargestellt, die quantitativen (ordinalskalierten) Daten unter Zuhilfenahme von Median, Mittelwert, Minimum und Maximum beschrieben.

Die vier betrachteten Gruppen wurden bezüglich kategorialer Merkmale wie Geschlecht, Altersgruppen und Candida spezie unter Anwendung des Chi-Quadrat-Tests für Kreuztabellen verglichen. Unterschiede hinsichtlich quantitativer Merkmale

wie Häufigkeit und/oder Stärke der Keimbesiedlung konnten mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests beurteilt werden.

Die Datenanalyse hat explorativen Charakter. Kriterium für die Beibehaltung bzw. Ablehnung der jeweils getesteten Nullhypothese ist die berechnete Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art „p“, die im Ergebnisteil jeweils angegeben wird. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde nach folgender Einteilung bewertet:  $p > 0,05$  = nicht signifikant;  $p \leq 0,05$  = signifikant [16].

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ausgangsbefunde (Bezugsstudie)

Tabelle 3 gibt Auskunft über die Häufigkeit der bei den Patienten und in den Proben gefundenen Candida spezies. Wobei anzumerken ist, dass pro Patient maximal vier Proben (Speichel, Plaque, kariöse Substanz und Stuhl) bewertet wurden. Lagen im Einzelfall keine kariösen Zähne vor, so konnte dementsprechend auch keine kariöse Zahnschmelzsubstanz entnommen und beurteilt werden. Detaillierte Ergebnisdarstellungen der Gruppen I, II und III finden sich bei Siah-Benlarbi [53]. Die Resultate der Gruppe IV wurden bisher noch nicht publiziert.

Der patientenbezogene Vergleich lässt positive Candidabefunde zwischen 32,3% (HTx - Kinder) und 47,8% (Vergleichsgruppe) erkennen. Dagegen macht der Anteil der positiven Proben nur zwischen 15,3% (Tu-Kinder) und 34,2% (Vergleichsgruppe) aus.

Tabelle 3: Häufigkeit der Candidabesiedelung

Gruppe	Patienten	Candida				Proben	Candida			
		ja		nein			ja		nein	
	abs.	n	%	n	%	abs.	n	%	n	%
<b>I</b> (Vergleichsgruppe)	23	11	47,8	12	52,2	73	25	34,2	48	65,8
<b>II</b> (Herzranke Kinder)	24	11	45,8	13	54,2	83	23	27,7	60	72,3
<b>III</b> (HTx Kinder)	31	10	32,3	21	67,7	95	21	22,1	74	77,9
<b>IV</b> (Tu-Kinder)	25	9	36,0	16	64,0	85	13	15,3	72	84,7
<b>Gesamt</b>	103	41	39,8	62	60,2	336	82	24,4	254	75,6

#### 4.1.1 Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Candida spezies

Tabelle 4: Häufigkeit des Auftretens von verschiedenen Candida spezies

Candida spezies	Patienten (n)	%
<i>C. albicans</i> in Reinkultur	30	73,3
<i>C. glabrata</i> in Reinkultur	1	2,4
<i>C. dubliniensis</i> in Reinkultur	6	14,7
<i>C. krusei</i> in Reinkultur	0	0
<i>C. lusitaniae</i> in Reinkultur	1	2,4
<i>C. parapsilosis</i> in Reinkultur	0	0
<i>C. albicans</i> zusätzlich mit <i>C. dubliniensis</i>	1	2,4
<i>C. albicans</i> zusätzlich mit <i>C. krusei</i>	1	2,4
<i>C. albicans</i> zusätzlich mit <i>C. parapsilosis</i>	1	2,4
Insgesamt	41	100,0

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, handelt es sich bei den 41 Patienten mit Candida spezies 30ig mal um *C. albicans* in Reinkultur, 6 mal um *C. dubliniensis* in Reinkultur und je einmal um *C. lusitaniae* und *C. glabrata* in Reinkultur. Dabei ist anzumerken, dass in drei Fällen von *C. albicans*, je einmal in Kombination mit *C. dubliniensis*, *C. krusei*, und *C. parapsilosis* auftrat.

## 4.2 Befunde der vorliegenden Studie

### 4.2.1 Gruppenzuordnung der positiven Proben mit *C. albicans*

Tabelle 5: Verteilung der *C. albicans* Isolate

Gruppe	Patienten anzahl	Proben				
		absolut	Speichel	Plaque	Kariöse Substanz	Stuhl
<b>I</b> (Vergleichsgruppe)	4	4	1	1	4	10
<b>II</b> (Herzkrankte Kinder)	10	10	3	3	6	22
<b>III</b> (HTx Kinder)	10	10	7	1	2	20
<b>IV</b> (Tu-Kinder)	9	6	2	1	2	11
gesamt	33	30	13	6	14	63

Im Speichel, insgesamt 30 Isolate, wurde *C. albicans* bei allen Gruppen am häufigsten nachgewiesen. Innerhalb der Gruppenverteilung waren die herzkranken Patienten ohne oder mit HTx (Gruppen II und III) signifikant häufiger mit *C. albicans* infiziert als die beiden anderen Gruppen ( $p = 0,017$ ). Aus der Plaque konnten lediglich 13 Isolate gewonnen werden. Hier war die Gruppe III der HTx-Kinder mit ( $p = 0,030$ ) am signifikant häufigsten betroffen. Die Anzahl der positiven Stuhlproben unterschied sich mit  $n = 14$  nur wenig von der Häufigkeit der positiven Plaqueproben. Mit  $p = 0,015$  war hier die Gruppe II der herzkranken Kinder (ohne HTx) am signifikant häufigsten betroffen. Dagegen ließen sich bei der Bewertung der kariösen Substanzen mit  $p = 0,417$  keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen erkennen.

Die grafische Umsetzung der Häufigkeiten, der mit *C.albicans* behafteten Proben erfolgte in Gruppenzuordnung in Abbildung 7.

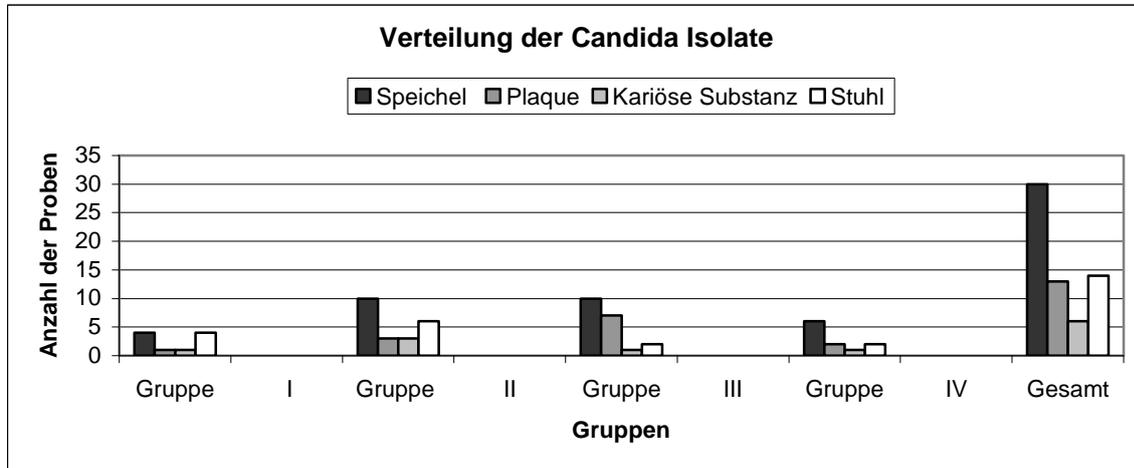


Abb. 7: Verteilung der Candida Isolate

#### 4.2.2 Häufigkeit von *C. albicans* in den verschiedenen Substanzen

Tabelle 6 gibt Aufschluss, in welchen entnommenen Substanzen der Patienten der Pilz nachgewiesen wurde.

Tabelle 6: Häufigkeit von *C. albicans* in den unterschiedlichen Substanzen

Behaftete Substanzen	Patienten (n)	%
Nur A	9	27,3
Nur C	1	3,0
Nur D	2	6,1
A und B	7	21,2
A und C	1	3,0
A und D	7	21,2
A und B und C	1	3,0
A und B und D	2	6,1
A und C und D	2	6,1
A - D	1	3,0
<b>Gesamt</b>	<b>33</b>	<b>100</b>

A= Speichel, B= Plaque, C= kariöse Substanz, D= Stuhl

Insgesamt 12 Patienten (36,4%) wiesen einen gleichzeitigen Befall in der Mundhöhle (Speichel, Plaque oder kariöser Substanz) und im Stuhl auf. Eine ausschließliche Besiedelung des Speichels fand sich dagegen in 9 Fällen (27,2%). Weiterhin war eine isolierte Kontamination in einem Fall in der kariösen Substanz (3%) und in 2 Fällen im Stuhl (6,1%) gegeben. Als häufigste Kombinationen mehrerer mit *C. albicans* behafteter Substanzen erwiesen sich A und B sowie A und D mit jeweils 7 Fällen (21,2%).

#### **4.2.3 RAPD-Typisierung der *C. albicans*-Stämme**

Von den 41 Patienten mit Candida spezies wiesen 33 (80,5%) in insgesamt 63 Isolaten *C. albicans* auf. Die übersichtliche Darstellung in Tabelle 7 gibt die für jeden Patienten gefundenen Informationen zur Probenbesiedelung wieder. Dabei wurde auch die jeweilige Mengenbewertung in fünf Keimzahlklassen mit eingebracht. Auf der Basis dieses Ergebnis-pools erfolgte schließlich die Erstellung des in Abbildung 8 dargelegten Dendrogramms zur Abklärung der genetischen Verwandtschaftsverhältnisse der Candidaisolate. Wobei anzumerken ist, dass ein Isolat (Patient 2/Plaque) zuvor verworfen wurde und nicht mehr zur Verfügung stand. Entsprechend beziehen sich alle nachfolgenden Ergebnisse nur noch auf 62 Proben/Isolate.

Tabelle 7: Mengenmäßige *C. albicans*- Besiedelung der Mundhöhle und des Stuhls

Anzahl	Patient	Gruppe	Proben			
			Candida (Keimzahlklassen)			
	Patient Nr.		Speichel A	Plaque B	kariöse Substanz C	Stuhl D
1	1	II	1	0	0	0
2	2	II	1	1*	0	4
3	3	II	1	0	0	3
4	4	II	1	0	0	2
5	5	II	2	0	0	4
6	6	II	1	1	1	3
7	7	II	2	0	1	0
8	8	III	2	4	0	0
9	10	IV	1	0	0	0
10	11	IV	2	0	0	0
11	12	IV	1	0	0	0
12	13	II	2	0	0	0
13	14	II	1	0	0	0
14	15	IV	0	0	0	4
15	16	IV	0	0	1	0
16	17	IV	1	0	0	0
17	20	II	2	0	0	0
18	21	IV	0	0	0	3
19	22	IV	1	2	0	0
20	23	IV	3	2	0	0
21	24	III	2	2	0	0
22	25	I	2	0	2	1
23	28	I	1	0	0	3
24	29	II	2	3	2	3
25	30	III	2	2	0	2
26	31	III	1	0	0	0
27	32	III	1	0	0	2
28	33	III	2	1	0	0
29	34	III	1	3	0	0
30	35	III	1	4	3	0
31	36	III	1	3	0	0
32	42	I	1	3	0	4
33	44	I	2	0	0	1

Gruppe I: Kinder ohne Immunsuppression und Endocarditisprophylaxepflicht  
(Vergleichsgruppe)

Gruppe II: herzkrankte Kinder ohne HTx \*Probe nicht weiter verwendet

Gruppe III: herztransplantierte Kinder (HTx)

Gruppe IV: Kinder mit Tumorerkrankungen

Keimzahlklassen:

0: keine

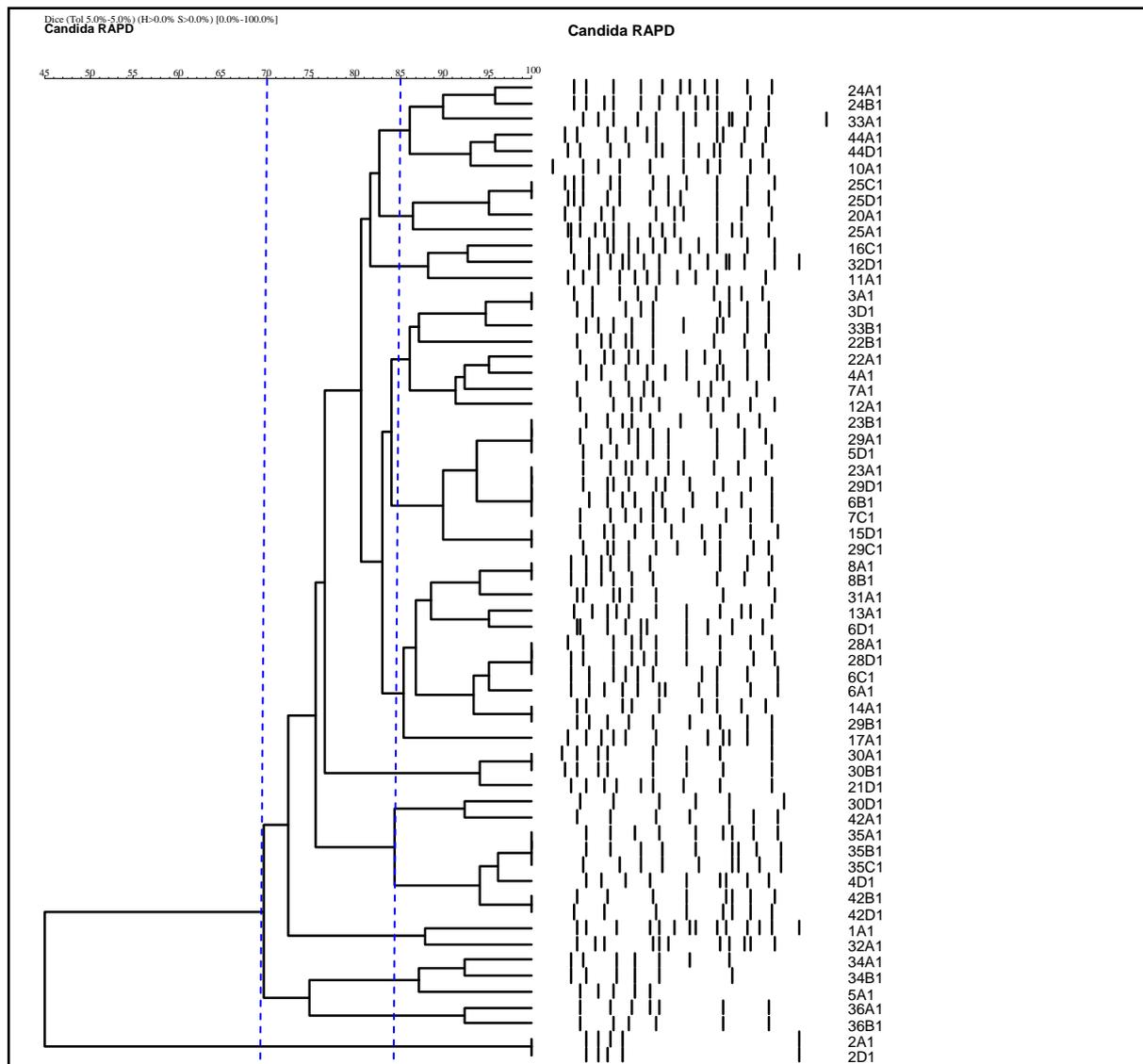
1: einzelne (<1 KBE)

2: wenig (10-100 KBE)

3: viel (100-1000 KBE)

4: massenhaft (>1000 KBE)

### 4.2.3.1 Dendrogramm *C. albicans*



**Abb. 8:** Dendrogramm von *C. albicans*

Das Dendrogramm zeigt 62 *C. albicans* Stämme, die aus dem Speichel (A), der Plaque (B), der kariösen Substanz (C) und dem Stuhl (D) von 33 Patienten isoliert worden waren. Die gestrichelte Linie bei 70% und mehr kennzeichnet eine Homologie der verglichenen *C. albicans* Stämme, die Linie bei 85% und mehr verdeutlicht einen Cluster, während bei der 100%-Linie eine genetische Identität vorliegt.

#### 4.2.3.2 Genetische Übereinstimmung der *C. albicans*-Stämme

Die Auswertung des Dendrogramms erfolgte zunächst unter dem Gesichtspunkt der genetischen Übereinstimmung der Patienten, die sowohl in der Mundhöhle als auch im Stuhl *C. albicans* aufwiesen. (Tab. 8)

Tabelle 8: Genetische Übereinstimmung in Mundhöhle und Stuhl

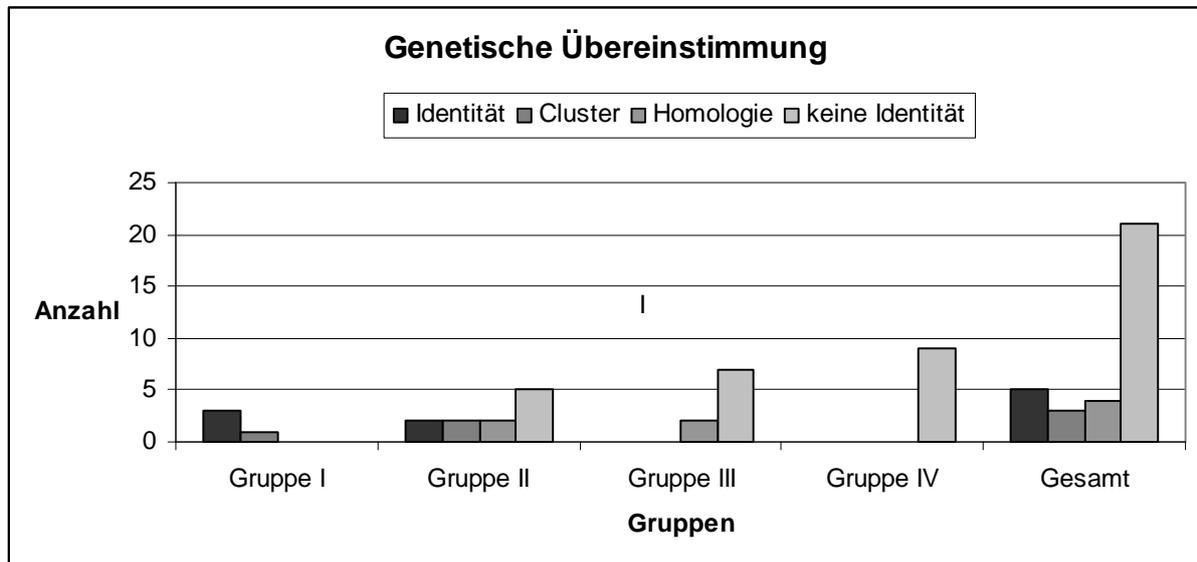
Genetische Übereinstimmung	Identität (100%)	Cluster ( $\geq 85\%$ )	Homologie ( $\geq 70\%$ )	Gesamt
<b>Gruppe I</b> (Vergleichsgruppe)	3	1	0	4
<b>Gruppe II</b> (Herzkranken Kinder)	2	2	2	6
<b>Gruppe III</b> (HTx-Kinder)	0	0	2	2
<b>Gruppe IV</b> (TU-Kinder)	0	0	0	0
<b>Gesamt</b>	5	3	4	12

Bei fünf (41,7%) von 12 Patienten, bei denen sowohl in der Mundhöhle als auch im Stuhl *C. albicans* isoliert wurde, konnte eine 100%ige Identität der Stämme nachgewiesen werden. Betroffen waren drei Patienten (60%) der Vergleichsgruppe und zwei Patienten (40%) der herzkranken Kinder.

Ein Cluster ( $\geq 85\%$ ) bildeten die *C. albicans*-Stämme von drei Patienten (25%). Von diesen gehörte ein Patient zur Vergleichsgruppe und zwei Patienten zur Gruppe II.

Eine genetische Homologie ( $\geq 70\%$ ) konnte schließlich bei den *C. albicans*-Stämmen von vier weiteren Patienten (33,3%) nachgewiesen werden. Zwei zählten zu Gruppe II der herzkranken Kinder und zwei zu Gruppe III der Kinder mit HTx. Es überraschte, dass bei den Kindern mit Tumorerkrankungen keinerlei genetische Übereinstimmungen der *C. albicans*-Stämme festgestellt werden konnten.

Die grafische Umsetzung der Ergebnisse aus Tabelle 8 erfolgte in Abbildung 9.



**Abb. 9:** Genetische Übereinstimmung

#### 4.2.3.3 Genetische Identität (100%) der *C. albicans*-Stämme zwischen den Isolaten

Bei Betrachtung der genetischen Identität zwischen den verschiedenen Proben/Isolaten ergab sich das in Tabelle 9 dargelegte Bild.

Tabelle 9: Genetische Identität zwischen unterschiedlichen Isolaten

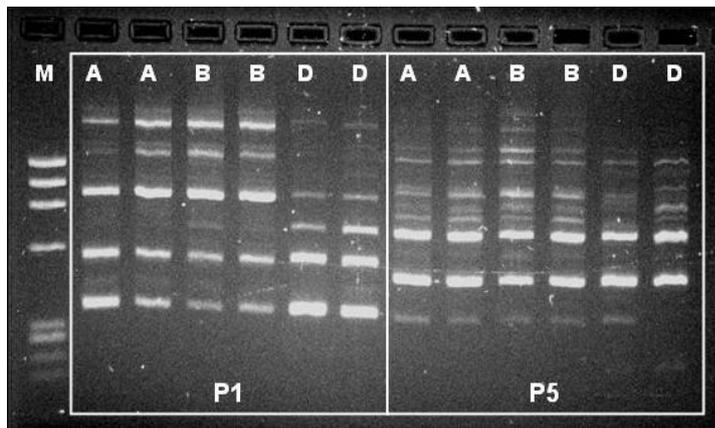
Kombination	Patienten (n)	%
A und B	2	25
A und C	0	0
A und D	3	37,5
B und C	0	0
B und D	1	12,5
C und D	1	12,5
A und B und C	1	12,5
<b>Gesamt</b>	<b>8</b>	<b>100</b>

A= Speichel, B= Plaque, C= kariöse Substanz, D= Stuhl

Es wird deutlich, dass zu den 5 Fällen genetischer Identität zwischen Mundhöhle und Stuhl (3x A/D, 1x B/D, 1x C/D) noch drei weitere kommen, bei denen eine 100%ige Übereinstimmung zwischen Isolaten der Mundhöhle vorlag. Dabei handelte es sich in 2 Fällen um Speichel und Plaque (A/B) und in einem Fall um Speichel, Plaque und kariöse Substanz (A/B/C).

#### 4.2.3.4 RAPD-Beispiele

- **Identität der *C. albicans*-Stämme zwischen Speichel (A) und Plaque (B)/ zusätzlich: Homologie zwischen Stuhl (D) und Speichel/Plaque (A/B)**

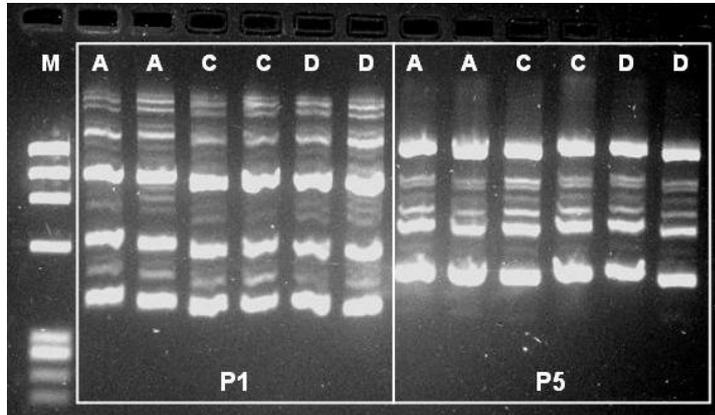


M= Marker, P1= Primer 1, P5= Primer 5, A= Speichel, B= Plaque, D= Stuhl

**Abb. 10:** RAPD, Patient 30, HTx

In Abbildung 10 wird die genetische Identität der *C. albicans*-Stämme von Speichel (A) und Plaque (B) am Beispiel der Substanzen von Patient 30 gezeigt. Nach Auswertung im Dendrogramm wurde nachgewiesen, dass der Stuhl (D) mit den zwei Substanzen der Mundhöhle eine genetische Homologie aufweist.

- Identität der *C. albicans*-Stämme zwischen kariöser Substanz (C) und Stuhl (D)/zusätzlich: A,C und D bilden ein Cluster

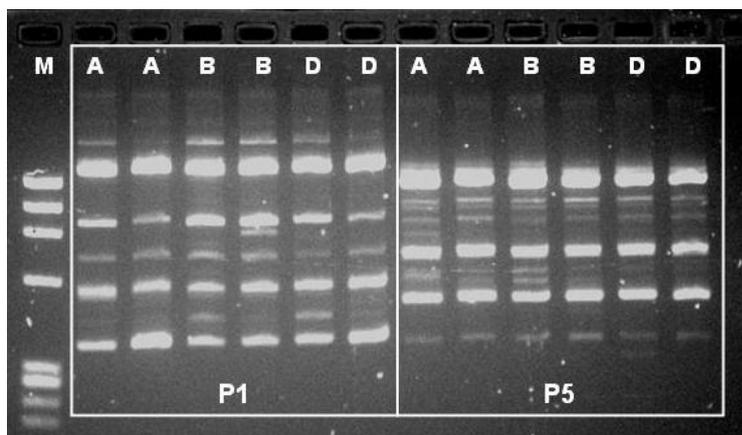


M= Marker, P1= Primer 1, P5= Primer 5, A= Speichel, C= kariöse Substanz, D= Stuhl

**Abb. 11:** RAPD, Patient 25, Vergleichsgruppe

Der Gellauf in Abbildung 11 lässt erkennen, dass die kariöse Substanz (C) und der Stuhl (D) des Patienten 25 genetisch identische *C. albicans*-Stämme aufweisen. Nach der Auswertung im Dendrogramm ergab sich, dass die kariöse Substanz (C) und der Stuhl (D) mit dem Speichel (A) zu einem Cluster gehören.

- Identität der *C. albicans*-Stämme zwischen Plaque (B) und Stuhl (D)/zusätzlich: Cluster A, B, D

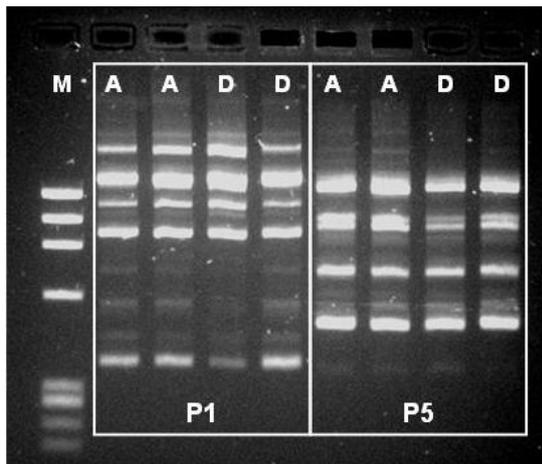


M= Marker, P1= Primer 1, P5= Primer 5, A= Speichel, B= Plaque, D= Stuhl

**Abb. 12:** RAPD, Patient 42, Vergleichsgruppe

Die Abbildung 12 zeigt, dass die *C. albicans*-Stämme in der Plaque (B) und im Stuhl (D) des Patienten 42 eine genetische Identität aufweisen. Bei dem Speichel (A) konnte nach Auswertung im Dendrogramm zu den Substanzen Plaque (B) und Stuhl (D) eine genetische Homologie nachgewiesen werden.

- **Identität der *C. albicans*-Stämme zwischen Speichel (A) und Stuhl (D)**

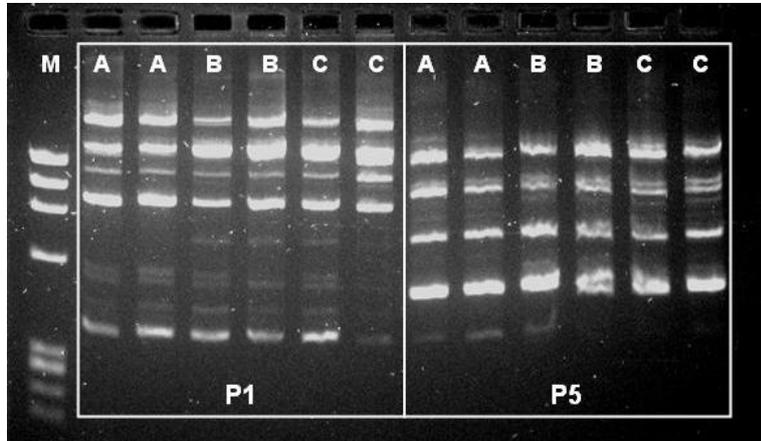


*M= Marker, P1= Primer 1, P5= Primer 5, A= Speichel, D= Stuhl*

**Abb. 13:** RAPD, Patient 28, Vergleichsgruppe

Das Bandenmuster im Gellauf der Abbildung 13 zeigt eine genetische Identität des Speichels (A) und des Stuhls (D) am Beispiel der Substanzen des Patienten 28.

- Identität der *C. albicans*-Stämme zwischen Speichel (A), Plaque (B) und kariöser Substanz (C)



M= Marker, P1= Primer 1, P5= Primer 5, A= Speichel, B= Plaque, C= kariöse Substanz

**Abb. 14:** RAPD, Patient 35, HTx-Gruppe

In Abbildung 14 lässt sich deutlich erkennen, dass die Substanzen Speichel (A), Plaque (B) und kariöse Substanz (C) - die gesamten Mundhöhlenisolate von *C. albicans* - des Patienten 35 eine 100%ige Identität aufweisen.

#### 4.2.4. Gruppenzuordnung der positiven Proben mit *C. dubliniensis*

Tabelle 10: Verteilung der *C. dubliniensis* Isolate

Gruppe	Patientenanzahl	Proben				
		Speichel	Plaque	Kariöse Substanz	Stuhl	gesamt positiv
<b>I</b> (Vergleichsgruppe)	6	4	3	1	5	13
<b>II</b> (Herzkranke Kinder)	0	0	0	0	0	0
<b>III</b> (HTx Kinder)	0	0	0	0	0	0
<b>IV</b> (Tu-Kinder)	1	0	0	0	1	1
gesamt	7	4	3	1	6	14

Im Stuhl, insgesamt 6 Isolate, wurde *C. dubliniensis* gruppenübergreifend am häufigsten nachgewiesen. Erst danach folgten die oralen Abstriche mit Speichel (4mal), Plaque (3mal) und kariöse Substanz (1mal).

Bei Gegenüberstellung der Patientengruppen war die Vergleichsgruppe mit 13 Isolaten am häufigsten mit *C. dubliniensis* infiziert. Nur in der Gruppe der Tumorkinder konnte noch ein weiteres positives Isolat nachgewiesen werden.

Die grafische Umsetzung der Häufigkeiten, der mit *C. dubliniensis* behafteten Proben erfolgte in Gruppenzuordnung in Abbildung 15.

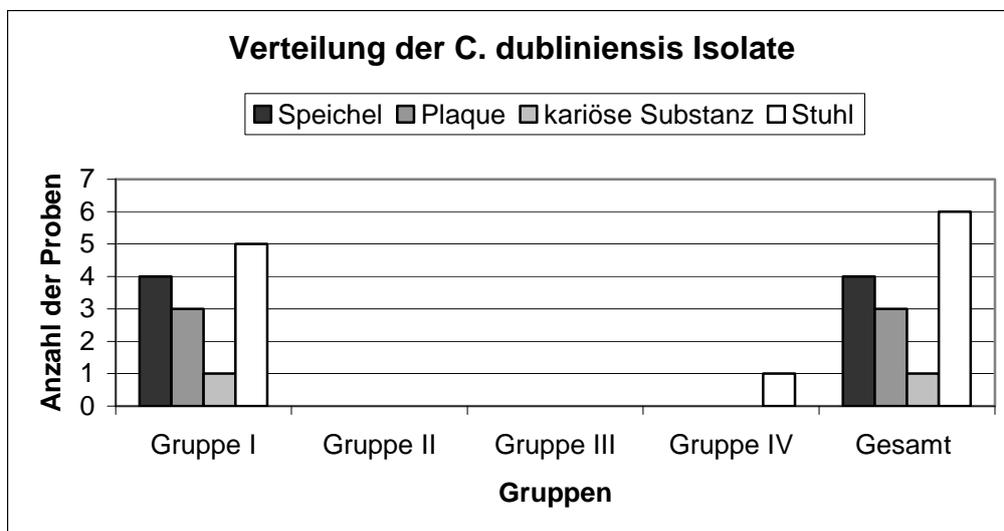


Abb. 15 Verteilung der *C. dubliniensis* Isolate

Tabelle 11: Häufigkeit von *C. dubliniensis* in den unterschiedlichen Substanzen

Behaftete Substanzen	Patienten (n)	%
Nur D	3	42,8
A und C	1	14,4
A und B und D	3	42,8
<b>Gesamt</b>	<b>7</b>	<b>100</b>

A= Speichel, B= Plaque, C= kariöse Substanz, D= Stuhl

#### 4.2.5 Häufigkeit von *C. dubliniensis* in den verschiedenen Substanzen

Insgesamt 3 Patienten (42,8%) wiesen einen gleichzeitigen Befall der Substanzen Speichel, Plaque und Stuhl auf. Eine ausschließliche Besiedelung des Stuhls fand sich ebenfalls in 3 Fällen (42,8%). Weiterhin konnte bei einem Fall (14,4%) *C. dubliniensis* aus den Substanzen Speichel und kariöse Substanz isoliert werden. Tabelle 11 gibt Aufschluss, in welchen entnommenen Substanzen der Patienten der Pilz nachgewiesen wurde.

Tabelle 12: Mengenmäßige *C. dubliniensis*-Besiedelung der Mundhöhle und des Stuhls

Patient			Probe			
Anzahl	Patient Nr.	Gruppe	<i>Candida dubliniensis</i> (Keimzahlklassen)			
			Speichel A	Plaque B	kariöse Substanz C	Stuhl D
1	23	IV	0	0	0	1
2	27	I	2	3	0	1
3	38	I	0	0	0	2
4	39	I	2	1	0	1
5	40	I	3	3	0	4
6	43	I	0	0	0	2
7	45	I	2	0	2	0
<b>Patient 23</b>						
<b>: <i>C. albicans</i> in Speichel und Plaque, <i>C. dubliniensis</i> im Stuhl</b>						

Gruppe I: Kinder ohne Immunsuppression und Endocarditisprophylaxepflicht  
(Vergleichsgruppe)

Gruppe II: herzkrankte Kinder ohne HTx

Gruppe III: herztransplantierte Kinder (HTx)

Gruppe IV: Kinder mit Tumorerkrankungen

Keimzahlklassen:

0: keine

1: einzelne (<1 KBE)

2: wenig (10-100 KBE)

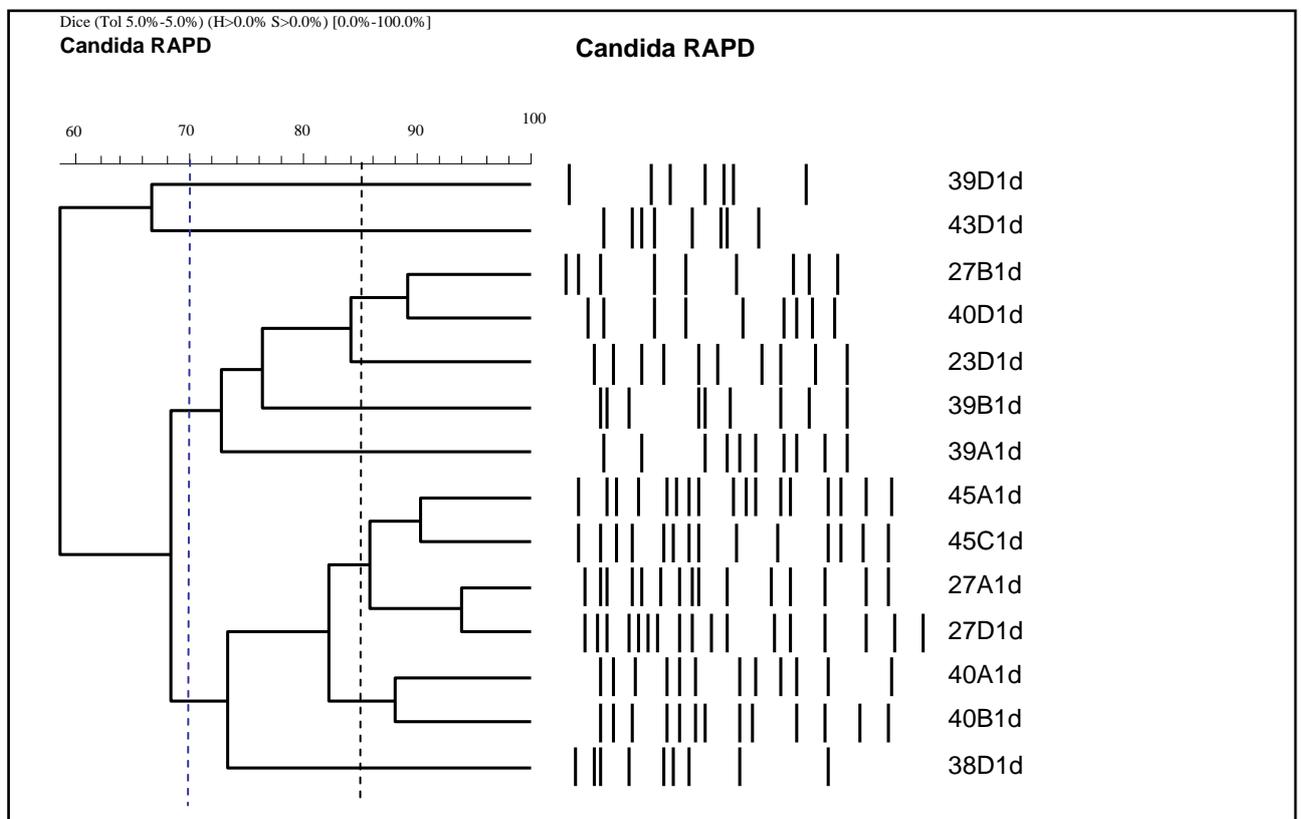
3: viel (100-1000 KBE)

4: massenhaft (>1000 KBE)

#### 4.2.6 RAPD-Typisierung der *C. dubliniensis*-Stämme

Von den 41 Patienten mit Candida speziez wiesen 7 (17,0%) in insgesamt 14 Isolaten *C. dubliniensis* auf. Die übersichtliche Darstellung in Tabelle 12 gibt die für jeden Patienten gefundenen Informationen zur Probenbesiedelung wieder. Dabei wurde auch die jeweilige Mengenbewertung in fünf Keimzahlklassen mit eingebracht. Auf der Basis dieses Ergebnis-pools erfolgte schließlich die Erstellung des in Abbildung 16 dargelegten Dendrogramms zur Abklärung der genetischen Verwandtschaftsverhältnisse der Candidaisolate. Wobei anzumerken ist, dass der Patient 23 zusätzlich zu der Besiedelung im Stuhl mit *C. dubliniensis* auch eine Besiedelung mit *C. albicans* in den Substanzen Speichel und Plaque aufwies.

##### 4.2.6.1 Dendrogramm Candida dubliniensis



**Abb. 16:** Dendrogramm von *C. dubliniensis*

Analog zu *C. albicans* zeigt das Dendrogramm die 14 *C. dubliniensis* Stämme, die aus dem Speichel (A), der Plaque (B), der kariösen Substanz (C) und dem Stuhl (D) von 7 Patienten isoliert worden waren. Die gestrichelte Linie bei 70% und mehr kennzeichnet eine Homologie der verglichenen *C. dubliniensis* Stämme, die Linie bei 85% und mehr verdeutlicht einen Cluster, während bei der 100%-Linie eine genetische Identität vorliegt.

#### 4.2.6.2 Genetische Übereinstimmung der *C. dubliniensis*-Stämme

Die Auswertung des Dendrogramms erfolgte zunächst unter dem Gesichtspunkt der genetischen Übereinstimmung der Patienten, die sowohl in der Mundhöhle als auch im Stuhl *C. dubliniensis* aufwiesen. (Tab. 13)

Tabelle 13: Genetische Übereinstimmung in Mundhöhle und Stuhl

Genetische Übereinstimmung	Identität (100%)	Cluster (≥ 85%)	Homologie (≥ 70%)	keine	Gesamt
<b>Gruppe I</b> (Vergleichsgruppe)	0	1	0	2	3
<b>Gruppe II</b> (Herzkranken Kinder)	0	0	0	0	0
<b>Gruppe III</b> (HTx-Kinder)	0	0	0	0	0
<b>Gruppe IV</b> (TU-Kinder)	0	0	0	0	0
<b>Gesamt</b>	0	1	0	2	3

Bei einem (33,3%) von 3 Patienten der Vergleichsgruppe, bei denen sowohl in der Mundhöhle als auch im Stuhl *C. dubliniensis* isoliert wurde, konnte eine Clusterzugehörigkeit nachgewiesen werden. In den beiden anderen Fällen ergaben sich keine genetischen Übereinstimmungen.

Die grafische Umsetzung der Ergebnisse aus Tabelle 13 erfolgte in Abbildung 17.

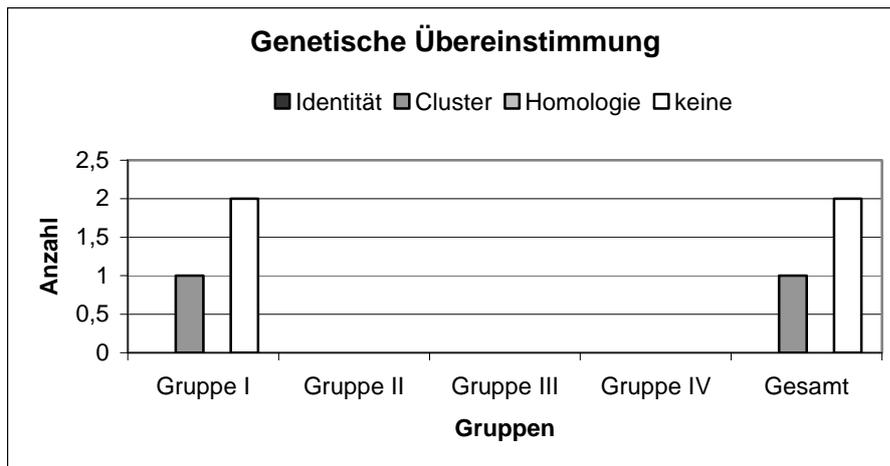


Abbildung 17: Genetische Übereinstimmung

#### 4.2.6.3 Genetische Übereinstimmung der *C. dubliniensis*-Stämme zwischen den Isolaten

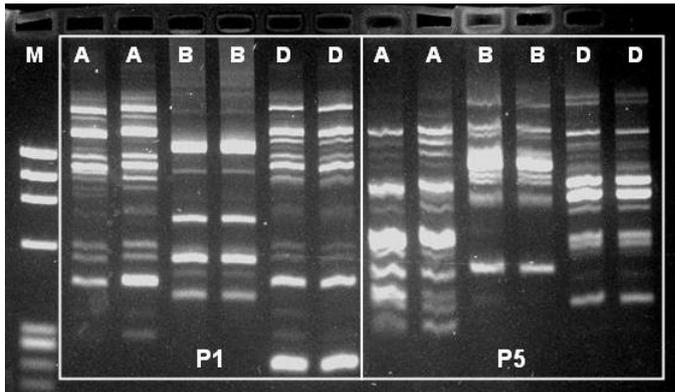
Tabelle 14: Genetische Übereinstimmung zwischen unterschiedlichen Isolaten

Kombination	Identität (100%)	Cluster (≥ 85%)	Homologie (≥ 70%)	keine	Gesamt
A und B	0	1	1	1	3
A und C	0	1	0	0	1
A und D	0	1	0	2	3
Gesamt	0	3	1	3	7

Es wird deutlich, dass zu dem einen Fall der Clusterzugehörigkeit zwischen Speichel und Stuhl (A/D), noch zwei weitere kommen, bei denen die genetische Übereinstimmung  $\geq 85\%$  zwischen den Isolaten der Mundhöhle betrug. Dabei handelte es sich in einem Fall um Speichel und Plaque (A/B) und im anderen Fall um Speichel und kariöse Substanz (A/C). Desweiteren ließ sich in einem Fall eine genetische Homologie der Substanzen Speichel und Plaque (A/B) nachweisen. In drei Fällen ergaben sich schließlich keine Hinweise auf eine genetische Stammverwandtschaft.

#### 4.2.6.4 RAPD-Beispiele

- Clusterzugehörigkeit der *C. dubliniensis*-Stämme zwischen Speichel (A) und Stuhl (D)

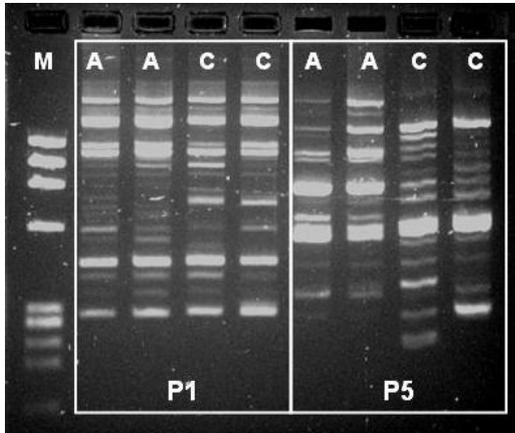


*M*= Marker, *P1*= Primer 1, *P5*= Primer 5, *A*= Speichel, *B*= Speichel, *D*= Stuhl

**Abb. 18:** RAPD, Patient 27, Vergleichsgruppe, 94% Identität

In Abbildung 18 wird die Clusterzugehörigkeit der *C. dubliniensis*-Stämme von Speichel (A) und Stuhl (D) am Beispiel der Substanzen von Patient 27 gezeigt. Die Plaque (B) wies zu den zuvor genannten Substanzen keine genetische Übereinstimmung auf.

- Clusterzugehörigkeit der *C. dubliniensis*-Stämme zwischen Speichel (A) und kariöser Substanz (C)

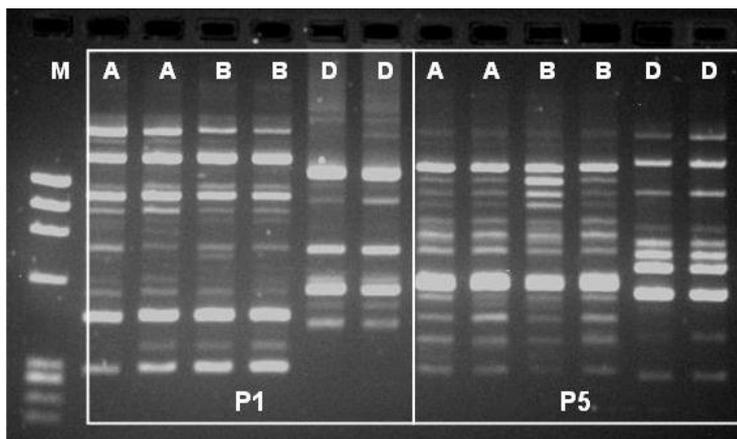


M= Marker, P1= Primer 1, P5= Primer 5, A= Speichel, C= kariöse Substanz

**Abb. 19:** RAPD, Patient 45, Vergleichsgruppe, 90% Identität

Der Gellauf in Abbildung 19 lässt erkennen, dass der Speichel (A) und die kariöse Substanz (C) des Patienten 45 innerhalb eines Clusters liegen.

- Clusterzugehörigkeit der *C. dubliniensis*-Stämme zwischen Speichel (A) und Plaque (B)



M= Marker, P1= Primer 1, P5= Primer 5, A= Speichel, B= Speichel, D= Stuhl

**Abb. 20:** RAPD, Patient 40, Vergleichsgruppe, 88% Identität

Die Abbildung 20 zeigt, dass die *C. dubliniensis*-Stämme im Speichel (A) und in der Plaque (B) des Patienten 40 einen Cluster bilden. Bei der Substanz Stuhl (D) konnte

nach Auswertung im Dendrogramm keine genetische Übereinstimmung festgestellt werden.

### 4.3 Falldokumentation

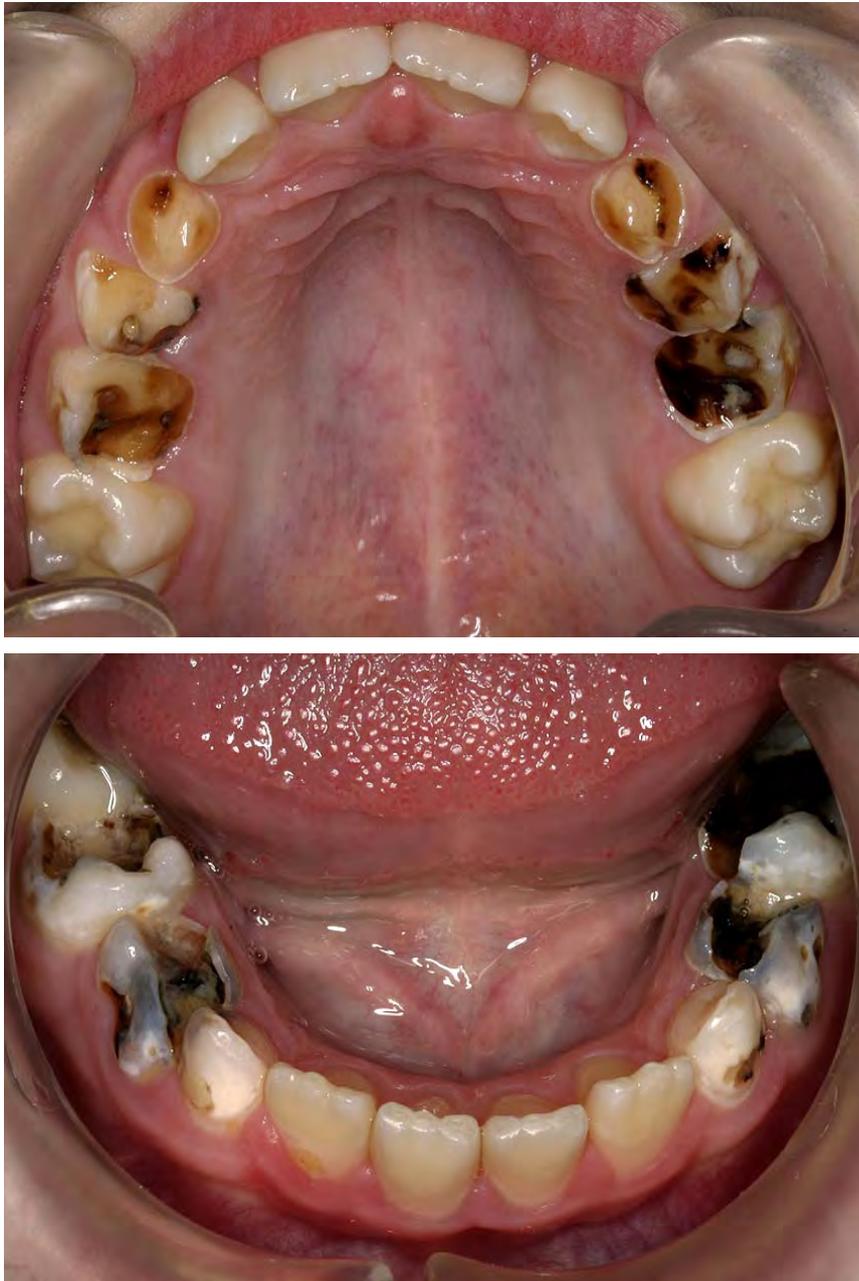
Der nachfolgende Fall wurde zur Dokumentation ausgewählt, weil er geeignet erscheint, den Zusammenhang zwischen der kariösen Zerstörung des Gebisses und einer Candidabesiedelung des Orointestinaltraktes beispielhaft zu belegen.

Patient :                   B.S. (Nr. 25/Vergleichsgruppe), 11jähriger Junge;  
                                  Grunderkrankung: Diabetes mellitus Typ I

#### Allgemeine Anamnese:

Der Patient wurde vom Hauszahnarzt an die Poliklinik für Kinderzahnheilkunde des Universitätsklinikums in Gießen überwiesen.

Seit dem 2. Lebensjahr ist bei ihm ein Diabetes mellitus Typ I bekannt, der im Verlauf der Erkrankung zu rezidivierenden Hypoglykämien führte. Der Junge zeigt neben einer verzögerten Sprachentwicklung auch eine motorische Entwicklungsverzögerung. Desweiteren liegen als neuropädiatrische Bewertungen im Alter von 8 Jahren Konzentrationsschwäche, Schulprobleme, Enkopresis und Enuresis nocturna vor. Bei den Eltern besteht eine Konsanguinität (Cousin/Cousine).

Fotodokumentation:

**Abb. 21:** Kariöses Wechselgebiss (Übersicht)

Der klinische Übersichtsbefund der Mundhöhle und des Wechselgebisses wird aus Abbildung 21 ersichtlich. Zum Zeitpunkt der Erstaufnahme befanden sich 12 gesunde bleibende und 12 kariöse Milchzähne in der Mundhöhle. Die Einzelzahnbefunde werden in Tab. 15 dargelegt.

Tabelle 15: Zahnbefundschema

		FV					*	*					FV		
<del>18</del>	<del>17</del>	16	<del>15</del>	<del>14</del>	<del>13</del>	12	11	21	22	<del>23</del>	<del>24</del>	<del>25</del>	26	<del>27</del>	<del>28</del>
			c	c	c					c	c	c	Milchzähne		
			55	54	53	52	51	61	62	63	64	65			
			85	84	83	82	81	71	72	73	74	75			
			c	c	c					c	c	c			
<del>48</del>	<del>47</del>	46	<del>45</del>	<del>44</del>	<del>43</del>	42	41	31	32	<del>33</del>	<del>34</del>	<del>35</del>	36	<del>37</del>	<del>38</del>
		FV											FV		

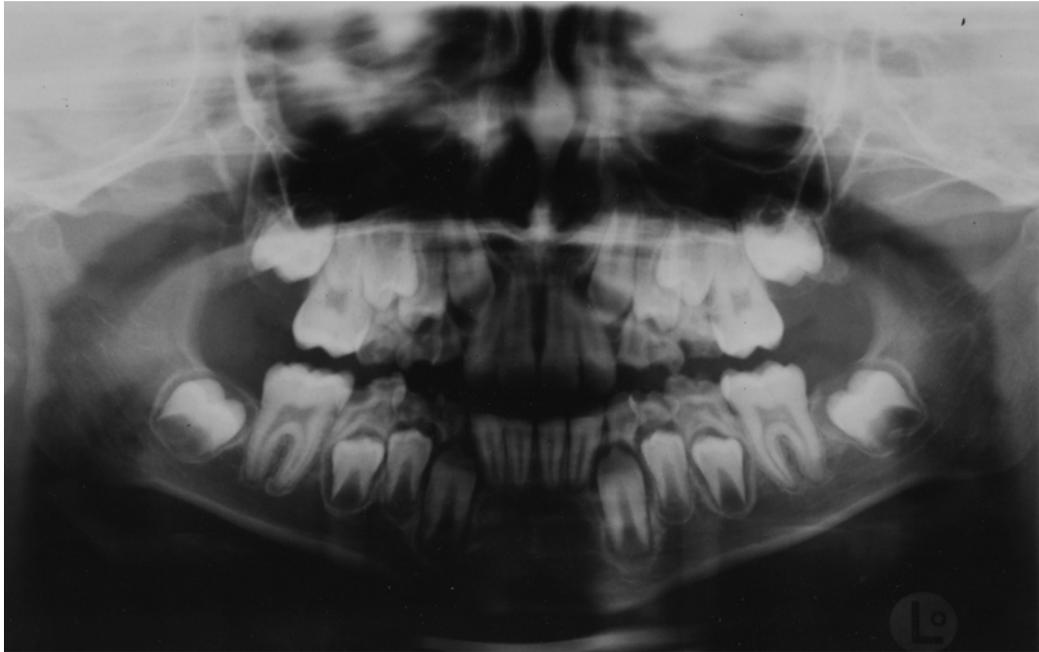
Legende: FV = Fissurenversiegelung; c = cariös; \* = fehlstrukturiert

Die Einzelzahnbefundung belegt, dass bei dem immerhin schon 11jährigen Jungen bisher keine Milchzahntherapie in Form von Zahnfüllungen oder Zahnextraktionen erfolgt ist. Das Ausmaß der kariösen Zahnkronenzerstörung muss bei den Milchmolaren (55,54,65,64,75,74,85,84) als extrem und bei den Milcheckzähnen (53,63,73,83) als fortgeschritten eingeschätzt werden.

#### Klinische Diagnose:

Kariöses Wechselgebiss (DMF-T/dmf-t = 12)<sup>1</sup> bei sonst altersentsprechender Gebissentwicklung.

<sup>1</sup>Der DMF-T-Wert beschreibt den individuellen Karies-Befall. Er basiert auf der Anzahl kariöser (decayed, D), fehlender (missing, M) und gefüllter (filled, F) Zähne (teeth, T). Für das Milchgebiss werden kleine Buchstaben verwendet.

Röntgenbefund:

**Abb. 22:** Orthopantomogramm

Die Röntgenuntersuchung lässt in Abbildung 22 ein altersentsprechendes Wechselgebiss erkennen. Die noch vorhandenen Milchzähne weisen eine ebenso altersentsprechend fortgeschrittene Wurzelresorption auf, was auf den baldigen physiologischen Verlust dieser Zähne schließen lässt.

Mikrobiologische Befunde:Speichel:

a) physiologische Flora : vergrünende Streptokokken (4)<sup>2</sup>,  
nicht hämolysierende Streptokokken (2),  
saprophytäre Neisserien (3)

---

<sup>2</sup> Die Mengenangaben der Keime erfolgten in den Keimzahlklassen: 0: keine; 1: einzelne [ $<10$  koloniebildende Einheiten (KBE) = colony forming units (CFU)]; 2: wenig ( $10$ - $10^2$  CFU); 3: viel ( $10^2$ - $10^3$  CFU); 4: massenhaft ( $\geq 10^3$  CFU).

b) Karieskeime : *Streptokokkus mutans* (2)\*,  
Laktobazillen (1)

c) Candida : *C. albicans* (2)

\*Keimzahlklassen : 0 = keine, 1 = wenig ( $<10^5$  KBE/ml Speichel)  
2 = viel ( $\geq 10^5$  KBE/ml Speichel)

Plaque:

Candida : keine (0)

Kariöse Zahnschubstanz:

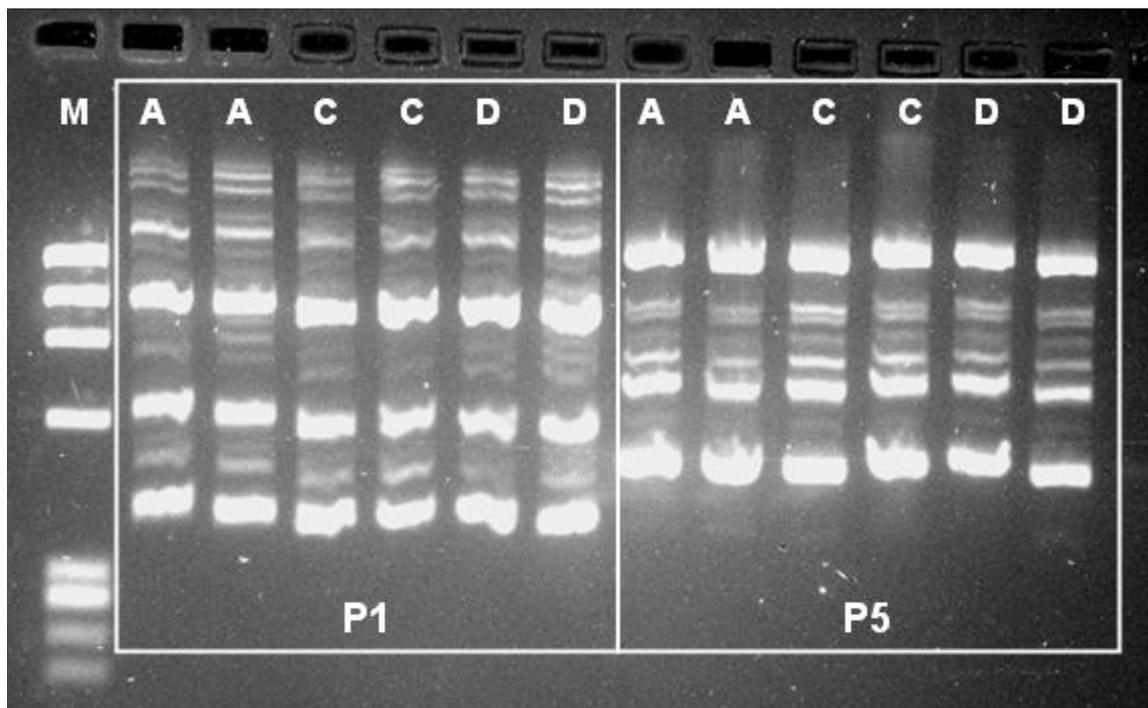
Candida : *C. albicans* (2)\*\*

Stuhl:

Candida : *C. albicans* (1)

\*\*Keimzahlklassen : 0 = keine, 1 = einzelne ( $<10$  KBE),  
2 = wenig ( $10-10^2$  KBE), 3 = viel ( $10^2-10^3$  KBE),  
4 = massenhaft ( $>10^3$  KBE)

Da für den Patienten in den Materialien Speichel, kariöse Substanz und Stuhl *C. albicans* nachgewiesen worden war, wurde von diesen Materialien eine PCR durchgeführt. Der entsprechende Gellauf ist aus Abbildung 23 ersichtlich, wobei letztere mit Abbildung 11 identisch ist.



*M= Marker, P1= Primer 1, P5= Primer 5, A= Speichel, C= kariöse Substanz, D= Stuhl*

**Abb. 23:** RAPD, Patient 25, Vergleichsgruppe

Die Auswertung im Dendrogramm ergab eine 100%ige Identität der *C. albicans* Stämme in der kariösen Substanz und im Stuhl. Mit dem Speichel bildeten die Materialien kariöse Substanz und Stuhl einen Cluster ( $\geq 85\%$ ).

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Studie sollte der Zusammenhang der Candidabesiedelung der Mundhöhle und des Gastrointestinaltraktes in Bezug auf die genetische Stammverwandtschaft der Candida-Stämme bei herzgesunden, immunsupprimierten und/oder endokarditisprophylaxepflichtigen Kindern im Alter zwischen zwei und sechzehn Jahren untersucht werden. Die Beziehung zwischen Candida und Karies ist inzwischen wissenschaftlich belegt [14,59,72]. So zeigten vorausgegangene Arbeiten, dass Kinder mit naturgesunden Gebissen selten eine Candidabesiedelung der Mundhöhle aufwiesen [52,68]. Bei Kindern mit kariösen Zähnen ließen sich aus entnommener erweichter Zahnhartsubstanz jedoch massenhaft Pilze anzüchten, womit sich die kariöse Läsion als ein bevorzugtes Biotop darstellt, aus der es zu einer Keimstreuung in den Magen-Darm-Trakt kommen kann [51,67].

In einer Vorgängerstudie unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass bei sonst gesunden Kindern mit kariösen Gebissen eine positive Korrelation zwischen der oralen und gastrointestinalen Candidabesiedelung besteht [56]. Auch ließ sich durch Gentytisierung der Nachweis einer deszendierenden Kolonisation erbringen, indem eine genetische Identität zwischen Candida-Isolaten der Mundhöhle und dem Stuhl bestätigt wurde [24]. Eine solche deszendierende Candidakolonisation kann aber besonders bei immunsupprimierten und endokarditisgefährdeten Patienten ein ernstzunehmendes Problem darstellen [1]. Unter diesem Aspekt führten wir Untersuchungen auf einen Candidabefall der Mundhöhle und des Magen-Darm-Traktes bei herztransplantierten, herzerkrankten und chemotherapie-behandlungsbedürftigen Kindern durch und unterzogen die gewonnenen Candida-Isolate anschließend ebenfalls einer Gentytisierung.

Dabei wurden für diesen Teil der Studie die auf Candida spezies abzielenden Ergebnisse der vorausgegangenen Bezugsstudie zugrunde gelegt [53,54]. Sie umfassten sowohl den mikrobiologischen Untersuchungsteil von Speichel, Plaque, kariöser Substanz und Stuhl als auch den serologischen Nachweis von der Candida-Antigen/Candida-Antikörperkonzentration im Serum. Von den insgesamt 103 Patienten, die sich zu 23 Patienten auf die Vergleichsgruppe (GI), zu 24 Patienten auf die Gruppe der herzkranken Kinder (GII), zu 31 Patienten auf die Gruppe der

Kinder mit HTx (GIII) und zu 25 Patienten auf die Gruppe der Kinder mit Tumoren (GIV) verteilen, konnte bei 41 (39,8%) eine Candidabesiedelung nachgewiesen werden. In der Gruppe I waren 47,8%, in der Gruppe II 45,8%, in der Gruppe III 32,8% und in der Gruppe IV 36% mit Candida besiedelt. Von den 41 Patienten mit Candida spezies wiesen 30 Patienten *C. albicans* in Reinkultur, 6 Patienten *C. dubliniensis* in Reinkultur und je ein Patient *C. glabrata* und *C. lusitanae* in Reinkultur auf. In 3 zusätzlichen Fällen traten Mischkulturen von *C. albicans* mit je einmal *C. dubliniensis*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* auf.

*C. albicans* Isolate wurden bei 4 Patienten der Gruppe I, 10 Patienten der Gruppe II, 10 Patienten der Gruppe III und bei 9 Patienten der Gruppe IV nachgewiesen. Insgesamt wurden bei diesen Patienten 63 behaftete Substanzen gefunden. Dabei war der Speichel mit 30 Isolaten gruppenübergreifend am häufigsten betroffen. Innerhalb der Gruppenverteilung waren die herzkranken Patienten und die mit HTx häufiger mit *C. albicans* behaftet als die beiden anderen Gruppen.

Zur Abklärung der Stammverwandtschaft der diagnostizierten Candidastämme, wurde die Gentyppisierung mittels der „Randomly Polymorphic DNA (RAPD)“ durchgeführt. Sie hatte sich vorher bereits in anderen mikrobiologisch-epidemiologischen Studien für Candida als geeignete Methode erwiesen [23,62]. Unter der Verwendung von RAPD-beads konnten damit Fehler bei der Durchführung des sehr sensitiven Verfahrens gering gehalten werden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde weiterhin unter Verwendung immer desselben Thermocyclers gesteigert, sodass sich die RAPD für die vorliegende Studie als sehr brauchbare Methode zur Gentyppisierung von Candida erwies.

Von den 33 Kindern, die insgesamt positiv auf *C. albicans* getestet worden waren, zeigte sich bei 12 Kindern (36,4%) eine gleichzeitige Besiedelung der Mundhöhle und des Magen-Darm-Traktes. In der Gruppe der Tumor-Kinder (GIV) ließ sich allerdings keine gleichzeitige Besiedelung der Mundhöhle und des Stuhl nachweisen. Dies erlaubte die Annahme, dass sich die Candidakolonisation des Orintestinaltraktes bei Tumorkindern durchaus von der Vergleichsgruppe, den herzkranken Kindern und den Kindern mit HTx unterscheiden kann. Leider liegen zu diesem Ergebnis bisher keine vergleichbaren Studien in der uns zugänglichen Literatur vor. Bei 5 der 12 Kinder (41,7%) konnte eine 100%ige Identität der *C. albicans*-Stämme nachgewiesen werden. Bei 3 Kindern (25%) bildeten die Stämme

einen Cluster ( $\geq 85\%$ ) und bei 4 Kindern (33,3%) zeigte sich eine genetische Homologie ( $\geq 70\%$ ). Die 5 Kinder mit der 100%igen Identität verteilten sich zu 60% auf die Gruppe der Kinder, die zwar stationär aufgenommen, jedoch weder herzkrank, immunsupprimiert noch endokarditisprophylaxepflichtig waren, und zu 40% auf die Gruppe der herzkranken Kinder ohne HTx. Diese Ergebnisse belegen, dass ausgehend von der Mundhöhle durchaus eine Weiterleitung der *C. albicans* Keime in den Gastrointestinaltrakt stattfinden kann und dass es dann dort auch zu einer Kolonisation der Hefen kommt. Diesbezüglich berichteten Saporito-Irwin et al., dass die Sproßpilze in der Lage sind, sich durch Mutationen der pH-regulierenden Gene PHR1 und PHR2 unterschiedlichen pH-Wert Regionen anzupassen [49]. Zwolinska-Wcislo et al. fanden heraus, dass die Pilze selbst bei einem pH-Wert von 2,0 überleben und sich weiter vermehren können [74].

*C. dubliniensis* konnte bei 7 von den 41 Patienten (17,1%) am zweithäufigsten nach *C. albicans* nachgewiesen werden. Dabei trat der Pilz bei 6 Kindern der Vergleichsgruppe (85,7%) und bei einem Kind (14,3%) der Tumorgruppe auf. Eine genetische Übereinstimmung als Cluster ( $\geq 85\%$ ) der *C. dubliniensis*-Stämme aus den Substanzen der Mundhöhle und des Stuhls, die nur bei der Vergleichsgruppe gefunden wurde, ergab sich in nur einem von drei Fällen. Hinweise auf Identität (100%) und Homologie ( $\geq 70\%$ ) fehlten ganz. Die Gruppe der herzkranken und die Gruppe der Kinder mit HTx wiesen keine Besiedelung mit *C. dubliniensis* auf. Auch für die Gruppe der Tumorkinder konnte nur ein positives Stuhlisolat gefunden werden. In einer Untersuchung von Tekeli et al., an der 543 Tumorpatienten teilnahmen, und bei der in 209 Fällen *Candida* spezies im Rachenabstrich isoliert wurden, handelte es sich in keinem Fall um *C. dubliniensis* [57]. Es lässt sich somit vermuten, dass dieser Keim nur von untergeordneter Rolle für Kinder mit schwerwiegenden Allgemeinerkrankungen ist.

In der vorangegangenen Studie [53] wurde auch die Quantität der *Candida*-Antigen-/Antikörperkonzentration des Serums für die Gruppen der herzgesunden (GI), herzkranken ohne HTx (GII) und immunsupprimierten (nach HTx) Kindern (GIII) untersucht. Setzt man die dortigen Ergebnisse mit denen zur genetischen Stammverwandtschaft in Bezug, so ergab sich folgendes:

Das *Candida*-Antigen wurde in 3 Fällen der Gruppe I, in einem Fall der Gruppe II und in 5 Fällen der Gruppe III positiv bewertet. Von diesen war in allen Gruppen nur

jeweils ein Patient aktuell mit Candida befallen. Bei dem Kind der Gruppe I handelte es sich um *C. dubliniensis*, der in Speichel, Plaque und Stuhl nachgewiesen wurde. Hier ergab die Gentypisierung, dass Speichel und Stuhl zu einem Cluster gehörten, die Plaque allerdings keine Übereinstimmung mit den anderen Substanzen zeigte. Beim Fall der Gruppe II konnte *C. albicans* im Speichel und in der kariösen Substanz diagnostiziert werden, die Gentypisierung erbrachte jedoch keine Übereinstimmung. Beim Kind der Gruppe III ließ sich nur im Speichel *C. albicans* isolieren. Aus dem Vorhandensein von Candida-Antigenen lässt sich folgern, dass der Hefepilz sehr wohl über die Darmpassage auch in das Blut des Patienten gelangen kann [25]. Auch Prella et al. konnten nachweisen, dass bei einer vermehrten Candidakolonisation des Gastrointestinaltraktes diese als Ausgangspunkt für eine invasive Candidiasis mit systemischen Infektionen anzusehen ist [41].

Die Untersuchung auf Candida-Antikörper erbrachte in der vorangegangenen Studie in je 3 Fällen der Gruppe I und II ein positives Ergebnis. In Gruppe III der HTx-Kinder ließ sich jedoch kein Fall mit Candida-Antikörpern nachweisen. Bei 2 dieser Patienten der Gruppe I wurde auch aktuell *C. albicans* isoliert. Bei dem ersten Patienten handelte es sich um die Substanzen Speichel, kariöse Substanz und Stuhl. Davon wiesen die kariöse Substanz und der Stuhl eine 100% Identität auf und der Speichel erbrachte eine zusätzliche Clusterzugehörigkeit zu den vorgenannten Isolaten. Bei dem zweiten Patienten konnte ein positiver *C. albicans* Nachweis in den Substanzen Speichel, Plaque und Stuhl geführt werden. Die Isolate aus Plaque und Stuhl waren zu 100% genetisch identisch, der Speichel zeigte zu den beiden anderen Substanzen eine genetische Homologie. In der Gruppe II (herzkranke Kinder) wurde nur bei einem Patienten aktuell im Speichel *C. albicans* isoliert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine deszendierende Candidakolonisation aus der Mundhöhle über den Gastrointestinaltrakt zu einem positiven Antikörpertiter im Serum führen kann. Wichtig ist jedoch anzumerken, dass bei der Gruppe der HTx-Kinder zwar positive Candida-Antigen Nachweise geführt werden konnten, sich jedoch keine Candida-Antikörper fanden, was sich auf die vorausgegangene therapeutische Immunsuppression dieser Kinder zurückführen lässt.

Auch andere Arbeitsgruppen konnten Stammverwandtschaften von Candida spezie, nachgewiesen in unterschiedlichen Materialien bei ein und derselben Person, feststellen [34,71]. In der Studie von Hossain et al. aus unserer Giessener

Arbeitsgruppe wurde die clonale Beziehung von *C. albicans* in der Mundhöhle und im Gastrointestinaltrakt überprüft [24]. Zur Untersuchung kamen Speichel, Plaque, kariöse Substanz und Stuhl von 56 Kindern mit kariösen Zähnen und von 52 Kindern mit naturgesundem Gebiss. Vorherrschend lag *C. albicans* in der kariösen Zahnschicht vor. Bei 23 Kindern konnte *C. albicans* sowohl in der Mundhöhle als auch im Stuhl nachgewiesen werden. Eine genetische Identität konnte bei 15 dieser 23 Kinder festgestellt werden.

Wie auch die vorangegangene Untersuchung [54] belegt die vorliegende Studie die deszendierende Kolonisation von *C. albicans*. Die kariöse Zahnläsion stellt dabei das wichtigste Reservoir für Candida dar, von wo aus die Weiterleitung des Keims erfolgt. Wetzel et al. belegten, dass eine Gabe von Amphotericin B für die Eliminierung von Candida aus der Mundhöhle allein nicht ausreicht [56]. Sie testeten 54 Kinder mit kariösem und 49 Kinder mit naturgesundem Gebiss. Bei 66,7% der Kinder mit kariöser Gebisserkrankung ließen sich Candida spezie nachweisen. Bei den Kindern mit naturgesundem Gebiss bestand dagegen nur bei 2% eine Candidabesiedelung der Mundhöhle. Beim Therapievergleich der Kinder mit Karies ergab sich, dass der medikamentöse Einfluss von Amphotericin B alleine nur minimalen Einfluss auf die Candidabesiedelung der Mundhöhle hatte. Wurde die Mundhöhle dagegen komplett zahnärztlich saniert, waren bei der Nachkontrolle bereits 90% der Patienten pilzfrei. Eine 100%ige Eliminierung der Hefen ergab sich schließlich bei Kombination der zahnärztlichen Sanierung mit Amphotericin B.

Auch eine Prophylaxe allein mit dem Antimykotikum Fluconazol bei onkologischen Kindern zeigte in der Studie von Kersun et al. keine große Wirkung [26]. Unter dem prophylaktischen Aspekt testeten Flisfisch et al. Fluoride, diese hemmten zwar das Wachstum von *C. albicans* konnten aber kaum die Virulenzfaktoren und die Adhärenz ändern [18].

Eine Besiedelung mit Hefen im Gastrointestinaltrakt sollte aber auch nicht überbewertet und mit einer Candidainfektion gleichgesetzt werden [55]. Trotzdem kann eine Kolonisation mit Candida bei immunsupprimierten Patienten ernsthafte Probleme bereiten. Gerade bei Patienten mit Malignomen im Kopf-Hals-Bereich unter Bestrahlungstherapie verschlechtern sie die Lebensqualität [58]. Auch bei Leukämiepatienten stellt die Candidabesiedelung einen nicht zu unterschätzenden Risikofaktor dar. Zollner-Schwetz et al. konnten nachweisen, dass von 77 Patienten

48% den gleichen Candida-Gentyp in ihrer Mundhöhle und dem Intestinaltrakt beherbergten [73]. Eine zuverlässige Eliminierung der Hefen aus dem Oropharyngealtrakt stellt sich bei solchen Patienten als schwierig dar, da ihre Compliance aufgrund ständiger Medikation, Magenbeschwerden, Unverträglichkeiten etc. nicht selten abnimmt und auch die antimykotische Therapie häufig auf Dauer versagt [47].

Schon 1979 stellte Rieth die Problematik des Pilznachschubs aus nicht sanierten Gebieten dar und wies darüber hinaus auf einen Zusammenhang von Mykosen in unterschiedlichen anatomischen Regionen hin [43]. Da gerade bei immunsupprimierten Patienten Pilzüberfraktionen zu schwerwiegenden allgemeinmedizinischen Problemen führen können, sollte immer ein Screening auf Candidabesiedelung durchgeführt werden, wozu neben allgemeinmedizinischen auch zahnärztliche Untersuchungen und Kontrollen der Dentalhygiene und des Speichelflusses gehören [13].

Bleibt abschließend zu sagen, dass insbesondere bei immungeschwächten Personen aus zahnärztlicher und auch aus allgemeinmedizinischer Sicht der Prävention einer Candidabesiedelung der Mundhöhle durch die Sanierung dentaler Foki eine zentrale Bedeutung zukommt. Auf diese Weise könnte eine Streuung in den Gastrointestinaltrakt und eine eventuell sich anschließende invasive Candidiasis abgewendet werden.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Häufigkeit der Candidabesiedelung der Mundhöhle und des Magen-Darm-Traktes in Bezug auf die genetische Stammverwandtschaft der Candida-Stämme bei herzgesunden, immunsupprimierten und/oder endokarditisprophylaxepflichtigen Kindern zu untersuchen.

Insgesamt nahmen 103 Patienten der Gießener Universitätskinderklinik im Alter zwischen 2 und 16 Jahren an der Studie teil. Bei den 31 herztransplantierten (Gr.III), 24 herzkranken (Gr.II), 25 tumorkranken (Gr.IV) und 23 Kindern der Vergleichsgruppe (Gr.I) wurden Speichel-, Plaque-, Stuhl- und – wenn vorhanden – auch kariöse Zahnschmelzproben entnommen und auf das Vorhandensein von Candida überprüft.

Bei allen Candida-positiven Isolaten wurde eine Gentyppisierung mit Hilfe der RAPD-PCR durchgeführt, um eine mögliche Stammverwandtschaft der Candidakeime der verschiedenen Körperregionen nachzuweisen.

Bei 41 Kindern (39,8%) wurde in insgesamt 82 Isolaten Candida spezies isoliert, wobei es sich in 30 Fällen um *C. albicans*, in 6 Fällen um *C. dubliniensis* und in je einem Fall um *C. lusitaniae* und *C. glabrata* in Reinkultur handelte. Bei drei weiteren Patienten trat *C. albicans* je einmal in Kombination mit *C. dubliniensis*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* auf.

Bezogen auf *C. albicans* wurde bei 12 Patienten (36,4%) dieser Keim sowohl in Isolaten der Mundhöhle als auch des Stuhls gefunden. Der genetische Vergleich erbrachte in 5 Fällen eine 100%ige Identität, in 3 Fällen ein Cluster ( $\geq 85\%$ ) und in 4 Fällen eine Homologie ( $\geq 70\%$ ). Betroffen im Sinne der Identität waren 3 Kinder der Vergleichsgruppe und 2 Kinder mit Herzerkrankungen (GII). Die Kombination Speichel/Stuhl erwies sich mit 42,8% als am häufigsten identisch.

Bezogen auf *C. dubliniensis* ließ sich dieser Keim bei 3 Patienten in Proben der Mundhöhle und im Stuhl nachweisen. Der genetische Vergleich erbrachte jedoch nur in einem Fall eine Stammverwandtschaft als Cluster ( $\geq 85\%$ ).

Die Ergebnisse der Studie belegen, dass es bei der Besiedelung der Mundhöhle mit *C. albicans* durchaus zu einer deszendierenden Kolonisation identischer Keime in den Magen-Darm-Trakt kommen kann, wobei Kinder mit Herzerkrankungen (GII) und

der Vergleichsgruppe (GI) eher betroffen waren als Kinder nach HTx (GIII) und Tu-Kinder (GIV).

Auch wenn sich nur in wenigen Fällen der vorliegenden Untersuchung genetische Stammverwandtschaften zwischen Candida-Stämmen nachweisen ließen, so bleibt doch außer Zweifel, dass gerade bei diesen Kindern mit schwerwiegenden Allgemeinerkrankungen durch die deszendierende Keimabgabe in den Gastrointestinaltrakt lebensbedrohliche systemische Mykosen entstehen können. Von daher gewinnt die Prävention einer Candidabesiedelung der Mundhöhle durch konsequente Gebissanierung und Kariesvermeidung auf zahnmedizinischer Seite enorm an Bedeutung.

## 7 Summary

The aim of the paper in hand was to investigate the frequency of occurrence of the candida colonization of the oral cavity and the gastro-intestinal tract with reference to clonal counterparts of the Candida strains in children without cardiac defects, in immunosuppressed children and/or in children in need of endocarditis prophylaxis.

A total of 103 patients at the Giessen University pediatric department aged between 2 and 16 years participated in this study. Samples of saliva, dental plaque, stool and – if existing – carious material have been taken from 31 heart transplanted children (Gr.III), 24 children suffering from heart disease (Gr.II), 25 children having a tumor (Gr.IV) and 23 children from the control group (Gr.I). The investigation tried to prove the existence of Candida in these samples.

All Candida positive isolates were genotyped using the RAPD-PCR in order to prove potential clonal counterparts of the Candida germs of the different body regions.

In 41 children (39.8%) Candida species has been isolated in altogether 82 isolates, whereas in 30 cases *C. albicans* has been detected, in 6 cases *C. dubliniensis* and in one case each *C. lusitaniae* and *C. glabrata* in pure culture. In three further patients *C. albicans* was found once each in combination with *C. dubliniensis*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*.

The *C. albicans* germ was found in 12 patients (36.4%) both in isolates of the oral cavity and in stool specimens. In 5 cases the genetic comparison showed a 100% identity, in 3 cases a cluster ( $\geq 85\%$ ) and in 4 cases a homology ( $\geq 70\%$ ). In terms of the identity 3 children from the control group and 2 children suffering from heart disease (GII) were affected. The genetic identity has been proven most frequently in the combination of saliva/stool sample (42.8%).

The *C. dubliniensis* germ has been detected in 3 patients in the samples of the oral cavity and in stool specimen. But only in one case the genetic comparison showed clonal counterparts as clusters ( $\geq 85\%$ ).

The results of this study show that the colonization of the oral cavity with *C. albicans* indeed may lead to a descending colonization of identical germs into the gastro-intestinal tract, whereas children suffering from heart disease (GII) and children from the control group (GI) were affected more frequently than children after HTx (GIII) and children having a tumor (GIV).

Even if the present study could prove genetic clonal counterparts between *Candida* strains in only a few cases, it is beyond any doubt, that especially in children with severe systemic diseases life-threatening systemic mycosis can develop due to descending germs in the gastro-intestinal tract. For this reason the prevention of *Candida* colonizations in the oral cavity through consequent dentition restoration and avoidance of tooth decay will become more important in dentistry.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Alberth, M., Majoros, L., Kovalecz, G., Borbas, E., Szegedi, I., Marton, J., Kiss, C.: Significance of oral *Candida* infections in children with cancer. *Pathol Oncol Res* 12, 237-241 (2006)
2. Arendorf, T. M., Walker, D. M.: The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol* 25, 1-10 (1980)
3. Arslan, S. G., Akpolat, N., Kama, J. D., Ozer, T., Hamamci, O.: One-year follow-up of the effect of fixed orthodontic treatment on colonization by oral *Candida*. *J Oral Pathol Med* 37, 26-29 (2008)
4. Axell, T., Samaranayake, L. P., Reichart, P. A., Olsen, I.: A proposal for reclassification of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 84, 111-112 (1997)
5. Banerjee, S. N., Emori, T. G., Culver, D. H., Gaynes, R. P., Jarvis, W. R., Horan, T., Edwards, J. R., Tolson, J., Henderson, T., Martone, W. J.: Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Med* 91, 86S-89S (1991)
6. Beck-Sague, C., Jarvis, W. R.: Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis* 167, 1247-1251 (1993)
7. Biasoli, M. S., Tosello, M. E., Magaro, H. M.: Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. *Mycoses* 45, 465-469 (2002)
8. Caggiano, G., Iatta, R., Laneve, A., Manca, F., Montagna, M. T.: Observational study on candidaemia at a university hospital in southern Italy from 1998 to 2004. *Mycoses* 51, 123-128 (2008)

9. Cannon, R. D., Chaffin, W. L.: Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 10, 359-383 (1999)
10. Cole, G. T., Halawa, A. A., Anaissie, E. J.: The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. *Clin Infect Dis* 22 Suppl 2, S73-S88 (1996)
11. Colomba, C., Antinori, S.: Fungal infections in transplantation patients. *Recenti Prog Med* 94, 516-528 (2003)
12. Davies, A. N., Brailsford, S., Broadley, K., Beighton, D.: Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. *Oral Microbiol Immunol* 17, 79-84 (2002)
13. Davies, A. N., Brailsford, S. R., Beighton, D., Shorthose, K., Stevens, V. C.: Oral candidosis in community-based patients with advanced cancer. *J Pain Symptom Manage* 35, 508-514 (2008)
14. de Carvalho, F. G., Silva, D. S., Hebling, J., Spolidorio, L. C., Spolidorio, D. M.: Presence of Mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol* 51, 1024-1028 (2006)
15. DeGregorio, M. W., Lee, W. M., Ries, C. A.: *Candida* infections in patients with acute leukemia: ineffectiveness of nystatin prophylaxis and relationship between oropharyngeal and systemic candidiasis. *Cancer* 50, 2780-2784 (1982)
16. Diehl, J. M., Staufenbiehl, T.: Statistik mit SPSS für Windows - Version 15. (2007)
17. Egyed, M., Kollar, B., Karadi, E., Rajnics, P., Kocsondi, L., Rumi, G.: Neutropenia and sepsis in hematologic patients. *Orv Hetil* 147, 2031-2033 (2006)
18. Flisfisch, S., Meyer, J., Meurman, J. H., Waltimo, T.: Effects of fluorides on *Candida albicans*. *Oral Dis* 14, 296-301 (2008)

19. Gonzalez Gravina, H., Gonzalez de Moran, E., Zambrano, O., Lozano Chourio, M., Rodriguez de Valero, S., Robertis, S., Mesa, L.: Oral Candidiasis in children and adolescents with cancer. Identification of *Candida* spp. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 12, E419-E423 (2007)
20. Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S.H.E., Ullmann, U.: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer, Berlin, 5. Auflage (2005)
21. Hellwig, E. Klimek J. Attin T.: *Einführung in die Zahnerhaltung*. Urban & Fischer bei Elsevier, München, 4. Auflage (2007)
22. Hof, H. Dörries R.: *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart, 3. Auflage (2005)
23. Holmberg, K., Feroze, F.: Evaluation of an optimized system for random amplified polymorphic DNA (RAPD)-analysis for genotypic mapping of *Candida albicans* strains. *J Clin Lab Anal* 10, 59-69 (1996)
24. Hossain, H., Ansari, F., Schulz-Weidner, N., Wetzel, W. E., Chakraborty, T., Domann, E.: Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. *Oral Microbiol Immunol* 18, 302-308 (2003)
25. Kaben, U.: Fungal infection. *Chirurg* 69, 530-535 (1998)
26. Kersun, L. S., Reilly, A. F., Ingram, M. E., Nicholaou, M. J., McGowan, K. L.: Antifungal susceptibility against yeasts isolated from pediatric oncology patients. *Med Mycol* 46, 337-343 (2008)
27. Kleinegger, C. L., Lockhart, S. R., Vargas, K., Soll, D. R.: Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. *J Clin Microbiol* 34, 2246-2254 (1996)

28. Köhler, W., Eggers, H.J., Fleischer, B., Marre, R., Pfister, H., Pulverer, G.: Medizinische Mikrobiologie. Urban & Fischer bei Elsevier, München, 8. Auflage (2001)
29. König, K. G.: Karies und Kariesprophylaxe. Goldmann, München (1971)
30. Krcmery, V., Barnes, A. J.: Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 50, 243-260 (2002)
31. Lynch, D.P.: Oral candidiasis. History, classification and clinical presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78, 189-193 (1994)
32. Marol, S., Yucesoy, M.: Molecular epidemiology of Candida species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. *Mycoses* 51, 40-49 (2008)
33. Mavor, A. L., Thewes, S., Hube, B.: Systemic fungal infections caused by Candida species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets* 6, 863-874 (2005)
34. Mendling, W., Pinto De Andrade, M., Gutschmidt, J., Gantenberg, R., Presber, W., Schönian, G.: Strain specificity of yeasts isolated from different locations of women suffering from vaginal candidosis, and their partners. *Mycoses* 43, 387-392 (2000)
35. Mitteilung der Kommission "Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin" des Robert-Koch-Instituts: Pathogenetische Bedeutung der intestinalen Candidabesiedelung. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 47 (6), 587-600(2004)
36. Mühlhardt, C.: Der Experimentator, Molekularbiologie. Elsevier-Spektrum, Heidelberg, 5. Auflage (2006)

37. Müller, H.-J.: PCR Polymerase Kettenreaktion. Methodenbuch. Spektrum, Heidelberg (2001)
38. Nicholl, D. S.: Gentechnische Methoden. Spektrum, Heidelberg 2. Auflage (2002)
39. Nolting, S., Stanescu-Siegmund, A., Schwantes, P. A.: Candida and the gastrointestinal tract. A medical-research evaluation. Fortschr Med 116, 22-28 (1998)
40. Pagano, L., Antinori, A., Ammassari, A., Mele, L., Nosari, A., Melillo, L., Martino, B., Sanguinetti, M., Equitani, F., Nobile, F., Carotenuto, M., Morra, E., Morace, G., Leone, G.: Retrospective study of candidemia in patients with hematological malignancies. Clinical features, risk factors and outcome of 76 episodes. Eur J Haematol 63, 77-85 (1999)
41. Prella, M., Bille, J., Pugnale, M., Duvoisin, B., Cavassini, M., Calandra, T., Marchetti, O.: Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. Diagn Microbiol Infect Dis 51, 95-101 (2005)
42. Redding, S. W., Zellars, R. C., Kirkpatrick, W. R., McAtee, R. K., Caceres, M. A., Fothergill, A. W., Lopez-Ribot, J. L., Bailey, C. W., Rinaldi, M. G., Patterson, T. F.: Epidemiology of oropharyngeal Candida colonization and infection in patients receiving radiation for head and neck cancer. J Clin Microbiol 37, 3896-3900 (1999)
43. Rieth, H.: Mykosen und Antimykotika 1. Pharmazie in unserer Zeit 8,161 (1979)
44. Rosch, W.: Fungi in feces, fungi in the intestines-therapeutic consequences?. Versicherungsmedizin 48, 215-217 (1996)
45. Russell, C., Lay, K. M.: Natural history of Candida species and yeasts in the oral cavities of infants. Arch Oral Biol 18, 957-962 (1973)

46. Samaranayake, L. P.: Oral candidosis: an old disease in new guises. *Dent Update* 17, 36-38 (1990)
47. Samaranayake, L. P.: Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 73, 171-180 (1992)
48. Sanderink, R. B. A., Bernhardt, H., Knoke, M., Meyer, J., Weber, C., Weiger, R.: *Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie*. Quintessenz, Berlin, 1. Auflage (2004)
49. Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S., Fonzi, W. A.: PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol* 15, 601-613 (1995)
50. Schimpf, G.: *Gentechnische Methoden*. Spektrum, Heidelberg, 3. Auflage (2002)
51. Schulz-Weidner, N.: Häufigkeit und PCR-Typisierung von *Candida albicans* aus der Mundhöhle und dem Magen-Darm-Trakt bei Kindern mit naturgesunden und kariösen Gebissen. *Med Diss, Gießen* (2002)
52. Schulz-Weidner, N., Anari, F., Hossain, H., Chakraborty, T., Domann, E., Wetzel, W. E.: Vergleichende PCR-Typisierung von *Candida albicans* aus der Mundhöhle und dem Magen-Darm-Trakt. *Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde* 27, 139-143 (2005)
53. Siah-Benlarbi, R.: Orointestinale und humorale Candidabesiedelung bei herzgesunden, immunsupprimierten und endokarditisprophylaxepflichtigen Kindern. *Med Diss, Gießen* (2008)
54. Siah-Benlarbi, R., Nies, S. M., Sziegoleit, A., Bauer, J., Schranz, D., Wetzel, W. E.: Caries-, *Candida*- and *Candida* antigen/antibody frequency in children after heart transplantation and children with congenital heart disease. *Pediatr Transplant*, published online DOI: 101111/j. 1399-3046.2008.0115 (2008)

55. Stremmel, W.: Pilze im Stuhl - Krankheit oder Mythos? *Med Monatsschr Pharm* 24, 181-185 (2001)
56. Sziegoleit, F., Sziegoleit, A., Wetzel, W. E.: Effect of dental treatment and/or local application of amphotericin B to carious teeth on oral colonization by *Candida*. *Med Mycol* 37, 345-350 (1999)
57. Tekeli, A., Dolapci, I., Cesur, S., Tekeli, E., Icli, F.: *Candida dubliniensis* studies and isolation of *Candida* types in oropharyngeal specimens from oncologic patients. *Mikrobiol Bul* 36, 57-63 (2002)
58. Thaweboon, S., Thaweboon, B., Srithavaj, T., Choonharuangdej, S.: Oral colonization of *Candida* species in patients receiving radiotherapy in the head and neck area. *Quintessence Int* 39, e52-e57 (2008)
59. Ugun-Can, B., Kadir, T., Akyuz, S.: Oral candidal carriage in children with and without dental caries. *Quintessence Int* 38, 45-49 (2007)
60. Uip, D. E., Amato, Neto, V, Varejao Strabelli, T. M., Alcides Bocchi, E., Fiorelli, A., Stolf, N., Bellotti, G., Pileggi, F., Jatene, A. D.: Fungal infections in 100 patients subjected to heart transplantation. *Arq Bras Cardiol* 66, 65-67 (1996)
61. Vincent, J.L.: *Candida* infection in surgical intensive care unit patients. *Surgical Treatment, XVI. Surgical critical care issues*, W. Zuckschwerdt, München (2001)
62. Waltimo, T. M., Dassanayake, R. S., Orstavik, D., Haapasalo, M. P., Samaranayake, L. P.: Phenotypes and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Candida albicans* isolates from root canal infections in a Finnish population. *Oral Microbiol Immunol* 16, 106-112 (2001)
63. Ward, D. B., Fleischer, A. B., Jr., Feldman, S. R., Krowchuk, D. P.: Characterization of diaper dermatitis in the United States. *Arch Pediatr Adolesc Med* 154, 943-946 (2000)

64. Wellmer, A.: Adhesion of clinical *Candida albicans* isolate to buccal epithelial cells. *Mycoses* 42, Suppl 1, 43-47 (1999)
65. Wetzel, W. E., Böhmer, C., Sziegoleit, A.: In-vitro-Karies durch *Candida albicans*. *Acta Med Dent Helv* 2, 308-313 (1997)
66. Wetzel, W. E., Hanisch, S., Sziegoleit, A.: Keimbeseidlung der Mundhöhle bei Kleinkindern mit Nursing-Bottle-Syndrom. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 103 1107-1112 (1993)
67. Wetzel, W. E., Sziegoleit, A.: *Candida* und Karies. Spiegel der Forschung der Justus-Liebig-Universität Gießen 15 (2), 85-90 (1998)
68. Wetzel, W. E., Sziegoleit, A., Weckler, C.: Karies-Candidose im Milchgebiss. *Notabene medici* 10, 845-849 (1984)
69. Wetzel, W.-E., Sziegoleit, A., Weckler, C.: *Candida*-Besiedlung im jugendlichen Kieferknochen mit "Zuckertee-Karies". *Der Kinderarzt* 8, 1203-1206 (1982)
70. Wyne, A. H.: Early childhood caries: nomenclature and case definition. *Community Dent Oral Epidemiol* 27, 313-315 (1999)
71. Xu, J., Boyd, C. M., Livingston, E., Meyer, W., Madden, J. F., Mitchell, T. G.: Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. *J Clin Microbiol* 37, 3835-3843 (1999)
72. Zaremba, M. L., Stokowska, W., Klimiuk, A., Daniluk, T., Rozkiewicz, D., Cylwik-Rokicka, D., Waszkiel, D., Tokajuk, G., Kierklo, A., Abdelrazek, S.: Microorganisms in root carious lesions in adults. *Adv Med Sci* 51 Suppl 1, 237-240 (2006)

- 
73. Zollner-Schwetz, I., Auner, H. W., Paulitsch, A., Buzina, W., Staber, P. B., Ofner-Kopeinig, P., Reisinger, E. C., Olschewski, H., Krause, R.: Oral and intestinal *Candida* colonization in patients undergoing hematopoietic stem-cell transplantation. *J Infect Dis* 198, 150-153 (2008)
74. Zwolinska-Wcislo, M., Budak, A., Bogdal, J., Trojanowska, D., Stachura, J.: Fungal colonization of gastric mucosa and its clinical relevance. *Med Sci Monit* 7, 982-988 (2001)

## **9 Anhang**

### Anlage 1

Befunderhebungsbogen (S. 70 - 75)

### Anlage 2

Zustimmung der Ethikkommission (S. 76 - 77)

### Anlage 3

Einverständniserklärung der Erziehungsberechtigten/Eltern (S. 78)

Projektgruppe  
 Mikrobiologie der Mundhöhle  
 Poliklinik für Kinderzahnheilkunde  
 Direktor: Prof. Dr. W.-E. Wetzel  
 Schlangenzahl 14  
 D-35392 Gießen

## Befunderhebungsbogen

Kennnummer:

Gruppe:

- I: Probanden
- II: Endocarditispflicht
- III: Immunsuppression
- IV: Endocarditispflicht u. Immunsuppression

Geb. datum:

Alter in Monaten:

Geschlecht:  männlich  weiblich

Regelmäßige Konsultationen des Hauszahnarztes?  ja  nein

Untersuchungsdatum:

### 1. Zahnstatus

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
			55	54	53	52	51	61	62	63	64	65			
			85	84	83	82	81	71	72	73	74	75			
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

D/d= kariös,      M/m= fehlt,      F/f= gefüllt,      FV= Fissurenversiegelt      Fi= Fistel      Fe= Fehlstrukturierung

i.D.= im Durchbruch      \* = .....

### 2. DMF/dmf (T/t)- Befunde

DMF- Wert:   
 D- Wert:   
 M- Wert:   
 F- Wert:

dmf- Wert:   
 d- Wert:   
 m- Wert:   
 f- Wert:

DMF/dmf- Gesamtwert:   
 D/d- Gesamtwert:   
 M/m- Gesamtwert:   
 F/f- Gesamtwert:

3. a) Röntgenologische Befunde  ja  nein wenn ja, welche? \_\_\_\_\_

b) Fotos?  ja  nein

Kennnummer:

Geb. datum:

Alter in Monaten:

Geschlecht:  männlich  weiblich

Untersuchungsdatum:

Gruppe:  I: Probanden  
 II: Endokarditpflicht  
 III: Endokarditpflicht  
u. Immunsuppression

#### 4. Mikrobiologische Untersuchung

##### a) Untersuchung des Speichels am:

- Vergrünende Streptokokken  
 nicht hämolysierende Strp.  
 Saprophytäre Neisserien  
 Corynebacterium sp.  
 Sonstige  
 Candida .....

0: keine; 1: einzelne (< 10 KBE);  
2: wenig ( $10 - 10^2$  KBE);  
3: viel ( $10^2 - 10^3$  KBE);  
4: massenhaft ( $\leq 10^3$  KBE)

- Strp. Mutans  
 Lactobazillen

0: keine; 1: wenig (<  $10^5$  KBE/ml Speichel);  
2: viel ( $\geq 10^9$  KBE/ml Speichel)

##### Pufferkapazität: pH-Wert \_\_\_\_\_

- 1: hoch (pH  $\leq 6$ );  
2: mittel (pH 4,5 - 5,5);  
3: niedrig (pH < 4)

##### b) Untersuchung der Plaque am:

- Vergrünende Streptokokken  
 nicht hämolysierende Strp.  
 Saprophytäre Neisserien  
 Corynebacterium sp.  
 Sonstige  
 Candida .....

0: keine; 1: einzelne (< 10 KBE);  
2: wenig ( $10 - 10^2$  KBE);  
3: viel ( $10^2 - 10^3$  KBE);  
4: massenhaft ( $\leq 10^3$  KBE)

##### c) Untersuchung der kariösen Substanz am:

- Vergrünende Streptokokken  
 nicht hämolysierende Strp.  
 Saprophytäre Neisserien  
 Corynebacterium sp.  
 Sonstige  
 Candida .....

0: keine; 1: einzelne (< 10 KBE);  
2: wenig ( $10 - 10^2$  KBE);  
3: viel ( $10^2 - 10^3$  KBE);  
4: massenhaft ( $\leq 10^3$  KBE)

##### d) Untersuchung des Stuhls am:

- Candida .....  
0: keine; 1: einzelne (< 10 KBE);  
2: wenig ( $10 - 10^2$  KBE);  
3: viel ( $10^2 - 10^3$  KBE);  
4: massenhaft ( $\leq 10^3$  KBE)

##### e) Blut erhalten am:

.....  
.....



Kennnummer:  Gruppe:  I: Probanden  
 II: Endocarditispflicht  
 III: Immunsuppression  
 IV: Endocarditispflicht u. Immunsuppression

Geb. datum:

Alter in Monaten:

Geschlecht:  männlich  weiblich

Untersuchungsdatum:

**Allgemeine Anamnese**

**I. Chemotherapie:**

ja  nein

Art der Erkrankung: \_\_\_\_\_

Krankheitsverlauf:  
(Beginn, Behandlung) \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Operationen: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Medikation: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**II. Herzerkrankungen:**

ja  nein

Art der Erkrankung: \_\_\_\_\_

Krankheitsverlauf:  
(Beginn, Behandlung) \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Operationen: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Medikation: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Endocarditisprophylaxe?  ja  nein

**III. Sonstiges:**

ja nein

Stoffwechselkrankheiten:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Erkrankungen des Blutes:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Allergien/ Allergiepaß:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schilddrüsenerkrankungen:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Asthma/ Lungenerkrankungen:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lebererkrankungen/ Hepatitis:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nierenerkrankungen:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Immunschwäche (HIV):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sonstige Erkrankungen (Tbc):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Werden z. Zt. Medikamente genommen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Kennnummer:

Geb. datum:

Alter in Monaten:

Geschlecht:  männlich  weiblich

Untersuchungsdatum:

Gruppe:  I: Probanden  
 II: Endokarditispflicht  
 III: Endokarditispflicht u. Immunsuppression

### 6. Familiäre Anamnese

Besteht eine genetische/ familiäre Prädisposition?

---



---

### ≥. Spezielle Anamnese

a) Liegen periapikale Entzündungen/ Fisteln/ Abszesse vor? ja  nein

Region \_\_\_\_\_

b) Liegen Mund-Schleimhaut- Erkrankungen/ Besonderheiten vor? ja  nein

Region \_\_\_\_\_

Falls ja, welche (Leukoplakie, Lichen, Herpes, Xerostomie, Soor, Gingivahyperplasie):

---



---

c) Liegen Magen-/Darmprobleme bzw. Erkrankungen vor? ja  nein

Falls ja, welche (Magenschmerzen, Obstipation/ Diarrhoe,...):

---



---

d) Stuhlgang: Regelmäßigkeit, Konsistenz, Blut....?

---



---

Kennnummer:   
 Geb. datum:     
 Alter in Monaten:   
 Geschlecht:  männlich  weiblich  
 Untersuchungsdatum:

Gruppe:  I: Probanden  
 II: Endokarditispflicht  
 III: Endokarditispflicht u. Immunsuppression

### 8. Kariogene Ernährungseinflüsse

Stillen bis: .....

Saugerflasche von: ..... bis:.....

Inhalt: .....

Schnabelflasche von: ..... bis: ..... tagsüber  nachts

Sport-Ventilflasche von: ..... bis: ..... tagsüber  nachts

Inhalt: .....

Frühstück: .....

Mittags:.....

Zwischendurch: .....

Abends:.....

Getränke: .....

Süßigkeiten: .....

### Fluoridierung

Rachitis-/Kariesprophylaxe: ..... von: ..... bis: .....

Fluorid-Tabletten: ..... von: ..... bis: .....

fluoridiertes Speisesalz: ja  nein

### Mundhygiene

Zahnpflege: ..... mal täglich

geputzt wird von: Eltern  Kind

Derzeitiger Pflegezustand:

gut   
 mittel   
 schlecht

JUSTUS-LIEBIG-

UNIVERSITÄT  
GIESSEN

FACHBEREICH 11



Medizin

Ethik-Kommission, Gaffkyst. 11c, D-35385 Gießen

Frau  
Dr. F. Ansari / Dr. Schulz-Weidner  
Poliklinik für Kinderzahnheilkunde  
Zentrum für ZMK  
Schlangenzahl 14

35385 Gießen

**ETHIK-KOMMISSION  
am Fachbereich Medizin**

**Vorsitz: Prof.Dr.Drs. h.c. K. Federtin**  
Gaffkyst. 11c  
D-35385 Gießen  
Tel.: (0641)99-47660/42470

Gießen, den 14. September 2004  
Az.: Prof.Fed./Erb

**Unser Zeichen: 130/04  
Sitzung am: 02.09.2004**

**Titel:** *Orointestinale und humorale Candidabesiedelung bei gesunden, immunsupprimierten und endokarditisprophylaxepflichtigen Kindern.*

Es handelt sich um eine Erstbegutachtung für den Leiter der Klinischen Prüfung (LKP)

Es handelt sich um eine Anschlussbegutachtung

Eingesandte Unterlagen:

- Formalisierter Antrag
- Ausführliche Darstellung des Vorhabens
- Patienten/Probanden/Eltern-Information
- Einwilligungserklärung der Patienten/
- Abteilungsleiter-Haftpflicht-Versicherung

Der Antrag wurde unter ethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und rechtlichen Gesichtspunkten geprüft. Soweit betreffend, wurde **das auf Seite 2 wiedergegebene Protokoll** unter Berücksichtigung des Good Clinical Practice for Trials on Medicinal Products in the European Community (ICH-GCP) erstellt. Es bezieht sich auf die vorgelegte Fassung des Antrags.

Forderungen der Ethik-Kommission, soweit darin aufgeführt, wurden inzwischen erfüllt.

Sie stimmt dem Vorhaben zu.

Sie stimmt dem Vorhaben unter Auflagen zu (siehe S. 2).

Sie stimmt dem Vorhaben nicht zu (siehe S. 2).

Die Ethik-Kommission erwartet, daß ihr bis 26.12.04 ohne Aufforderung ein kurzer Bericht auf beigefügtem (roten) Formblatt übermittelt wird. Er soll mitteilen, ob das Ziel der Studie erreicht wurde, ob ethische, medizinisch-wissenschaftliche oder rechtliche Probleme aufgetreten sind, und ob das Ergebnis publiziert ist/wird. Unabhängig davon ist die Ethik-Kommission über alle Änderungen des Prüfplans zu unterrichten. Ihr sind alle schweren unerwünschten Wirkungen mitzuteilen, soweit sie im Bereich der Zuständigkeit dieser Ethik-Kommission aufgetreten sind. Bei überregionalen Studien sind sie auch dem LKP mitzuteilen.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethik-Kommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Seite 2

Auszug aus dem Protokoll der Kommissionsitzung vom 22.07.2004:

Frau Dr. Ansari trägt das Vorhaben vor. Es handelt sich um eine unizentrische Studie in Gießen, die gemeinsam mit der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie durchgeführt werden soll. Es soll die Frage beantwortet werden, ob sich das Keimspektrum des Oro-Intestinaltraktes allgemein gesundheitlich reduzierter Kinder von dem gesunder Jungen und Mädchen unterscheidet. Ferner soll geprüft werden, ob auch bei Kindern mit problematischen Allgemeinerkrankungen eine Stammverwandtschaft zwischen dem Candida-Keim der Mundhöhle und des Magen-Darm-Traktes besteht. Weiterhin soll untersucht werden, ob bei gesunden und gesundheitlich reduzierten Kindern Hefen in Blutproben nachzuweisen sind und ob eine Candida-Besiedelung der Mundhöhle bei Kindern mit schwerwiegenden Allgemeinerkrankungen häufiger mit Symptomen einer Soor-Erkrankung und/oder anderen oralen Entzündungssymptomen begleitet wird. Die Studie soll bei 4 Gruppen von je 20 Kindern vorgenommen werden: Gruppe 1 = gesunde Probanden, d.h. Kinder die ausschließlich aus zahnmedizinischen Gründen die Zahnklinik aufgesucht haben, 2. Kinder mit Herzerkrankungen aus dem Kinderherzzentrum des Klinikums Gießen, die Endokarditisprophylaxe betreiben müssen, 3. Immunsupprimierte Kinder (Krebserkrankungen unter Chemotherapie, Station Piper der Kinderklinik), 4. Herztransplantierte Kinder mit Immunsuppression und Endokarditisprophylaxe. Die Belastungen bestehen in Blutentnahmen (pädiatrische Routinediagnostik, keine Extramaßnahme) und in Röntgendiagnostik zum Ausschluss dentogener Osteolyseprozesse im Kieferkochen (keine Extramaßnahme). Die Fahrten zum Untersuchungsort und Termin gehören zur klinischen Diagnostik. Nach eingehender Diskussion stimmt die Kommission dem Vorhaben zu.

(Ende)



(Prof. Dr. Drs. h.c. K. Federlin)

Die Namen der bei dieser Sitzung anwesenden Mitglieder sind durch Unterstreichung hervorgehoben.  
**Mitglieder:** Frau Dr. Blütters-Sawatzki (Pädiatrie); Dr. Bödeker (Informatik); Prof. Breithaupt (Klinische Pharmakologie); Herr Brumhard (Pharmazie); Prof. Federlin, Vorsitzender (Innere Medizin); Prof. Schapp (Bürgerliches Recht); Prof. Schmidt (Pharmakologie); Prof. Schwemmlé, stv. Vorsitzender (Chirurgie); Prof. Weiler (Rechtsmedizin).  
**Vertreter:** Prof. Dudeck (Informatik); Dr. Gödicke (Bürgerliches Recht); Frau Prof. Kemkes-Matthes (Innere Medizin); Frau Kreckel (Pharmazie); Prof. Künzel (Gynäkologie); Prof. Lasch (Innere Medizin); PD Dr. Repp (Pharmakologie); PD Dr. Rißg (Rechtsmedizin).

---

**Projektgruppe Mikrobiologie der Mundhöhle**

Poliklinik für Kinderzahnheilkunde

Direktor: Prof. Dr. W.-E. Wetzel

Schlangenzahl 14

D-35392 Gießen

Telefon: 0641/99-46241

Telefax: 0641/99-46239

---

**Einverständniserklärung**Name:..... Vorname:.....  
Geburtsdatum:.....

Ich bin mit der zahnärztlichen Untersuchung und der Abstrichabnahme bei meinem Kind einverstanden. Der zusätzlichen Untersuchung der Blut- und Stuhlprobe auf einen möglichen Candidabefall stimme ich zu.

In einem Merkblatt wurde ich über die Untersuchungen der Studie aufgeklärt. Ich konnte Fragen stellen. Sie wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet. Ich habe keine weiteren Fragen. Eine Kopie des Merkblattes habe ich erhalten.

Ich bin darüber informiert worden, dass meine persönlichen Daten den Bestimmungen des Datenschutzgesetzes unterliegen. Ich stimme ihrer Veröffentlichung unter der Voraussetzung zu, dass jeder Bezug zu meiner Person unkenntlich gemacht wird.

**Mit der Teilnahme an der klinischen Studie bin ich einverstanden.**

**Mein Einverständnis umfasst auch die beschriebene Verwendung meiner personenbezogenen Daten, insbesondere die Erhebung und Verarbeitung von Angaben über meine Gesundheit.**

.....  
(Ort, Datum).....  
(Unterschrift Patient/in/ Erziehungsberechtigte/r)

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**

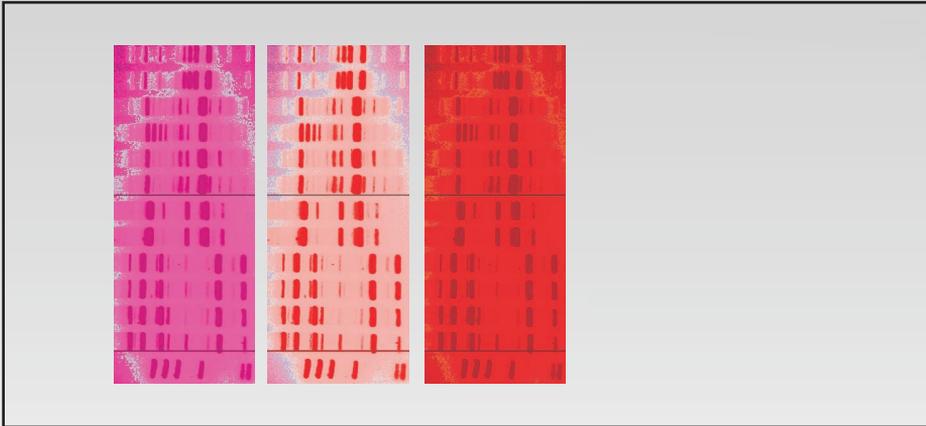
### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei:

- Herrn Professor Dr. W.-E. Wetzel für die Überlassung des Themas sowie die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit,
- dem Institut für medizinische Mikrobiologie am Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Gießen, für die gute Zusammenarbeit, besonders Herrn Prof. Dr. E. Domann, Herrn Dr. C. Imirzalioglu, Frau M. Klös, Frau I. Trur, Frau A. Amend-Förster und Frau K. Bommersheim,
- dem Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen für Erstellung und Verdeutlichung der statistischen Auswertung, insbesondere Herrn W. Papst,
- den Mitarbeitern der Poliklinik für Kinderzahnheilkunde Frau Dr. F. Ansari, Frau Dr. N. Schulz-Weidner, Frau Dr. R. Siahi-Benlarbi, Frau Dr. S. Nies, Frau Dr. V. Knapp und Frau Heidmann (MTA).

Nicht zuletzt möchte ich mich noch ganz speziell bei meinen Eltern, meiner Tochter Ina-Sophie, Christian und meinen Freunden bedanken, die während dieser Zeit zu mir gestanden und mich bestärkt haben.

Schließlich gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. P. Richterich für seine stets aufgebrachte Geduld und dafür, dass ich mir in jeder Situation seiner Unterstützung gewiss sein konnte.



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 978-3-8359-5520-2



9 783835 955202