

2. Patienten und Methoden

2.1 Patienten

Für die vorliegende Studie wurden folgende vier Patientengruppen rekrutiert:

1. 20 HIV-seropositive Patienten der HIV/AIDS-Tagesklinik der Charité Campus Virchow-Klinikum mit LGE
2. 20 HIV-seropositive Patienten der HIV/AIDS-Tagesklinik der Charité Campus Virchow-Klinikum ohne Parodontalerkrankungen/LGE
3. 20 HIV-seronegative Patienten des Zentrums für Zahnmedizin Charité Campus Virchow-Klinikum mit Gingivitis
4. 20 HIV-seronegative Patienten des Zentrums für Zahnmedizin Charité Campus Virchow-Klinikum ohne Gingivitis

2.2 Patienten-Basisdaten

In Gruppe 1 und 2 wurden folgende Daten erhoben:

- CDC-Klassifikation (Tab. 2, Tab. 3)
- HIV-Status (CD4-Zellen, Viruslast)
- Basisdaten
 - Alter
 - Geschlecht
 - Medikation
 - Plaque-Index nach Silness und Løe (1996) (Tab. 4)

In Gruppe 3 und 4 wurden folgende Basisdaten erhoben

- Alter
- Geschlecht
- Plaque-Index nach Silness und Løe

In den HIV-seropositiven Gruppen wurde das Stadium der HIV-Infektion nach der CDC-Klassifikation eingeteilt, die von den US-amerikanischen CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (1993) erstellt wurde. Die Einteilung basiert auf drei verschiedenen Kategorien, die sich aus dem klinischen Bild ergeben (A-C) (Tab.2) und der Einteilung der CD4+-T-Lymphozytenzahl (Normalwert $950 \pm 250/\text{ml}$) (Tab.3).

Tab. 2: Einteilung nach klinischem Bild

Kategorie	Beschreibung
A	Asymptomatische HIV-Infektion; persistierende generalisierte Lymphadenopathie; akute HIV-Infektion
B	Krankheitssymptome oder Erkrankungen, die nicht in die Kategorie C fallen, dennoch aber der HIV-Infektion ursächlich zuzuordnen sind oder auf eine Störung der zellulären Immunabwehr hinweisen
C	AIDS-definierende Erkrankungen

Tab. 3: Revidierte CDC-Klassifikation von 1993 für Erwachsene

CD4+-Zellzahl	Kategorie A	Kategorie B	Kategorie C
≥ 500	A1	B1	C1
200 - 499	A2	B2	C2
< 200	A3	B3	C3

Der Plaque-Index nach Silness und Loe (1996) ist ein Maß für die Plaque im Zahnhalsbereich unter Berücksichtigung des Sulkus, der Zahnoberfläche und des Gingivarandes. Es werden vier Schweregrade unterschieden (Tab. 4).

Tab. 4: Plaque-Index nach Silness und L e (1996)

Einteilung	Beschreibung
Grad 0	Keine Plaque durch Inspektion und Sondierung zu erkennen
Grad 1	Nicht sichtbarer dünner Plaquefilm, der nur durch Abschaben mit der Sonde zu erkennen ist
Grad 2	Mäßige Plaqueablagerung, die mit bloßem Auge zu erkennen ist; die Plaque f�llt den Interdentalraum nicht aus
Grad 3	Dicke Plaqueablagerung, die den Interdentalraum ausf�llt

Abgrenzend zu dem Plaque-Index nach Silness und L e (1996) kann die objektive Erfassung der Mundgesundheit in epidemiologischen Studien ebenfalls mit Hilfe diverser anderer Indizes erfolgen, wie z. B. dem modifizierten Plaque-Index nach Quigley und Hein (1962), dem modifizierten Approximalraum-Plaque-Index (API) nach Lange et al. (1977) oder dem Plaquebildungsindex (Plaque-Formations-Rate-Index PFRI) nach Axelsson (1991).

In dieser Studie wurde zur besseren Vergleichbarkeit mit ähnlichen zur Thematik vorliegenden Veröffentlichungen der Plaque-Index nach Silness und L e gewählt.

2.3 Entnahme der Sulkusfl ssigkeit

Es wurden je drei Papierspitzen in den Sulkus zweier Zähne eingebracht. Es handelte sich nach Möglichkeit um Prämolaren oder, falls nicht vorhanden, um Eckzähne. Die Papierspitzen wurden in Sabouraud-Lösung eingelegt. Diese setzt sich wie folgt zusammen: Fleischpepton: 5,0 g/l, Caseinpepton: 5,0 g/l, Glucose:20,0 g/l, Chloramphenicol: 50 mg/l, Gentamycin: 0,1 g und Agar:20,0 g/l. Die Kombination zweier Peptone stellt eine optimale Kohlenstoff- und Stickstoffquelle für die Mikroorganismen dar. Der hohe Glucosegehalt und der niedrige pH-Wert von $5,6 \pm 0,2$ fördern das Wachstum, die Bildung der Sporen (Konidien, Sporangien) und die Pigmentbildung der Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilze und hemmen das Wachstum der Begleitflora.

Alle Proben wurden unmittelbar anschließend im Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité Campus Virchow-Klinikum (Leiter: Prof. Dr. U. Göbel) kultiviert.

2.4 Mundspülung

Zur quantitativen mykologischen Untersuchung spülte jeder Patient 60 sec mit 10 ml steriler, phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS, 0,1 M, pH 7,2). Alle Proben wurden unmittelbar anschließend im Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité Campus Virchow-Klinikum (Leiter: Prof. Dr. U. Göbel) kultiviert.

Die hier angewandte Methodik beschrieben erstmals Mc Kendrick, Wilson und Main (1967); 1986 wurde diese Technik durch Samaranayake modifiziert (Samaranayake 1986).

2.5 Anlegen der *Candida*-Kulturen

Jede Mundspülung wurde 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 1 ml PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde anschließend aliquotiert (0,1 ml) und zum einen direkt auf eine Sabouraud-Agar-Platte (Oxoid Ltd., Hampshire, Großbritannien) aufgetragen und zum anderen in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 ausgestrichen und 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

2.6 Mykologische Auswertung: Quantifikation und Spezifizierung

Nach 24 Stunden wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten bestimmt und auf jeweils 1 ml umgerechnet (cfu/ ml). Die Spezifizierung der Hefen erfolgte durch Reisextrakt-Agar und den Kohlenhydratfermentationstest.

Reisextrakt-Agar:

Reisextrakt-Agar (Fa. Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland) ist ein Testnährboden zur Differenzierung von Hefen anhand der für sie typischen

Chlamydosporen. Die Differenzierung gelingt insbesondere für *Candida albicans* und *Candida stellatoidea*, aber auch andere *Candida*-Arten sind anhand mikromorphologischer Kriterien auf dem Reisextrakt-Agar differenzierbar.

Als einzige Nährgrundlage enthält der Nährboden Reisextrakt. Die Nährstoffarmut in Verbindung mit der unter dem Deckglas herrschenden Sauerstoffarmut schafft ein Mangelmilieu, welches bei einigen Hefen die Bildung spezifischer morphologischer Formen, insbesondere von Chlamydosporen und Pseudomyzelien, induziert.

Hierzu wird aus einer Vorkultur von *Candida*-verdächtigen Kolonien mit der Öse sehr wenig Material entnommen und auf der Oberfläche von Reisextrakt-Agar dünn ausgestrichen. Die Ausstrichfläche wird mit sterilen Deckgläsern abgedeckt. Bei massivem Befall mit *Candida* kann das Untersuchungsmaterial auch direkt auf den Reisextrakt-Agar ausgestrichen werden. Die Bebrütung dauert bis zu 4 Tage, bei ca. 22 °C. Die Auswertung erfolgt unter dem Mikroskop durch Direktbeobachtung des bewachsenen Nährbodens durch die Deckgläschen hindurch (Merck 2003).

Kohlenhydratfermentationstest:

Der Kohlenhydratfermentationstest zur Identifizierung von *Candida*-Spezies beruht auf der unterschiedlichen Assimilation bzw. Fermentation von Kohlenhydratsubstraten. Die Assimilation ist die Fähigkeit eines Organismus (nachgewiesen durch Wachstum), bestimmte Komponenten als einzige Energiequelle für sein Wachstum in Anwesenheit von Sauerstoff zu nutzen. Fermentation ist die Fähigkeit eines Organismus, definierte Komponenten in Abwesenheit von Sauerstoff mit dem Ziel der Energiegewinnung zu verwerten (durch Gasbildung und pH-Veränderung nachgewiesen).

Es wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung der Kohlenhydrataufnahmemuster entwickelt. Eine Methode ist die auxonographische Methode nach Roberts (1976):

Eine Suspension der zu testenden Hefe wird vorbereitet. Mit einer keimfreien Transferpipette wird die Oberfläche der Hefe-Stickstoff-Basis-Agar-Platte, die Bromcreosol-Purpur enthält, mit einer Suspension von Hefezellen überschwemmt. Das überschüssige Inokulum wird mit der Transferpipette entfernt; der Deckel ist linksseitig für 10-15 Minuten angelehnt, um die Trocknung der Oberfläche zu ermöglichen.

Filterpapierscheiben mit einer Stärke von 6 mm oder 13 mm werden mit den passenden Kohlenhydraten durchdrungen und auf der Agaroberfläche etwa 30 mm voneinander entfernt verteilt.

Die Platten werden vorsichtig an die Oberfläche des Nährbodens angedrückt. Die Kulturen werden für 24-48 Stunden bei 30° C bebrütet und in Bezug auf den Kohlenhydratverbrauch ausgelesen.

Eine Farbänderung nach Gelb um die Kohlenhydrat enthaltende Platte oder ein Wachstum zeigen Kohlenhydratverbrauch an.

Die am häufigsten verwendeten Kohlenhydrate für das Testen von hyphen- und pseudohyphen-produzierenden Hefen sind: Dextrose, Maltose, Sucrose, Lactose und Raffinose. Für das Testen von nichthyphen-produzierenden Hefen werden folgende Substanzen verwendet: Dextrose, Maltose, Sucrose, Laktose, Galaktose, Trehalose, Inositol und Melibiose. Das Kohlenhydrataufnahmeprofil kann nun mit einer Referenztabelle verglichen werden, um die *Candida*-Art zu bestimmen.

Für vorliegende Untersuchungen wurde von allen Hefen, die in einer Anzahl von über 10 isoliert werden konnten, Subkulturen angelegt, um die Spezies zu bestimmen.

Die Durchführung der Typisierung und Asservation der Pilzkulturen erfolgte durch Dr. R.A. Schiller, Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité Campus Virchow-Klinikum (Leiter: Prof. Dr. U. Göbel).

2.7 Statistik

Die Dateneingabe erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel. Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm SAS Version 8.2 WIN berechnet.

Die deskriptive Beschreibung der Daten erfolgte mit absoluter und relativer Häufigkeit bei kategoriellen Daten, mit Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Median-Wert und Maximum bei stetigen Variablen. Die graphische Darstellung erfolgte als Histogramm.

Mögliche Unterschiede in den vier Patientengruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test überprüft. Als graphische Darstellung der Keimmenge wurde der Box-Whiskas-Plot gewählt.