

N. Schulz-Weidner<sup>1</sup>, F. Ansari<sup>1</sup>, H. Hossain<sup>2</sup>,  
T. Chakraborty<sup>2</sup>, E. Domann<sup>2</sup>, W.-E. Wetzel<sup>1</sup>

# Vergleichende PCR-Typisierung von *Candida albicans* aus der Mundhöhle und dem Magen-Darm-Trakt

**Ziel der Studie war es, bei Kindern mit kariösen Gebissen und gleichzeitiger Candidabesiedelung der Mundhöhle und des Magen-Darm-Traktes eine mögliche Stammverwandtschaft der isolierten Hefen zu überprüfen. Zunächst erfolgte bei 32 Kindern die qualitative und quantitative Bestimmung der Candidabesiedelung von Speichel, Plaque, kariöser Substanz und Stuhl. Schließlich wurde das Verwandtschaftsverhältnis der Pilzstämme aus den verschiedenen Biotopen bei 23 Jungen und Mädchen nach DNA-Extraktion mit Hilfe der „Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)“ untersucht. Innerhalb der Mundhöhle wies die kariöse Substanz in 96,8 % eine Durchsetzung mit *Candida* auf, die Plaque in 71,8 % und der Speichel in 62,5 %. Die Rubrik „massenhaft“ ließ sich in 37,5 % in der kariösen Substanz nachweisen. Die PCR-Typisierung der Candidaisolate aus Mundhöhle und Stuhl ergab in 65,2 % der Fälle eine genetische Stammverwandtschaft, in 21,8 % eine Homologie und in 13 % keine genetische Identität. Die Ergebnisse belegen, dass insbesondere die kariöse Kavität als Ausgangspunkt einer deszendierenden Kolonisation der Candidakeime in den Magen-Darm-Trakt angesehen werden muss.**

**Schlüsselwörter:** *Candida albicans*, PCR-Typisierung, deszendierende Kolonisation, genetische Stammverwandtschaft

## 1 Einleitung und Problemstellung

Vorausgegangene Untersuchungen haben bereits eine positive Korrelation zwischen einer Candidabesiedelung der Mundhöhle und Kariesbefall der Zähne belegt [1, 8, 14]. Dabei war das Vorkommen von *C. albicans* in der kariös erweichten Zahnschmelze am größten. Immerhin wiesen hier 81 % der Probanden *Candida* auf [1], woraus sich schließen lässt, dass die kariöse Kavität in der Mundhöhle das bevorzugte Biotop darstellt. Des Weiteren ließ sich auch ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Candidabesiedelung der Mundhöhle und des Magen-Darm-Traktes belegen [12, 15, 17]. Es stellte sich somit die Vermutung, dass ausgehend von der kariösen Kavität eine Streuung von *Candida* in den Magen-Darm-Trakt erfolgt. *Candida albicans* könnte dann bei entsprechender Disposition (z.B. Allgemeinerkrankungen, Immunsuppression) zu weiteren Komplikationen führen. Ziel der Studie war es insofern nachzuweisen, ob und wie häufig eine Stammverwandtschaft der *Candida*-Arten aus der Mundhöhle und dem Magen-Darm-Trakt besteht.

## 2 Material und Methode

### 2.1 Probanden und Patienten

Bei 56 Kindern (23 Mädchen/33 Jungen) im Alter zwischen drei und acht Jahren wurde die Candidabesiedelung der Mundhöhle (Speichel, Plaque, kariöse Substanz) und des Magen-Darm-Traktes (Stuhl) ermittelt. In den Fällen, in denen die DNA-Extraktion der Hefen bei gleichzeitiger Besiedelung der Mundhöhle und des Stuhls gelang, erfolgte der weiterführende Stammverwandtschaftsnachweis.

### 2.2 Keimbestimmungen

Zur Testung der Candidabesiedelung des Speichels wurden 200 µl nichtstimulierter Speichel mittels Pipette entnommen und danach je 100 µl auf Sabouraudagar (Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland) und Chromagar (Chromagar, Paris, Frankreich) angezüchtet. Plaqueproben wurden von kariösfreien Zahnoberflächen und die kariöse Substanz aus erkrankten Arealen der Zähne mit Hilfe eines sterilen Löffelkavators entnommen. Jeweils 0,03 mg wurden anschließend in Tris-Borat-EDTA-Puffer verdünnt und davon 100 µl ebenfalls auf Sabouraud- und Chromagar gebracht. Die Stuhlproben wurden durch die Eltern der Kinder in dafür vorgesehenen Stuhlröhrchen eingesandt. 200 mg des Stuhls wurden mit 200 µl Emulgator (1 x PBS (Phosphat Buffer Saline) + 0,1 % Tween 20) versehen und homogenisiert. Vom Überstand der Lösung wurden 100 µl auf Sabouraudagar ausgestrichen. Die Petrischalen wurden bei 37°C bebrütet und nach 24 und 48 Stunden beurteilt. Die Differenzierung der *Candida*-Arten wurde zunächst mit dem Keimschlauchttest und darüber hinaus über das Auxacolor-Test System (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, Frankreich) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die semiquantitative Bestimmung erfolgte in den Keimzahlklassen: 0: keine, 1: einzelne (< 10 koloniebildende Einheiten (KBE)), 2: wenig (10 – 10<sup>2</sup> KBE), 3: viel (10<sup>2</sup> – 10<sup>3</sup> KBE) und 4: massenhaft (> 10<sup>3</sup> KBE).

### 2.3 PCR-Typisierung

Die DNA der Isolate von *C. albicans* aus Speichel, Plaque, kariöser Substanz und Stuhl wurde mittels der QIAamp-Extraktion mit Hilfe des DNA Mini Kits (Qiagen, Hil-

<sup>1</sup> Poliklinik für Kinderzahnheilkunde, Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Schlängenzahl 14, 35392 Giessen  
<sup>2</sup> Medizinische Mikrobiologie, Frankfurter Strasse 107, 35392 Giessen

Patient	<i>Candida albicans</i> (Keimzahlklassen)			
	Speichel (A)	Plaque (B)	Kariöse Substanz (C)	Stuhl (D)
1	0	3	3	3
2	0	0	2	2
3	0	0	3	1
4	3	1	4	2
5	0	1	0	2
6	2	0	3	3
7	0	0	3	2
8	1	3	4	3
9	0	1	3	2
10	0	2	4	3
11	1	2	4	2
12	0	0	2	1
13	2	1	4	1
14	0	2	3	1
15	1	3	4	3
16	0	2	3	1
17	2	3	4	2
18	2	4	4	1
19	1	1	2	3
20	1	0	3	1
21	1	0	3	4
22	0	0	3	1
23	1	1	1	2
24	1	1	2	3
25	2	3	3	2
26	2	1	4	2
27	1	1	4	2
28	0	0	3	2
29	2	2	3	3
30	1	1	3	2
31	1	3	4	2
32	4	4	4	2

**Tabelle 1** Candidabesiedelung der Mundhöhle und des Stuhls der Patienten.  
**Table 1** *Candida* colonization in patients of the oral cavity and feces.

den/Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert [7]. Die Genotypisierung der *Candida*-isolate aus der Mundhöhle und dem Stuhl erfolgte mit Hilfe der „Randomly amplified polymorphic DNA“ (RAPD) unter Verwendung der „RAPD analysis beads“ [5]. Dabei wurden 5 µl des DNA-Extraktes, 25 pmol des jeweils verwendeten Primers 1,2 oder 5 und Aqua dest. mit den „RAPD analysis beads“ in einem Gesamtvolumen von 25 µl vermischt und mit Mineralöl überschichtet. Die Amplifizierung erfolgte auf einem Hybaid Express mit Tube-control (PCR-Express/Hybaid Limited, Ashford Middlesex/UK). Die Detektion der spezifischen PCR-Produkte ließ sich durch Gelelektrophorese bei Zimmertemperatur auf einem 2%igen Agarosegel in TBE-Laufpuffer für 2 ½ Stunden bei 150 V und der Anfärbung mit Sybr-Gold (Molecular Probes/Mo Bi Tec, Göttingen/Germany) nachweisen.

Je nach Candidabefall der Patienten wurden die Isolate aus der Mundhöhle (Speichel und/oder Plaque und/oder kariöse Substanz) mit denen aus dem Stuhl verglichen. Dabei wurden die Proben der jeweiligen Patienten in der Reihenfolge, Speichel, Plaque, kariöse Substanz und Stuhl (soweit verfügbar) nebeneinander aufgetragen. Eine Fotografie des Gels im TIFF-Format dokumentierte dann die experimentellen Ergebnisse.

#### 2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der PCR-Typisierung erfolgte mittels Cluster-Analyse mit dem Programm Gel Compare, Version 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) [10]. Dabei wurden die DICE-Indices nach der „unweighted pair group method analysis (UPGMA)“ statistisch ausgewertet. Der SAB-Wert betrug bei identischen genetischen Profilen 1 (genetische Identität = 100 %) und lag bei homologen genetischen Profilen zwischen 0,7 und 1 und im Falle einer fehlenden genetischen Stammverwandtschaft unter 0,7.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Mikrobiologische Befunde

Bei allen diagnostizierten Hefen handelte es sich um *Candida albicans*. Von den insgesamt 56 untersuchten Kindern wiesen 32 eine gleichzeitige Candidabesiedelung

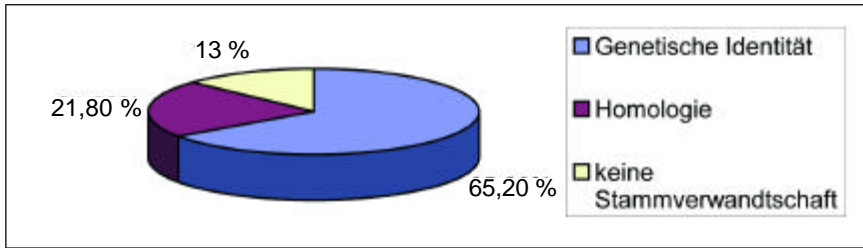


Abbildung 1 Verwandtschaftsverhältnis der isolierten Mundhöhlen- und Stuhlisolate.  
Figure 1 Genetic relatedness of the isolates of the oral cavity and feces.

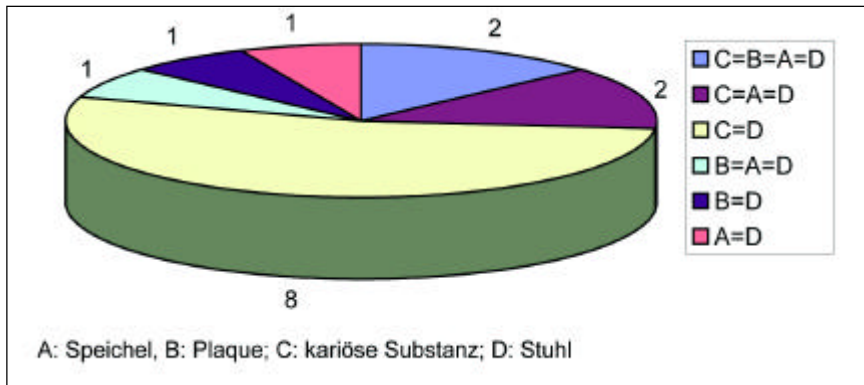
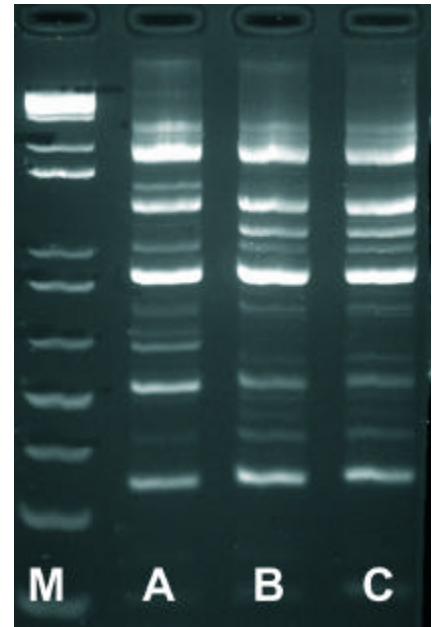
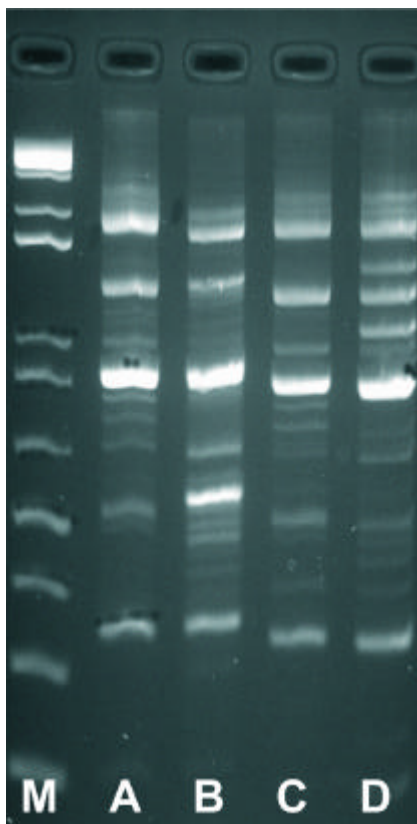


Abbildung 3 RAPD- Auswertung der isolierten Stämme.  
Figure 3 RAPD-analysis of the isolates.



M: Marker, A: Speichel, B: Plaque  
C: kariöse Substanz

Abbildung 2 RAPD Profil von *Candida albicans* aus der Mundhöhle; Patient 17 (Primer 1).  
Figure 2 RAPD profile of *Candida albicans* of the oral cavity; patient 17 (primer 1).



M: Marker, A: Speichel, B: Plaque  
C: kariöse Substanz, D: Stuhl

Abbildung 4 RAPD Profil von *Candida albicans* von Speichel, Plaque, kariöser Substanz und Stuhl; Patient 4 (Primer 1).  
Figure 4 RAPD profile of *Candida albicans* of isolates of the oral cavity and feces; patient 4 (primer 1).

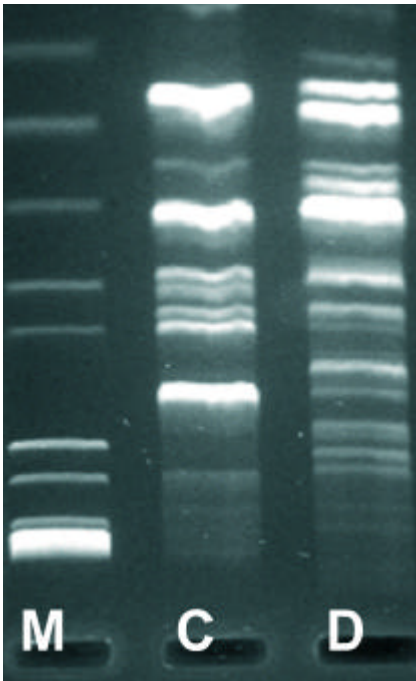
der Mundhöhle und des Magen-Darm-Traktes auf. Tabelle 1 zeigt die semiquantitativen Keimzahlen von *C. albicans* im Speichel, der Plaque, der kariösen Substanz und dem Stuhl dieser Kinder.

Bei Betrachtung der Candidabesiedelung in der Mundhöhle waren in 17 Fällen (53,1 %) alle drei Isolate (Speichel, Plaque und kariöse Substanz), in acht Fällen (25 %) zwei Isolate (6 x kariöse Substanz und Plaque und 2 x Speichel und kariöse Substanz) und in sechs Fällen (21,9 %) ein Isolat (5 x kariöse Substanz, 1 x Plaque) betroffen. Dabei wies die kariöse Substanz in 31 Fällen (96,8 %), die Plaque in 23 Fällen (71,8 %) und der Speichel in 20 Fällen (62,5 %) eine Durchsetzung mit *Candida* auf, wobei die Bewertung „massenhaft“ am häufigsten für die kariöse Substanz vorlag.

### 3.2 PCR-Typisierung

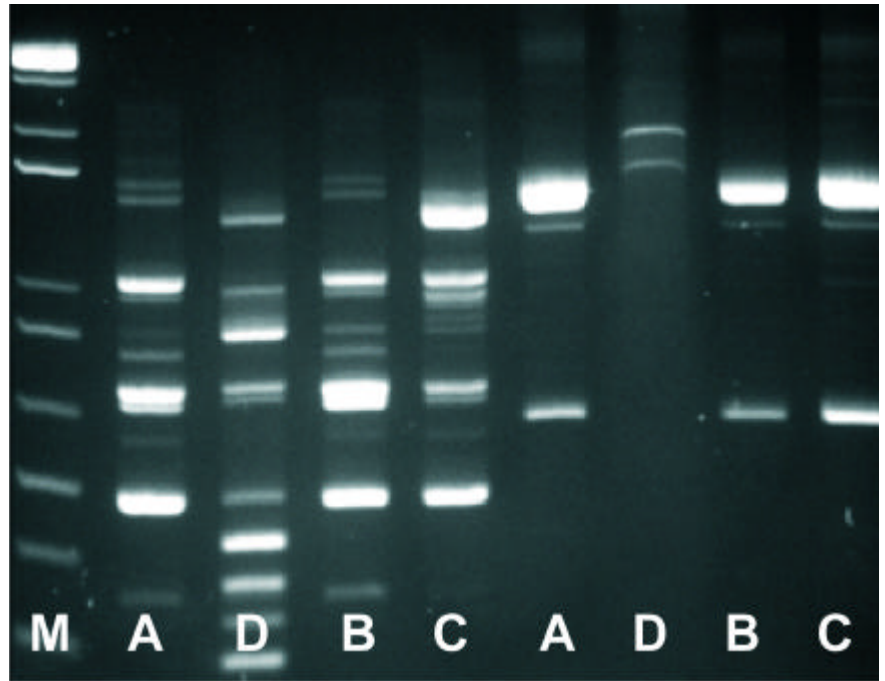
Die weiterführende DNA-Extraktion ergab in 23 Fällen die Möglichkeit einer vergleichenden Genomdiagnostik. Die RAPD-Analyse zeigte, dass die Isolate mit *Candida albicans* aus den verschiedenen Biotopen in 15 Fällen (65,2 %) identisch waren. In fünf Fällen (21,8 %) bestand eine Homologie und in drei Fällen (13 %) keine genetische Identität (Abb. 1). Für die

Mundhöhle zeigten sich in allen Fällen, bei denen mehrere Proben vorlagen (Speichel und/oder Plaque und/oder kariöse Substanz), identische genetische Profile. Abbildung 2 zeigt diesbezüglich ein RAPD-Profil von *Candida albicans* aus der Mundhöhle des Patienten Nr. 17. Bei den 15 Patienten, bei denen eine genetische Identität der Isolate von *C. albicans* aus der Mundhöhle und des Magen-Darm-Traktes aufgezeigt werden konnte, stellte sich in acht Fällen (53,3 %) eine Stammverwandtschaft der Isolate aus der kariösen Substanz und des Stuhls heraus. Bei zwei der Kinder (13,3 %) bestand eine Identität der Isolate aus dem Speichel, der Plaque, der kariösen Substanz und des Stuhls. Des Weiteren waren die Isolate von *C. albicans* aus der Plaque und aus dem Stuhl eines Patienten (6,7 %), sowie aus der Speichel- und Stuhlprobe eines anderen Patienten (6,7 %) identisch. Darüber hinaus korrelierten die Isolate von Speichel, Plaque und Stuhl und von Speichel, kariöser Substanz und Stuhl bei zwei weiteren Patienten (13,3 %) (Abb. 3). Abbildung 4 zeigt beispielhaft Patient Nr. 4, bei dem eine Stammverwandtschaft der *Candida*-Isolate aus der Mundhöhle und des Magen-Darm-Traktes nachgewiesen werden konnte. Die Homologie, die sich bei den fünf Patienten mit einem SAB von 74,8 bis 88,2 %



**M: Marker, C: kariöse Substanz, D: Stuhl**

**Abbildung 5** RAPD Profil von *Candida albicans* der kariösen Substanz und dem Stuhl; Patient 10 (Primer 1).  
**Figure 5** RAPD profile of *Candida albicans* of carious material and feces; patient 10 (primer 1).



**M: Marker, A: Speichel, B: Plaque, C: kariöse Substanz, D: Stuhl**

**Abbildung 6** RAPD Profil von *Candida albicans* aus der Mundhöhle und dem Stuhl; Patient 23 (Primer 1).  
**Figure 6** RAPD profile of *Candida albicans* of the oral cavity and feces, patient 23 (primer 1).

ergab, sei beispielhaft am Patient Nr. 10 dargestellt (Abb. 5). Abbildung 6 verdeutlicht anhand eines RAPD-Profiles von Abstrichen aus der Mundhöhle (Speichel, Plaque und kariöse Substanz) und des Stuhls einerseits die bereits erwähnte genetische Identität der Mundhöhlenabstriche, andererseits aber auch die Möglichkeit des fehlenden Verwandtschaftsverhältnisses der Mundhöhlen- zu den Stuhlisolaten.

#### 4 Diskussion

Mit der vorliegenden Untersuchung sollte eine mögliche Stammverwandtschaft von *Candida albicans* aus der Mundhöhle und dem Stuhl bei Patienten mit kariösen Gebissen nachgewiesen werden. Dabei lag die Hypothese zugrunde, dass es sich bei der Magen-Darm-Kolonisation von *Candida albicans* um eine deszendierende Kolonisation von der Mundhöhle über den Ösophagus in den Magen-Darm-Trakt handelt. Hier käme die kariöse Kavität, die in vorausgegangenen Untersuchungen als bevorzugtes Biotop für Sprosspilze bestätigt wurde, als Ausgangspunkt für deszendierende Candidakolonisation

und auch als Quelle für Mykosen in Frage.

Die Genotypisierung erfolgte mit der „Randomly amplified polymorphic DNA“ (RAPD), die bereits mehrfach als eine geeignete Methode für die Überprüfung von Stammverwandtschaften eingesetzt wurde [2, 16]. Bei der Überprüfung der oralen und fäkalen Candidaisolate konnten wir in 65,2 % eine genetische Identität von *Candida albicans* aus den Mundhöhlen- und Stuhlproben nachweisen. Als bevorzugtes Biotop für *Candida albicans* in der Mundhöhle konnte dabei in 96,8 % die kariöse Kavität herausgestellt werden. Dabei war die semiquantitative Keimzahlklasse „massenhaft“ am häufigsten für die kariöse Kavität zu finden. Dies weist darauf hin, dass ausgehend von den kariösen Kavitäten offensichtlich eine sekundäre Weiterleitung und Verteilung von *Candida albicans* zunächst in den Speichel und dann durch Verschlucken in den Magen-Darm-Trakt erfolgt. Hier scheint dann eine Kolonisation stattzufinden. Dieser reine Nachweis von Hefen im Gastro-Intestinaltrakt sollte allerdings zunächst noch nicht überbewertet werden [13]. Unzweifelhaft können jedoch Hefen bei HIV-Patienten oder anderen immunsupprimierten Patienten zu ernsteren Problemen führen [4]. Die orale

Candidose stellt dabei bei Krebspatienten ein großes klinisches Problem dar [3, 9], vor allem in Phasen der notwendigen Bestrahlungstherapie [6]. Des Weiteren leiden immungeschwächte Jungen und Mädchen gehäuft an rezidivierenden *Candida*-Infektionen des Oro-Intestinal-Traktes [11]. Zur längerfristigen Eliminierung von *Candida* aus der Mundhöhle – und hier vor allem aus der Tiefe der kariösen Zahnläsionen – reicht eine alleinige antimykotische Therapie nicht aus [14], wenn kariöse Kavitäten nicht kurativ versorgt werden. So sollte mehr auf die Eliminierung von kariösen Kavitäten entweder durch zahnerhaltende Füllungstherapie oder durch Extraktion nicht erhaltungswürdiger Zähne geachtet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die kariöse Kavität nicht nur als Ausgangspunkt für Candidosen des Oropharyngealtraktes sondern auch als Reservoir für deszendierende Kolonisationen des Magen-Darm-Traktes anzusehen ist. Insofern sollte der Sanierung dentaler Foki zur Vermeidung eines möglichen Candidabefalls, insbesondere bei immungeschwächten Patienten, aus allgemeinmedizinischer Sicht und auch aus zahnärztlicher Sicht eine besondere Bedeutung zukommen.

**SUMMARY****PCR-typing of *Candida albicans* of the oral cavity and the gastrointestinal tract**

The aim of the study was to investigate clonality of *Candida albicans* in patients with simultaneous colonisation of the oral cavity and the gastro-intestinal tract. Firstly in 32 children the samples of carious material, dental plaque, saliva and feces were microbiologically analysed to determine qualitative and quantitative *Candida* colonisation. After DNA-extraction, isolates of the different anatomical sites of 23 patients were subjected to RAPD to investigate clonality. In the oral cavity, *Candida* was found in 96.8 % of the carious material, in 71.8 % of the dental plaque and in 62.5 % of saliva specimens. The highest level of *Candida* was detected in 31.7 % of the carious material. Clonal counterparts in both oral and stool samples were found in 65.2 %, 21.8 % harboured closely related clonal pairs and the isolates of 13 % were not related. The results confirm the carious teeth as an ecological niche for *Candida albicans* potentially responsible for descending colonisation in the gastro-intestinal-tract.

**Key words:** *Candida albicans*, PCR-typing, descending colonisation, clonal identity

**Literatur**

1. Ansari F, Behrendt A, Münch T, Sziegoleit A, Wetzel WE: Candidabesiedelung der Zahnplaque bei Kindern mit kariösen und naturgesunden Gebissen. *Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkd* 26, 51-54 (2004)
2. Clemons KV, Feroze F, Holmberg K, Stevens DA: Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods: *J Clin Microbiol* 35, 1332-1336 (1997)
3. Davies AN, Brailsford S, Broadley K, Beighton D: Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. *Oral Microbiol Immunol* 7, 79-84 (2002)
4. Garber G: An overview of fungal infections. *Drugs* 61 Suppl 1, 1-12 (2001)
5. Hossain H, Ansari F, Schulz-Weidner N, Wetzel WE, 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)
6. Leung KW, Dassanayake RS, Joyce YY, Jian Jin Li, Cheong Yam W, Samaranyake LP: Oral colonisation, phenotypic and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. *J Clin Microbiol* 38, 2219-2226 (2000)
7. Martin C, Roberts D, von der Weide M: Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 38, 3735-3742 (2000)
8. Moalic E, Gestalin A, Quinio D, Gest PE, Zerilli A, Le Flohic AM: The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. *Caries Res* 35, 149-155 (2001)
9. Redding SW, Zellars RC, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Caceres MA, Sedgley CM, Samaranyake LP, Chan JCY, Wie SHY: A 4-year longitudinal study of the oral prevalence of enteric gram-negative rods and yeasts in Chinese children. *Oral Microbiol Immunol* 12, 183-188 (1997)
10. Rementeria A, Gallego L, Quindos G, Garaizar J: Comparative evaluation of three commercial software packages for analyses of DNA polymorphism patterns. *Clin Microbiol Infect* 7, 331-336 (2001)
11. Samaranyake LP: Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 73, 171-180 (1992)
12. Sandven P, Giercksky KE: Yeast colonisation in surgical patients with intraabdominal perforations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20, 475 (2001)
13. Seebacher C: Mycophobia – a new disease? *Mycoses* 39, 130 (1996)
14. Sziegoleit F, Sziegoleit A, Wetzel WE: 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)
15. Sziegoleit F, Weidner N, Sziegoleit A, Wetzel WE: Candidabesiedelung der Mundhöhle und des Magen-Darm-Traktes. *Dtsch Zahnärztl Z* 57, 349-352 (2002)
16. Waltimo TMT, Dassanayake RS, Orstavik D, Haapasalo MPP, Samaranyake LP: 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)
17. Weig M, Werner E, Frosch M, Kasper H: Limited effect of refined carbohydrate dietary supplementation on colonisation of the gastrointestinal tract of healthy subjects by *Candida albicans*. *Am J Clin Nutr* 69, 1170 (1999)

**Korrespondenzadresse:**

**Dr. Nelly Schulz-Weidner**  
 Poliklinik für Kinderzahnheilkunde  
 Zentrum für ZMK  
 Schlangenzahl 14  
 35392 Gießen  
 Tel.: +49-641-9946241  
 Fax: +49-641-9946239  
 E-Mail: Nelly.Schulz-Weidner@dentist.med.uni-giessen.de