Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik und Werkstoffkunde
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. H. von Schwanewede)
der
Klinik und Polikliniken für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. habil. H. von Schwanewede)
und
der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. E. C. Reisinger)
der
Klinik für Innere Medizin
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. habil. R. Schmidt)
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Die Prävalenz von *Pneumocystis jirovecii* bei zahnärztlichem Personal und zahnärztlichen Patienten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin
(Dr. med. dent.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Kathrin Dargatz
geboren am 29.10.1967 in Schönebeck/Elbe
Rostock, 2007

Dekan: Prof. Dr. med. habil. E. C. Reisinger

urn:nbn:de:gbv:28-diss2008-0010-6

1. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Heinrich von Schwanewede
Klinik und Polikliniken für Zahn-, Mund- u. Kieferheilkunde
Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr.- Ing. Günther Kundt
Institut für Medizinische Informatik und Biometrie
Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Lutz Gürtler
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Universität Greifswald

Inhalt

1	Zielstellung	3
2	Hypothesen	5
3	Einleitung und Literaturübersicht	7
3.1	Lebenszyklus von *Pneumocystis jirovecii*	7
3.2	Die *Pneumocystis* Pneumonie (PCP)	9
3.2.1	Symptome der PCP	10
3.2.2	Diagnostik der PCP	10
3.2.2.1	Grocott Färbung	12
3.2.2.2	Giemsa Färbung	12
3.2.2.3	Direkter Fluoreszenztest (DFT)	13
3.2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	13
3.2.3	Therapie der PCP	15
3.2.4	Prophylaxe der PCP	17
4	Probanden, Material und Methoden	18
4.1	Probanden	18
4.2	Untersuchungsmaterial	19
4.3	Geräte	21
4.4	Software	22
4.5	Chemikalien	23
4.6	Puffer und Gebrauchslösungen	23
5	Diagnostische Methoden	25
5.1	Aufbereitung von induziertem Sputum	25
5.2	DNA-Isolierung in den aufbereiteten Proben	25
5.3	Polymerase-Kettenreaktion	26
5.4	„Nested“- PCR	28
5.5	Durchführung der mtLSU rRNA Gen nested PCR	29
5.6	Gel-Elektrophorese	31
5.7	Aufreinigung der PCR-Amplifikate und Sequenzierung	32
5.8	Positivkontrolle der PCR	33
5.9	Negativkontrolle der PCR	33
5.10	Statistische Methoden	33
6	Ergebnisse	36

6.1 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Gruppenzugehörigkeit“ 41
6.2 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Nikotinkonsum“ 42
6.3 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Alkohol“ 44
6.4 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Tierkontakt“ 45
6.5 Besiedelung mit *P. jirovecii* und alle Einflussfaktoren 47
6.5.1 Besiedelung mit *P. jirovecii* und alle Einflussfaktoren für die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter 47
6.5.2 Besiedelung mit *P. jirovecii* und alle Einflussfaktoren für die Gruppe der zahnärztlichen Patienten 48
6.5.3 Besiedelung mit *P. jirovecii* und alle Einflussfaktoren für die Gruppe der gesunden Probanden aus der Reise- und Impfambulanz 49
6.5.4 Besiedelung mit *P. jirovecii* und alle Einflussfaktoren für die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter, die Gruppe der zahnärztlichen Patienten und die Gruppe der Probanden aus der Reise- und Impfambulanz 50
7 Diskussion 52
7.1 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Gruppenzugehörigkeit“ 52
7.2 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Nikotinkonsum“ 55
7.3 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Alkohol“ 56
7.4 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Tierkontakt“ 57
7.5 Besiedelung mit *P. jirovecii* und die Einflussfaktoren „Handschuhe“ und „Mundschutz“ 59
8 Abkürzungsverzeichnis 62
9 Abbildungsverzeichnis 64
10 Tabellenverzeichnis 65
11 Literaturverzeichnis 67
Thesen
Anhang
Eigenständigkeitserklärung
Lebenslauf
Danksagungen

1 Zielstellung

Pneumocystis jirovecii (P. jirovecii) ist ein Pilz, der ubiquitär vorkommt. Sowohl Gesunde als auch immunsupprimierte Personen können mit *P. jirovecii* besiedelt sein. *P. jirovecii* kann bei Immunsupprimierten eine *Pneumocystis* Pneumonie (PCP) verursachen (Morris et al., 2004b), selten auch Infektionen anderer Organe wie z.B. Milz oder Darm (Ng, Yajko & Hadley, 1997; Raviglione, 1990). Die Übertragung von *P. jirovecii* erfolgt durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion. Ziel dieser Studie ist es, zu untersuchen, ob zahnärztliches Personal im Vergleich zu zahnärztlichen Patienten vermehrt mit *P. jirovecii* besiedelt ist. Dabei wurde auch evaluiert, inwieweit das Tragen von Mundschutz und Handschuhen in einer Zahnarztpraxis sowie Tierkontakte, Nikotin- und Alkoholkonsum eine Besiedelung mit *P. jirovecii* beeinflussen.

Für die Untersuchungen auf *P. jirovecii* Besiedelung wurden die Probanden gebeten, induziertes Sputum abzugeben. Aus diesem Sputum wurde anschließend die DNA isoliert und mittels einer *P. jirovecii* spezifischen, geschachtelten Polymerase-Kettenreaktion (nested PCR, nPCR), wurde versucht, *P. jirovecii* DNA nachzuweisen.

Untersucht wurden zwei Gruppen von Probanden:

Gruppe 1: Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter (Zahnarzthelferinnen)
Gruppe 2: zahnärztliche Patienten.

Bei beiden Gruppen handelte es sich um gesunde Probanden, die nicht immunsupprimiert und nicht an einer *Pneumocystis* Pneumonie (PCP) erkrankt waren.

In einer eigenen, vorab durchgeführten Pilotstudie bei Zahnärzten und Zahnarzthelferinnen, waren 12 von 24 (50%) der untersuchten Probanden mit *P. jirovecii* besiedelt.

In einer ebenfalls vorab durchgeführten Studie wurden 119 Sputumproben von Probanden aus der Reise- und Impfambulanz der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock auf ihre Besiedelung mit *P. jirovecii* untersucht (Hörning, 2005). Dabei handelte es sich ebenfalls um immungesunde, nicht an einer PCP erkrankte Personen. In dieser Gruppe waren 3 von 119 Probanden (2,5%) besiedelt. Die Ergebnisse dieser Gruppe dienten als historische Vergleichsdaten bezogen auf die gewonnenen Daten aus der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter und der Gruppe der zahnärztlichen Patienten.

Auf der Basis der hohen Besiedelungsrate von 50% bei den Zahnärzten und Zahnarzthelferinnen der Pilotstudie, verglichen mit 2,5% bei gesunden Probanden aus der Reise- und Impfambulanz, lag es nahe, eine erhöhte Prävalenz der Besiedelung mit *P. jirovecii* von Zahnärzten und Zahnarzthelferinnen anzunehmen. Allerdings stammen die Zahlen dieses historischen Vergleichs aus unterschiedlichen Studien und können somit nicht als Beweis dienen. Um diesen Beweis zu erbringen, wurde die vorliegende Studie durchgeführt. Die Zahlen des obengenannten historischen Vergleichs bildeten die Grundlage für die statistische Berechnung der erforderlichen Gruppengröße.

Eine erhöhte Prävalenz von *P. jirovecii* bei Zahnärzten und zahnärztlichen Mitarbeitern dürfte auf die enge räumliche Nähe von Zahnärzten und Patienten und die vermehrte Aerosolbildung bei einer zahnärztlichen Behandlung zurückzuführen sein. Dadurch könnte bei einer zahnärztlichen Behandlung gerade für immunsupprimierte Patienten und auch für Zahnärzte und Zahnarzthelferinnen eine besondere Gefährdung bestehen, sich mit *P. jirovecii* zu infizieren. Dies würde wiederum die Dringlichkeit der Einhaltung von Hygienemaßnahmen, insbesondere das Tragen von Mundschutz und Handschuhen zum Schutz der Patienten und des behandelnden medizinischen Personals, unterstreichen.

2 Hypothesen

1) Die vorliegende Arbeit soll nachweisen, ob und in welchem Maße Zahnärzte und deren Mitarbeiter in zahnärztlichen Praxen im Vergleich zu zahnärztlichen Patienten bzw. zur gesunden Bevölkerung mit *P. jirovecii* besiedelt sind.

2) Aufgrund der engen räumlichen Nähe zwischen Patient und Behandler liegt die Vermutung nahe, dass der aerogen durch Tröpfcheninfektion oder durch Schmierinfektion übertragene Krankheitserreger der PCP bei Mitarbeitern einer Zahnarztpraxis häufiger nachzuweisen ist.

3) Eine erhöhte Prävalenz von *P. jirovecii* bei zahnärztlichem Personal könnte auf die besondere Gefährdung von immunsupprimierten Patienten bei einer zahnärztlichen Behandlung deuten, sich mit *P. jirovecii* zu infizieren. Dies würde die Dringlichkeit von Hygienemaßnahmen unterstreichen, insbesondere das Tragen von Mundschutz und Handschuhen zum Schutz der Patienten.

4) Ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit ist es, herauszufinden, ob Einflussfaktoren die Besiedelung mit *P. jirovecii* begünstigen. Zu den hier betrachteten Einflussfaktoren gehören Rauchen, Alkohol, Tierkontakte und das Tragen von Mundschutz und Handschuhen bei den Zahnärzten und zahnärztlichen Mitarbeitern.

5) Es konnte gezeigt werden, dass Rauchen bei Immunsupprimierten das Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii* und das Risiko der Erkrankung an einer *Pneumocystis*-Pneumonie erhöht (Miguez-Burbano et al., 2005; Morris et al., 2004a). Die eigenen Untersuchungen sollen zeigen, ob bei immungesunden Probanden Rauchen ebenfalls einen Einfluss auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* hat.

6) Die erhöhte Prävalenz der Besiedelung mit *P. jirovecii* bei Patienten mit chronischem Alkoholabusus im Vergleich zu immungesunden Probanden konnte durch eine Studie der Abteilung für Tropenmedizin und

Infektionskrankheiten der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock nachgewiesen werden (Hörning, 2005). Die vorliegende Arbeit soll der Fragestellung nachgehen, ob bereits mäßiger Alkoholkonsum bei immungesunden Probanden einen Einfluss auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* hat.

7) *Pneumocystis* konnte bei vielen Säugetieren und auch bei Vögeln in seiner spezies-spezifischen Form nachgewiesen werden. Diese Studie untersucht, ob der Kontakt der immungesunden Probanden zu Haus- und Nutztieren das Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii* erhöht.

8) Bezogen auf die Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter, soll die vorliegende Studie Erkenntnisse darüber geben, ob das Tragen von Mundschutz und Handschuhen bei der zahnärztlichen Behandlung einen Einfluss auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* hat.

3 Einleitung und Literaturübersicht

3.1 Lebenszyklus von *Pneumocystis jirovecii*

Pneumocystis wurde 1909 von Carlos Chagas und Antonio Carini erstmals beschrieben (Chagas, 1909) und wird seit 1912 als *Pneumocystis carinii (P. carinii)* bezeichnet. Der Erreger wurde zunächst auf Grund seines morphologischen Erscheinungsbildes als Protozoon klassifiziert.

1983 wurde *P. carinii* den Schlauchpilzen (Ascomycota) zugeordnet. Die humanpathogene Form wurde schließlich nach ihrem Entdecker, dem tschechischen Forscher Otto Jirovec (1907-1972), im Jahre 2002 von *P. carinii* in *Pneumocystis jirovecii (P. jirovecii)* umbenannt (Stringer et al., 2002). Unterschiedliche Protein- und genetische Muster und die Ergebnisse von Sequenzanalysen bewiesen eine ausgeprägte Wirtsspezifität der isolierten Erreger. Bisher wurde davon ausgegangen, dass *P. carinii* nur bei Säugetieren in seiner speziesspezifischen Form zu finden ist. Neuere Untersuchungen bei Hühnern zeigten, dass der Erreger auch bei Vögeln und damit auch außerhalb der Säugetiere vorkommt (Riebold, 2007).

Mögliche Infektionsquellen für den Menschen sind Personen, die an einer *Pneumocystis* Pneumonie (PCP) erkrankt sind, oder Personen, die mit *P. jirovecii* besiedelt sind. Haus-, Zoo- und Nutztiere konnten bisher als Infektionsquellen für den Menschen nicht nachgewiesen werden.

Die Übertragung erfolgt aerogen über kontaminierte Tröpfchen und Staub und durch Schmierinfektion (Chabe et al., 2004; Roblot, 2005). Die Besiedelung mit *Pneumocystis* species und auch die Erkrankung durch *Pneumocystis* sind bei Mensch und Tier hauptsächlich auf die Lunge begrenzt. Personen mit einem geschwächten Immunsystem, selten auch Immungesunde, können durch *P. jirovecii* an einer *Pneumocystis* Pneumonie erkranken. Beim Menschen sind etwa 100 Fälle von extrapulmonaler *P. jirovecii* Infektion in der Literatur beschrieben worden (Ng et al., 1997). Gelangen die 8 bis 12 µm großen Zysten durch Einatmung in die Lunge, heften sie sich an die Alveolarzellen an (Abb. 1). In den Zysten entwickeln

sich je 8 amöboid bewegliche, 2 bis 4 µm große Trophozoiten (asexuelle Phase), die nach kurzer Zeit die Zyste sprengen. Zwei dieser Trophozoiten können zu einer Zygote fusionieren (sexuelle Phase) und sich zu einer neuen Zyste entwickeln, in der wieder 8 neue Sporozoiten entstehen.

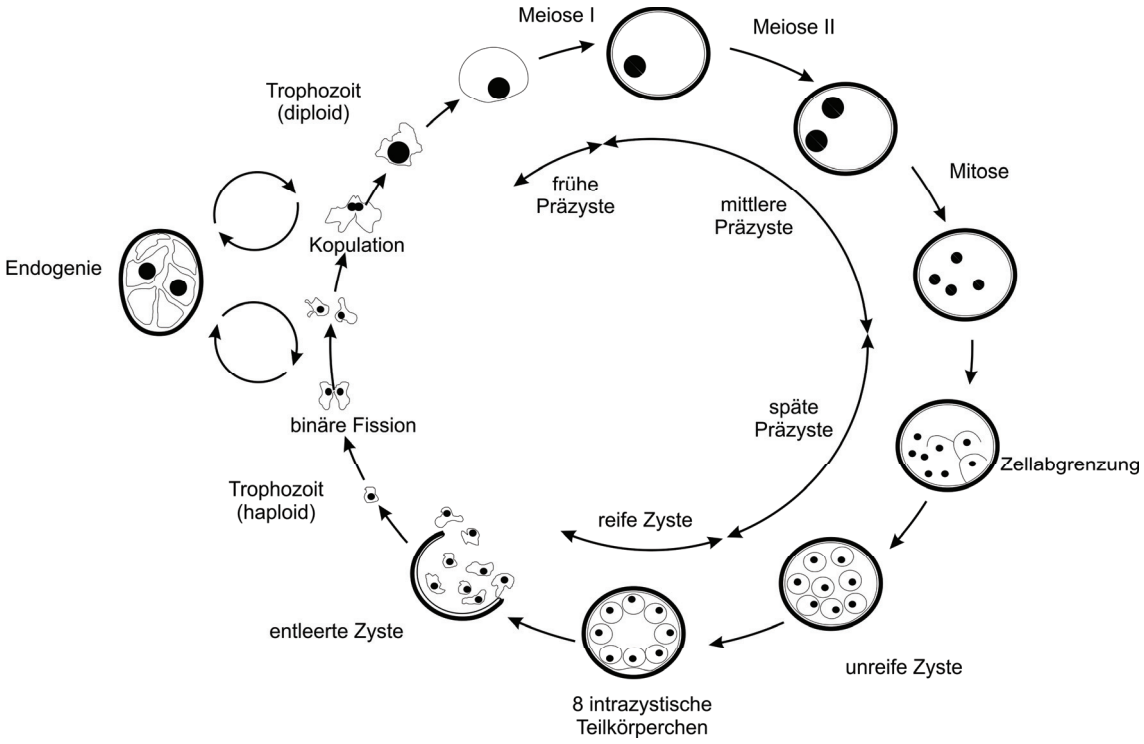


Abb. 1. *Pneumocystis sp.* Lebenszyklus (nach Matsumoto und Yoshida)

In seltenen Fällen kann *P. jirovecii* aus der Lunge auf dem Blutweg oder auch direkt z.B. durch die Eustachische Röhre in andere Organe streuen und dort zu Infektionen führen. Extrapulmonale Infektionen sind z.B. im Gehörgang, in der Milz, im Darm und in anderen Organen beschrieben worden (Ng et al., 1997).

3.2 Die *Pneumocystis* Pneumonie (PCP)

Die durch den opportunistischen Erreger *P. jirovecii* hervorgerufene, interstitielle Lungenentzündung, wird als *Pneumocystis* Pneumonie (PCP) bezeichnet. Voraussetzung für die Entwicklung einer *Pneumocystis* Pneumonie ist eine Schwäche der zellulären Immunität. Dies ist insbesondere bei HIV-Infektionen, Immunsuppressionen nach Organtransplantationen, Chemotherapien bei Tumorerkrankungen, Leukämien, chronischen Infektionen, chronischen Mangelernährungen, hochdosierter Kortisontherapie und auch bei Frühgeborenen der Fall. Bei Ausbruch der Erkrankung kommt es zu einer raschen Vermehrung des Erregers in den Alveolen der Lunge, bis diese vollständig mit Erregermaterial und Flüssigkeit gefüllt sind. Der Gasaustausch in der Lunge wird herabgesetzt.

Die Infektion mit HIV-1 oder HIV-2 führt nach unterschiedlich langer Zeitspanne (unbehandelt nach ca. 4 bis 10 Jahren) zu einer zellulären Immunschwäche mit schweren opportunistischen Infektionen und Tumoren (Hoffmann, 2003). Dieses Endstadium wird als Acquired Immunodeficiency Syndrom (AIDS) bezeichnet. Im Infektionsverlauf kommt es zu einer Verminderung der CD4 Zellen (T-Helferzellen) im peripheren Blut. Sinkt ihre Zahl unter 200 Zellen/µl (Hoffmann, 2003), so steigt das Risiko von Infektionen durch opportunistische Erreger (z.B. *P. jirovecii, Toxoplasma gondii*) und Erkrankungen durch Tumoren deutlich an (Koletar et al., 2001; Sowden & Carmichael, 2004).

In den Anfangsjahren der HIV-Pandemie verstarb ein Großteil der Patienten an der durch *Pneumocystis* verursachten interstitiellen Pneumonie. Die Anzahl der Neuerkrankungen ist durch die hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) und durch die Primärprophylaxe mit Co-trimoxazol bei CD4-Zellzahlen unter 200 Zellen/µl deutlich zurückgegangen (Lopez Bernaldo de Quiros et al., 2001). Die *Pneumocystis* Pneumonie ist dennoch bis heute die häufigste Erstmanifestation von AIDS mit einer 10%igen Letalität (Stellbrink & Pramod, 2005). Die *Pneumocystis* Pneumonie ist mit 17,3% (Serraino et al., 2003) bzw. 23,3% (Gayet-Ageron et al., 2004), nach wie vor die häufigste opportunistische Infektion bei AIDS-Patienten in Westeuropa.

3.2.1 Symptome der PCP

Zu Beginn äußert sich die Erkrankung durch eine Belastungsdyspnoe, die zunächst nur bei schwerer Anstrengung auftritt. Die Dyspnoe geht einher mit einem trockenen Husten ohne Auswurf und Fieber. Im weiteren Verlauf der PCP können Gewichtsverlust, Müdigkeit, Abgeschlagenheit und ein Leistungsknick auftreten. Bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem besteht oft ein deutlicher Mundsoor. Wenn der Gasaustausch in der Lunge schlechter wird, kommt es zur Tachypnoe und zur Zyanose der Haut und der Schleimhäute. Die Atemfrequenz ist gesteigert, atemabhängige Schmerzen im Brustbereich sind möglich. In weiterer Folge kann ein akutes Lungenversagen auftreten (Hanano & Kaufmann, 1998). Eine seltene Komplikation ist die Entwicklung eines Pneumothorax. Selten streut der Erreger auch in andere Organe (Ohren, Schilddrüse, Lymphknoten, Leber, Milz, Darm, Nieren, Knochenmark, Nervensystem) und führt dort zu organspezifischen Symptomen (Ng et al., 1997). Unbehandelt endet die PCP meist letal (Atzori et al., 1999; Benfield et al., 2001).

3.2.2 Diagnostik der PCP

Bei bekannter Immunsuppression legen die genannten Symptome den Verdacht auf eine PCP nahe. Perkussion und Auskultation der Lunge ergeben zu Beginn oft noch keine pathologischen Befunde. Das Röntgenbild zeigt zunächst nur wenig ausgeprägte Veränderungen in den mittleren und basalen Lungenabschnitten. Die röntgenologischen Veränderungen imponieren als retikulär gezeichnete Infiltrate im Sinne einer interstitiellen Pneumonie. Es findet sich oft in beiden Lungenflügeln eine charakteristische, schmetterlingsförmige Zeichnungsvermehrung. Bei Fortschreiten der Entzündung stellt sich die Lunge zunehmend milchig weiß verschattet dar (Hoffmann, 2003). Zystische Veränderungen sind ebenfalls beschrieben worden (Fatkenheuer et al., 1997). Auch im Computertomogramm (CT) findet man typischerweise retikuläre Infiltrate. Im CT sind die unscharfen diffusen Veränderungen häufig besser zu erkennen. Bei einer PCP ist das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) erhöht. Beim Vollbild AIDS liegt die Zahl der CD4-

Helferzellen oft unter 200 Zellen/µl. Die PCP definiert bei HIV-Positiven das Vollbild AIDS.

Die Blutgasanalyse gibt Auskunft darüber, inwieweit die Sauerstoffsättigung des Blutes durch die gestörte Lungenfunktion beeinträchtigt ist. Bei einer leichten PCP liegt der Sauerstoffpartialdruck bei 8,1 bis 11 kPa. Sinkt der Sauerstoffpartialdruck unter 8 kPa, spricht man von einer schweren PCP (Hoffmann, 2003).

Der Erregernachweis erfolgt durch die Untersuchung von broncho-alveolärer Lavage (BAL) oder induziertem Sputum (IS). Qualität und Quantität des gewonnenen Untersuchungsmaterials sind entscheidend für das Gelingen des Nachweises. Das Ergebnis der Untersuchungen muss nicht vor Beginn der Therapie abgewartet werden. *P. jirovecii* ist in der BAL auch noch einige Tage nach Therapiebeginn nachweisbar. Auch eine Lungenbiopsie kann zum Erregernachweis herangezogen werden.

In dem gewonnenen Material lässt sich *P. jirovecii* durch verschiedene labordiagnostische Verfahren nachweisen. Die gebräuchlichsten Verfahren sind:

- Grocott Färbung (Methamin-Silber-Färbung),
- Giemsa Färbung,
- direkter Fluoreszenztest (DFT) und die
- Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine Anzüchtung von *Pneumocystis* in Versuchstieren (z.B. Mäusen oder Ratten), ist möglich (Aliouat el et al., 1999; Armstrong, Smith & Richards, 1991). Die Anzüchtung von *P. jirovecii* in Nährmedien, befindet sich noch im Versuchsstadium. Für die Routine-Diagnostik sind die Anzüchtungsverfahren noch nicht geeignet.

3.2.2.1 **Grocott Färbung**

Die Methamin-Silber-Färbung (Grocott Färbung) ist die Standardmethode zum Direktnachweis von *P. jirovecii*. Bei dieser Methode werden die Zellmembranen der *P. jirovecii* Zysten mit Silberchlorid angefärbt und stellen sich anschließend hell- bis dunkelgrau dar. Die Kerne der intrazystischen Körperchen werden nicht dargestellt. Manchmal sind auf der Membranoberfläche sogenannte „microdots“ erkennbar. Dabei handelt es sich um Verdickungen der Zellmembran (Abb. 2). Die Sensitivität der Grocott-Färbung liegt bei 60 bis 80%, die Spezifität bei 80% (Riebold et al., 2003).

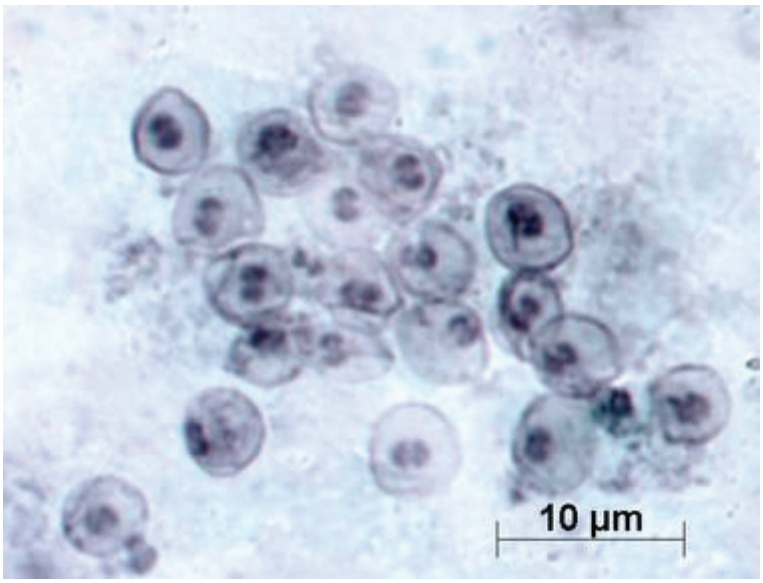


Abb. 2. Grocott Färbung von *P. jirovecii*

3.2.2.2 **Giemsa Färbung**

Bei dieser Methode werden die intrazystischen Körperchen bzw. die Kerne der späteren Trophozoiten angefärbt. Die Zellmembranen der Zysten sind als helle Umrisse erkennbar (Abb. 3). Sind keine Trophozoiten oder kernhaltige Präzysten im Untersuchungsmaterial vorhanden, kann *P. jirovecii* mit dieser Methode leicht übersehen werden. Die Sensitivität der Giemsa Färbung liegt bei 79%, die Spezifität

bei 99%. Um die Sensitivität zu steigern, erfolgt parallel die Grocott Färbung des Untersuchungsmaterials (Riebold et al., 2003).

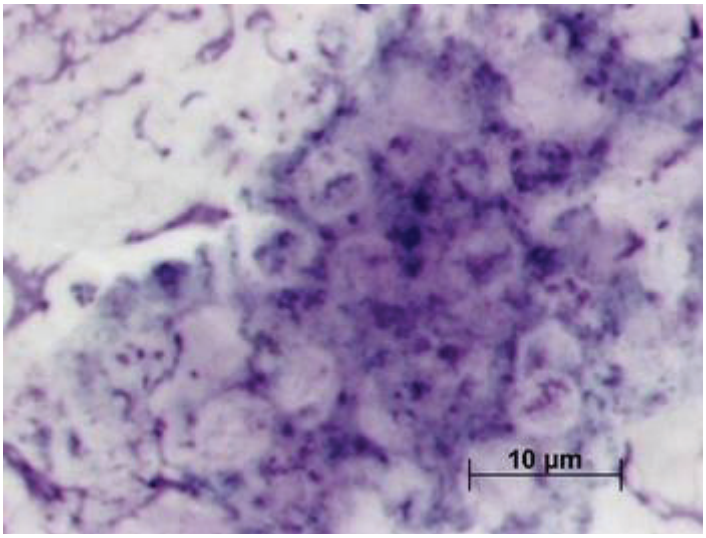


Abb. 3. Giemsa Färbung von *P. jirovecii*

3.2.2.3 **Direkter Fluoreszenztest (DFT)**

Die Sensitivität des direkten Fluoreszenztests liegt bei 80 bis 92%, die Spezifität bei 80%. Die Differenzierung der fluoreszierenden Organismen im Untersuchungsmaterial erfolgt anhand der morphologischen Strukturen. Diese Methode erfordert erfahrene Untersucher, die *P. jirovecii* von anderen fluoreszierenden Organismen (z.B. Hefen) unterscheiden können (Riebold et al., 2003).

3.2.2.4 **Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Die PCR ist eine enzymatische Reaktion, bei der es in vitro zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen des gesuchten Erregers kommt. Ein Überschuss an Primern und Nukleotiden wird den zu untersuchenden Proben zugegeben, und die DNA-Sequenz wird exponentiell vermehrt. Im ersten Zyklus erfolgt durch eine initiale Denaturierung der DNA bei 94°C über 5 min die vollständige Auftrennung der DNA-

Doppelstränge in Einzelstränge. Im zweiten Schritt, dem „Annealing“, erfolgt die Anlagerung der komplementären Primer an definierte Abschnitte der Einzelstränge.
Die Primer sind synthetische Abschnitte aus einzelsträngiger DNA, die so ausgewählt sind, dass sie komplementär zu einem bestimmten Abschnitt der Einzelstränge der nachzuweisenden DNA im Untersuchungsmaterial sind. Die Primer binden an die komplementären Bereiche der DNA-Einzelstränge und rahmen damit den gesuchten DNA-Abschnitt ein. Die optimale Temperatur für das Annealing ist abhängig von der Länge und der Basenfolge der verwendeten Primer und liegt bei ca. 55°C. Nach Anlagerung der Primer entstehen zwei kurze Abschnitte doppelsträngiger DNA, an die im dritten Schritt das Enzym Taq Polymerase bindet. Mit Hilfe der Taq Polymerase erfolgt die Synthese der komplementären DNA-Stränge zwischen den Primern. Die anschließende Elongation der Primer mit dNTPs zu einem DNA-Doppelstrang erfolgt bei 72°C, so dass nach Ablauf eines Zyklus‘, zwei neue, mit der Ausgangs-DNA identische Doppelstränge, entstehen. Wiederholt man den Zyklus, erzielt man anschließend die vielfache Menge an Ausgangs-DNA (Mülhardt, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum Nachweis der DNA von *P. jirovecii* in den Probandenproben eine „nested“-PCR verwendet. Dazu wird zunächst eine PCR durchgeführt und die Amplifikate dieser PCR werden für eine zweite PCR mit neuen Primern verwendet. Das zweite Primerpaar bindet spezifisch innerhalb des in der ersten Stufe produzierten DNA-Fragments, so dass unspezifische Amplifikate aus der ersten Stufe der PCR ausselektiert werden und nochmals eine vielfache spezifische Vervielfältigung von *Pneumocystis* DNA stattfindet. Daher lassen sich mit der „nested“-PCR sehr geringe Mengen der gesuchten DNA nachweisen (Chelly J. et al.,1989). Die Methode der „nested“-PCR erreicht eine Spezifität von 95% und eine Sensitivität von 93% (Totet et al., 2003).

In der Bevölkerung ist eine hohe Antikörperprävalenz nachweisbar. Bis zu 90% der gesunden Normalbevölkerung haben ab dem 10. Lebensjahr Antikörper gegen *P. jirovecii*, was auf einen frühen Kontakt mit dem Erreger im Kindes- und Jugendalter hindeutet (Riebold et al., 2005).

3.2.3 Therapie der PCP

Das Mittel der Wahl zur Therapie der PCP ist Co-trimoxazol (Trimethoprim und Sulfamethoxazol). Alternativen sind Trimethoprim in Kombination mit Dapson, Clindamycin in Kombination mit Primaquin, Pentamidin und Atovaquon. Bei schwerer Infektion wird Co-trimoxazol i.v. über 21 Tage appliziert. Die Dosierung beträgt für Trimethoprim 15 bis 20mg/kg Körpergewicht pro Tag und für Sulfamethoxazol 75 bis 100mg/kg Körpergewicht pro Tag, in 3 bis 4 Einzelgaben. Bei einer leichten Form der PCP kann Co-trimoxazol oral z.B. mit 3x3 Tabletten zu je 960 mg pro Tag über 21 Tage verabreicht werden. Bei rechtzeitigem Therapiebeginn liegt der Therapieerfolg bei über 90% (Hoffmann, 2003). Bei vorliegender Symptom-Trias (trockener Husten, subfebrile Temperatur, progrediente Belastungsdyspnoe), niedriger Anzahl von CD4-Zellen und fehlender PCP-Prophylaxe bei HIV-Positiven, sollte auch ohne gesicherte Diagnose mit der Therapie begonnen werden. Die Therapie hängt vor allem von der Schwere der PCP und der Compliance des Patienten ab. Bei einer leichten PCP (BGA: PO2 über 8kPa) und in Zusammenarbeit mit einem guten HIV-Pflegedienst, kann die Therapie auch ambulant durchgeführt werden. Kommt es zu einer respiratorischen Verschlechterung oder liegt eine PCP mit Ruhedyspnoe vor, ist eine sofortige stationäre Einweisung notwendig. Sollte eine Beatmung erforderlich werden, sind nichtinvasive Beatmungstechniken (z.B. CPAP-Beatmung) von Vorteil, weil sie einen kontinuierlichen Gasaustausch in der Lunge gewährleisten und ein Pneumothorax verhindert werden kann (Confalonieri et al., 2002). Bei HIV-Patienten, die noch keine hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) bekommen und akut an einer PCP erkrankt sind, wird zunächst die PCP therapiert und am Ende der PCP Therapie mit der HAART begonnen. Die Antibiotkatherapie muss mindestens 21 Tage fortgeführt werden. Auch bei HIV-Infizierten ist das Mittel der Wahl zur Behandlung der PCP Co-trimoxazol. Die Gabe erfolgt intravenös und hochdosiert (Tab. 1). Durch das schaumige Zerplatzen der Pneumocysten in den Alveolen kann die Lungenfunktion weiter herabgesetzt werden. Die gleichzeitige Gabe von Prednisolon kann eine weitere Verschlechterung der Symptome verhindern. Prednisolon bewirkt eine Membranstabilisierung und eine Immunsuppression in den Alveolen (Hoffmann, 2003).

Unter der hochdosierten antibiotischen Therapie sind regelmäßige Kontrollen des Blutbildes, der Elektrolyte, der Nierenfunktion und der Transaminasen erforderlich. Bei Auftreten einer Leukopenie bzw. Agranulozytose als Nebenwirkung der Co-trimoxazol-Therapie, muss auf weniger knochenmarktoxische Antibiotika (z.B. Atovaquon plus Clindamycin) umgestellt werden. Bei Auftreten eines Arzneimittelexanthems, das zumeist in der zweiten Therapiewoche auftritt, kann die Therapie in leichten Fällen ein bis zwei Tage unterbrochen werden, um sie dann unter Prednisolon und Antihistaminika mit der halben Antibiotika-Dosis fortzusetzen. Sollte keine Besserung der Hauterscheinungen eintreten, muss auf ein Alternativpräparat ausgewichen werden (Tab. 1).

Tab. 1. Medikamente zur Therapie der PCP (Hoffmann 2005)

	Dauer	Leichte PCP	Schwere PCP	
Co-trimoxazol	21 Tage	100 mg/kg/d SMX 20 mg/kg/d TMP p.o.	100 mg/kg/d SMX 20 mg/kg/d TMP i.v.	1. Wahl
Clindamycin plus Primaquin	21 Tage	4 x 600 mg Clinda 7 – 10 d i.v., dann p.o 15 mg/d Prim. p.o.		2. Wahl
Dapson plus Trimethoprim	21 Tage	100 mg/d Dapson 20 mg/kg/d TMP		Alternative
Atovaquon	21 Tage	2 x 750 – 1500 mg p.o.		Alternative
Pyrimethamin	21 Tage	2 x 25 mg Pyrimethamin für 3 d, dann ½ Dosis 2 x 15 mg Leucovorin plus Sulfadiazin, Clindamycin oder Atovaquone		Alternative
Pentamidin	21 Tage	200 – 300 mg/d f. 5 Tage, dann ½ Dosis		Alternative

3.2.4. Prophylaxe der PCP

Bei abwehrgeschwächten Patienten kann durch eine medikamentöse Prophylaxe das Auftreten einer PCP reduziert bzw. verzögert werden. Dabei unterscheidet man zwischen einer Primär- und einer Sekundärprophylaxe.

Die Primärprophylaxe erfolgt bei Patienten ohne vorheriges Auftreten einer PCP bei verminderter Anzahl der CD4-Zellen unter 200 Zellen/µl. Die Primärprophylaxe soll eine *P. jirovecii*-Ersterkrankung verhindern. Steigt die Anzahl der CD4-Zellen unter der Primärprophylaxe für mindestens 3 Monate auf über 200 Zellen/µl, kann die Prophylaxe ausgesetzt werden (Lopez Bernaldo de Quiros et al., 2001; Schneider et al., 1999; Weverling et al., 1999).

Geht aus der Anamnese des Patienten hervor, dass er bereits eine PCP hatte, erfolgt die Sekundärprophylaxe mit dem Ziel, eine wiederholte PCP zu vermeiden.
Patienten bei denen trotz einer CD4-Zellzahl über 200/µl eine *P. jirovecii*-Infektion aufgetreten ist, benötigen eine lebenslange Prophylaxe unabhängig von der Lymphozytenzahl.

Sowohl für die Primär- als auch für die Sekundärprophylaxe ist Co-trimoxazol das Mittel der Wahl. Die empfohlene Dosierung liegt bei täglich 480 mg Co-trimoxazol p.o. oder 3mal wöchentlich 960 mg Co-trimoxazol p.o. Bei Co-trimoxazol-Unverträglichkeit und Sulfonamidallergien stehen als Alternativen Pentamidine, Dapsone oder Atovaquone zur Verfügung (Tab. 2).

Die Pentamidin-Inhalationen erfolgen ein bis zwei mal pro Monat, werden aber selten eingesetzt, da zu viele PCP-Fälle unter Pentamidin-Prophylaxe aufgetreten sind (Hoffmann, 2005). Dapson wird in einer Dosierung von ein bis zwei mal 50 mg täglich verabreicht oder es erfolgt eine wöchentliche Gabe von 50 mg Dapson in Kombination mit 50 mg Pyrimethamin und 30 mg Methotrexat. Atovaquon wird in einer Dosierung von ein mal 1500 mg täglich oder zwei mal 750 mg täglich p.o. verordnet (Tab. 2).

Tab. 2. Medikamente zur Prophylaxe der PCP (Hoffmann 2005)

	Dosierung p.o.	
Co-trimoxazol	80/400 mg tgl. TMP/SMX 160/800 mg 3 x / Wo. TMP/SMX	1. Wahl
Dapson	100 mg tgl.	Alternative
Atovaquon	750 – 1500 mg 2 x tgl.	Alternative
Pyrimethamin plus Dapson plus Folinsäure	50 mg tgl. Dapson 50 mg / Wo. Pyrimethamin 30 mg / Wo. Leucovorin	Alternative

4 Probanden, Material und Methoden

4.1 Probanden

Im Zeitraum von Februar 2006 bis Juli 2006 wurden im Rahmen dieser Studie insgesamt 104 Probanden auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* untersucht. Die Proben stammten aus zwei Gruppen von Probanden. Bei den 51 Probanden der ersten Gruppe handelte es sich um Zahnärzte und Zahnarzthelferinnen aus insgesamt neun Rostocker Zahnarztpraxen. Die zweite Gruppe umfasste 53 Patienten einer Rostocker Zahnarztpraxis.

Eine dritte Gruppe von Probanden wurde im Rahmen einer Dissertation von M. Hörning erarbeitet. Diese Gruppe stammt aus der Reise- und Impfambulanz der Universität Rostock. Die Proben dieser Probanden wurden im Jahre 2003 gewonnen und 2004/2005 ausgewertet. Die Untersuchungsergebnisse dieser Gruppe waren für die statistische Planung der vorliegenden Studie maßgebend.

Alle Probanden nahmen freiwillig an den Untersuchungen teil. Die Probanden wurden über die Untersuchungen aufgeklärt und mussten einen Fragebogen ausfüllen. Bei den Probanden, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, handelt es sich um gesunde, nicht immunsupprimierte Personen.

Alle Probanden wurden aufgefordert, einen Fragebogen auszufüllen. Der Fragebogen umfasste Parameter, die einen möglichen Einfluss auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* haben. Zu den erfragten Einflussfaktoren gehörten:

- Nikotinkonsum
- Alkoholkonsum und
- Tierkontakte.

Die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter machte zusätzlich Angaben zum:

- Tragen eines Mundschutzes und
- Tragen von Handschuhen.

Bei der Frage nach der Benutzung von Handschuhen wurde unterteilt, ob die Handschuhe „immer“, „häufig“ oder „selten“ getragen wurden.

Beim Mundschutz wurde unterschieden, ob dieser „immer“, „häufig“, „selten“ oder „nicht“ getragen wurde.

Bei der Betrachtung der Gruppen zueinander wurde die „Gruppenzugehörigkeit“ als Einflussfaktor analysiert.

Für die vorliegende Studie wurde am 24.01.2006 ein Antrag an die Ethikkommission der Universität Rostock gestellt. Dieser Antrag wurde am 13.02.2006 von der Ethikkommission mit dem Aktenzeichen II HV 20/2003 genehmigt.

4.2 Untersuchungsmaterial

Zum Nachweis von *P. jirovecii* wurde induziertes Sputum in einem nicht invasiven Verfahren aus der Trachea und den oberen Atemwegen der Probanden unter ambulanten Bedingungen gewonnen. Dazu inhalierten die Probanden 20 ml einer 4%igen Kochsalzlösung über einen Ultraschallvernebler (Pariboy). Die Inhalation

dauerte 20 Minuten. Der Ultraschallvernebler und das Mundstück wurden für jeden Probanden aus einer sterilen Verpackung entnommen. Die 4%ige Kochsalzlösung wurde unter sterilen Bedingungen angesetzt. Durch die Kochsalzlösung wird der auf den Epithelzellen der Atemwege vorhandene Schleim gelockert. Vor der Inhalation wurden die Probanden aufgefordert, den Mund auszuspülen, um eine Belastung der Proben mit Hefen und Bakterien aus der Mundhöhle und der Nahrung zu vermindern. Nach dieser 20-minütigen Inhalation husteten die Probanden den Schleim ab. Von jedem Probanden wurden mindestens 3 ml induziertes Sputum in einem sterilen Röhrchen gesammelt. Das Untersuchungsmaterial wurde anschließend bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C aufbewahrt. Die untersuchende Zahnärztin trug während der Materialgewinnung Handschuhe und Mundschutz.

4.3 Geräte

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden folgende Geräte verwendet:

Gerät	**Firma**
Pariboy	Pari
Kühlschrank –20°C	Liebherr
Zentrifuge 1: Biofuge stratos	Heraeus
Zentrifuge 2: Biofuge fresco	Heraeus
Flowbox: Herasafe II	Eppendorf
Thermoschüttler 1: Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermoschüttler 2: Thermomixer compact	Eppendorf
PCR-Thermocycler 1: Mastercycler gradient (96 Proben)	Eppendorf
PCR-Thermocycler 2: Mastercycler personal (25 Proben)	Eppendorf
Rührplatte MR3100	Heidolph
Vortexer	NeoLab
Präzisionswaage Explorer	Ohaus
Elektrophoresekammer	Owl Scientifcs
Stromversorgung E835 (Elektrophorese)	Consort
UV Bank	Vilber Lourmat
Gel-Sofortbildkamera	
Tiefkühlschrank – 80°C	Liebherr

4.4 Software

Für die Auswertung der erhobenen Daten wurden die nachfolgenden Softwareprogramme genutzt:

Untersuchungen/Fotographie

Programm	Firma
AxioVision Imaging Software Version 3.0	Zeiss

Statistik

Programm	Firma
SPSS Version 14.0	SPSS-GmbH München

Literatur

Programm	Firma	Homepage
PubMed	NIH	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez
EndNote Version 9.0	Thomson ISI ResearchSoft	www.endnote.com

4.5 Chemikalien

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden folgende Chemikalien verwendet:

Chemikalien	**Firma**	**Bestellnummer**
Agarose	Serva	11404
Aqua ad injectabilia (10 mL Ampullen)	Braun	2351544
Borsäure	Merck	11.00165.1000
Dithiothreitol	Serva	20710
dNTPs	Roche	1976273
EDTA	Merck	1.08418.1000
Ethidiumbromid	Merck	1.11615.0010
Natriumchlorid-Lösung 0,9%ig	Braun	0055
Natriumchlorid-Lösung 5,85%ig	DeltaSelect	1299.98.99
PCR Primer	MWG Biotech AG	
ReadyAmp DNA Purification System	Promega	A7710
Taq DNA Polymerase Kit (inkl. 10x Puffer, $MgCl_2$)	Qiagen	201203
TRIS-Puffer	Serva	37180

Die Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen sind unter Material und Methoden (Kap. 4.6) aufgeführt.

4.6 Puffer und Gebrauchslösungen

<u>Agarosegel, 1%ig</u>

2 g Agarose

200 mL 1x TBE-Puffer

TBE-Puffer, Stammlösung, 10x, pH 8,3

121,4 g Tris

61,8 g Borsäure

7,3 g EDTA

Aqua dest. ad 1 L

TBE-Gebrauchslösung

1x TBE-Puffer (100 mL 10x TBE-Puffer, Aqua dest. ad 1 L)

Ethidiumbromid-Gebrauchslösung, 1%ig

1 g Ethidiumbromid

Aqua dest. ad 100 mL

Aufbewahrung im Dunkeln bei 4°C

GEBS (Gel-Proben-Puffer, gel sample buffer)

250 mg Bromophenol (blau)

33 mL 150 mM Tris pH 7,6

60 mL Glycerol

7 mL H_2O

Aufbewahrung bei Raumtemperatur (RT)

Schleimlöser

0,1 g Dithiotreitol

100 mL 0,9%ige NaCl-Lösung

DEPC –Wasser

0,2 mL DEPC

100 mL Aqua dest

12 h Rühren (Rührplatte)

Autoklavieren

Aliquotieren

Aufbewahrung bei -20°C

5 Diagnostische Methoden

5.1 Aufbereitung von induziertem Sputum

Um die DNA von *P. jirovecii* aus den Sputumproben freizusetzen, wurde das aufgetaute Sputum zunächst mit Schleimlöser im Verhältnis 1:1 versetzt und anschließend gevortext. Der Schleimlöser bewirkte, dass das muköse Sputum in einen viskösen Zustand überführt wurde und damit leichter zu verarbeiten war.
Das Probenmaterial (mindestens 6 ml) wurde in 15 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert und bei 5.000 U/min 10 min (5.000 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Anschließend erfolgte die DNA-Isolierung aus dem Pellet.

5.2 DNA-Isolierung in den aufbereiteten Proben

Die Isolierung der DNA von *P. jirovecii* aus den gewonnenen Proben erfolgte mit dem ReadyAmp® Genomic DNA Purification System von Promega.

Das Pellet jeder Probe wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen mit 200µl ReadyAmp®- Lösung versetzt und gevortext, bis es vollständig resuspendiert war. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Proben im Thermoschüttler für 20 min bei 56°C und danach erfolgte die Inaktivierung des Resins und der darin enthaltenen Protease für 10 min bei 99°C. Nachfolgend wurden die Proben für 2 Minuten bei 13.000 U/min (16.060 g) zentrifugiert. Dabei trennten sich feste und flüssige Bestandteile der Proben. Der flüssige Überstand, in dem sich die DNA nun befand, wurde abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte DNA bei –20C° im Tiefkühlschrank gelagert.

5.3 Polymerase-Kettenreaktion

Der diagnostische Nachweis von *P. jirovecii* in den Proben erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR). Bei der hier verwendeten "mitochondrial transcribed large subunit rRNA gene nested PCR" (mtLSU nPCR), wurde das für *P. jirovecii* spezifische mtLSU rRNA- Gen in den Proben nachgewiesen.

Die PCR ist eine enzymatisch gesteuerte Reaktion bei der es in vitro zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen des gesuchten Erregers kommt. Die PCR-Methode nutzt das Prinzip der natürlichen Vervielfältigung der Erbsubstanz, die in Form der DNA in den Zellen gespeichert ist. Die beiden DNA-Stränge, welche die Doppelhelix im Zellkern bilden, sind aus komplementären Basenpaaren (Adenosin-Thymin / Cytosin-Guanin) mit Wasserstoffbrücken zusammengesetzt. Seitliche Zucker- und Phosphatmoleküle bilden Kettenformationen, die eine entgegengesetzte Orientierung aufweisen. Man spricht von einem 3`- und einem 5`- Ende. Ähnlich wie bei der natürlichen Verdopplung der DNA, werden bei der PCR die beiden DNA-Stränge geteilt und dupliziert.

Der erste Schritt der PCR bestand in der Trennung der DNA-Stränge in Einzelstränge durch Erhitzung auf 94°C. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Denaturierung“. Im zweiten Schritt erfolgte die Anlagerung der passenden Primer an die getrennten Stränge. Die Primer sind synthetische Abschnitte einzelsträngiger DNA, die so ausgewählt werden, dass sie komplementär zu einem ganz bestimmten Abschnitt der getrennten DNA-Stränge sind. Die Primer binden an die entsprechenden Bereiche und rahmen den gesuchten Abschnitt auf der DNA ein. Dieser zweite Schritt wird als „Annealing“ bezeichnet. Die optimale Temperatur für das „Annealing“ ist abhängig von der Länge und der Basenabfolge der verwendeten Primer. Für die hier verwendeten Primer pAZ102-H und pAZ102-E liegt die optimale Annealingtemperatur bei 55°C. Nach Anlagerung der Primer entstanden zwei kurze Abschnitte doppelsträngiger DNA, die im dritten Schritt als Startblöcke für das Enzym Taq Polymerase dienten. Mit Hilfe der Taq Polymerase erfolgt die Synthese der

komplementären DNA-Stränge zwischen den Primern (Mülhardt, 2006). Die mitgeführten dNTP`s werden durch die Taq Polymerase an das Ende der Primer komplementär zur Matrize aneinandergefügt und bilden so den DNA-Tochterstrang. Diesen dritten Schritt bezeichnet man als „Elongation“. Die „Elongation“ erfolgt bei 72°C. Nach Ablauf eines Zyklus entstanden aus einem DNA-Doppelstrang zwei neue, mit der Ausgangs-DNA identische Doppelstränge. Anschließend wurde der Reaktionsansatz erneut auf 94°C erhitzt und ein neuer Reaktionszyklus konnte beginnen. Insgesamt wurde für die erste Stufe der PCR der Reaktionszyklus 40-mal wiederholt. Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend in der Gelelektrophorese aufgetrennt, unter der UV-Bank mittels Ethidiumbromid (0,05% Ethidiumbromid im Agarosegel) sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

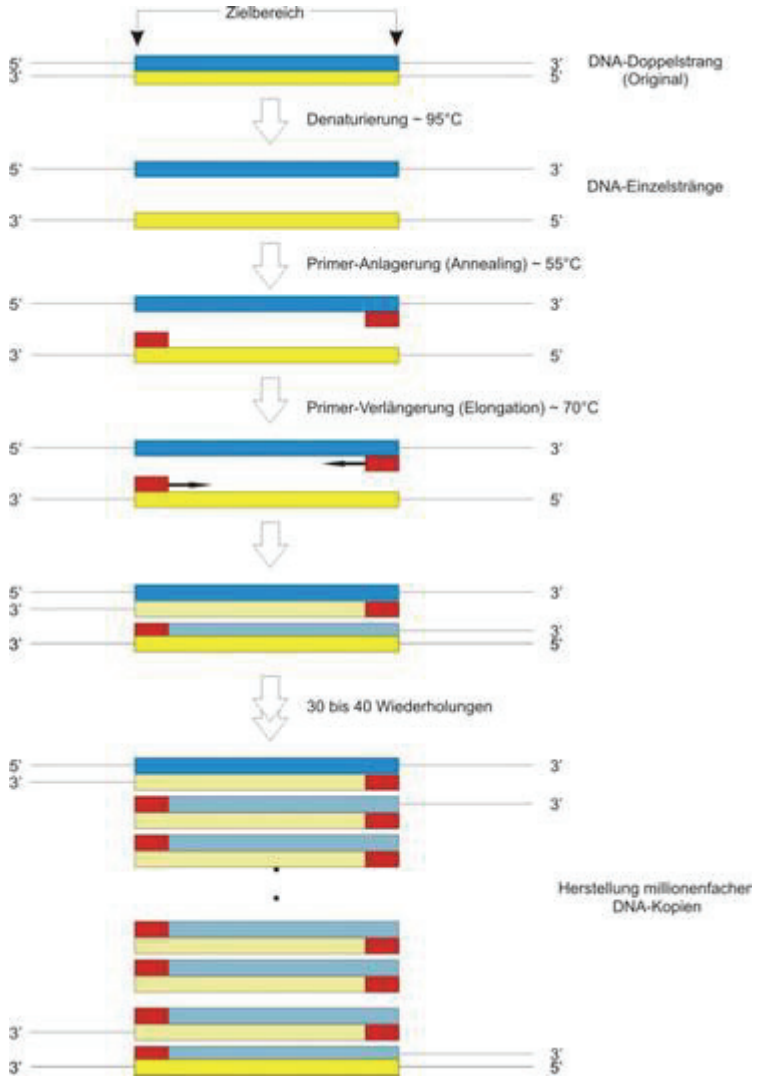


Abb. 4. Schematische Darstellung: PCR-Prinzip (nach Riebold 2007)

5.4 „Nested“- PCR

Das Prinzip der hier angewandten „nested“-PCR (nPCR) beruht darauf, zunächst eine PCR mit entsprechenden Primern (pAZ102-H und pAZ102-E) durchzuführen und die Amplifikationsprodukte dieser ersten PCR als Grundlage für eine zweite PCR mit anderen Primern zu verwenden. Das zweite Primerpaar lag zwischen dem ersten, so dass falsche Amplifikationsprodukte der ersten PCR ausselektiert wurden. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten nPCR wurde als zweites Primerpaar P1 und P2 verwendet. Mit der nPCR lassen sich sehr geringe Mengen der gesuchten DNA nachweisen (Totet et al., 2003). Die Methode der nPCR führt zur Erhöhung der Sensitivität und der Spezifität im Vergleich zur einfachen PCR.
Die Amplifikationsprodukte der nPCR wurden wiederum durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt, unter der UV-Bank sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

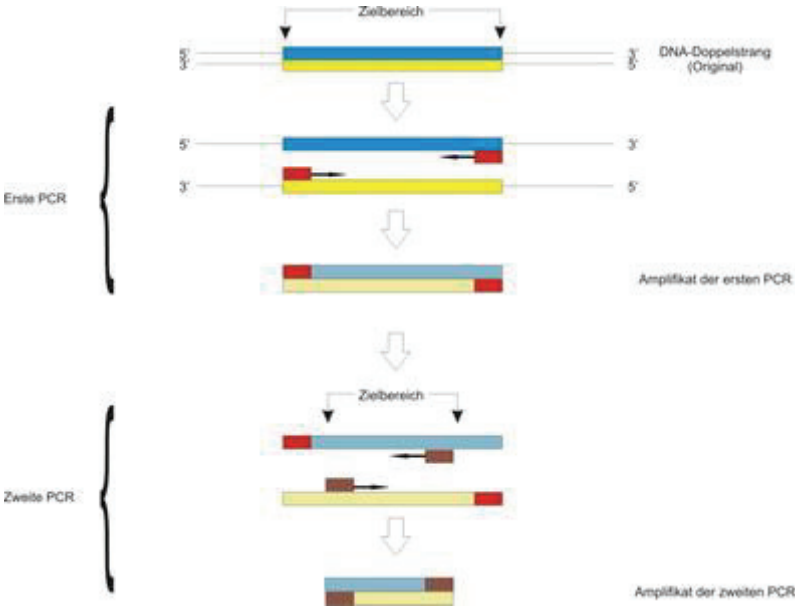


Abb. 5. Schematische Darstellung: Prinzip der nPCR (nach Riebold 2007)

5.5 Durchführung der mtLSU rRNA Gen nested PCR

In dieser Arbeit wurde das für *P. jirovecii* spezifische mtLSU rRNA-Gen mittels der „mitochondrial transcribed large subunit rRNA gene nested PCR“ (mtLSU nPCR) nachgewiesen. Das nachzuweisende Gen entstammt der mitochondrialen DNA. Entsprechend der hohen Anzahl von Mitochondrien liegen in jeder *P. jirovecii*-Zyste mehrere tausend Kopien des gesuchten Gens vor. Daraus resultiert die hohe Sensitivität (93%) und Spezifität (95%) der mtLSU nPCR (Totet et al., 2003). Mit der Methode der mtLSU nPCR lassen sich sowohl Besiedelungen als auch Erkrankungen mit *P. jirovecii* nachweisen. In der Auswertung der Ergebnisse galten die Probanden als besiedelt, deren Proben in der ersten Stufe der PCR negativ und in der zweiten Stufe der PCR positiv waren.

Zur Durchführung der PCR wurden die Proben mit der isolierten DNA zunächst bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut. In der Zwischenzeit erfolgte die Herstellung des Mastermixes (Reaktionspuffer) entsprechend der Anzahl der zu untersuchenden Proben und unter Berücksichtigung der erforderlichen Positiv- und Negativkontrollen.

Für die erste Stufe der PCR wurden unter der Airflow-Box je 10µl der isolierten DNA mit den Primern pAZ102-E und pAZ102-H in 0,2ml PCR-Tubes pipettiert und mit 45 µl Mastermix (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP, 1 mM pAZ102-E, 1mM pAZ102-H und 2,5 U Taq Polymerase) versetzt und mit der Pipette gut vermischt. Anschließend wurden die Tubes in den Thermocycler gegeben und das PCR-Programm Stufe 1 gestartet (Tab. 3). Für die Positivkontrolle standen positiv getestete Proben von Patienten zur Verfügung. Für die Negativkontrollen wurden jeweils 10µl Aqua dest. mit 45µl Mastermix versetzt. Im nächsten Schritt erfolgte die Durchführung der „nested“-PCR. Grundlage dieser zweiten Stufe der PCR war das Amplifikationsprodukt aus der ersten Stufe der PCR.
Unter der Laminar-Airflow-Box wurden je 1µl des Amplifikats der ersten Amplifikationsrunde mit einem neuen Reaktionspuffer und dem Primerpaar P1 und P2 in 0,2ml PCR-Tubes pipettiert und im Thermocycler mit dem PCR-Programm Stufe 2, erneut amplifiziert (Tab. 4).

Die Basenfolgen der verwendeten Primer und die Thermoprofile der beiden Stufen der mtLSU nPCR sind in den Tabellen 3 und 4 dargestellt.

Tab. 3. *P. jirovecii* mtLSU rRNA Gen nPCR. Primer und PCR-Programm Stufe 1

Nested PCR Stufe 1		
PAZ102-E	5‘-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3‘	
PAZ102-H	5‘-GTG TAG GTT GCA AAG TAG TC-3‘	
Thermoprofil Stufe 1	Denaturierung	1 min 94°C
	40 Zyklen:	
	Denaturierung	30 sec 94°C
	Anlagerung	30 sec 55°C
	Extension	30 sec 72°C
	Terminale Extension	5 min 72°C
	Kühlen	∞ 4°C

Tab. 4. *P. jirovecii* mtLSU rRNA Gen nPCR. Primer und PCR-Programm Stufe 2

Nested PCR Stufe 2			
P1	5‘-CTA GGA TAT AGC TGG TTT TC-3‘		
P2	5‘-TCG ACT ATC TAG CTT ATC GC-3‘		
Thermoprofil Stufe 2	Denaturierung	1 min	94°C
	30 Zyklen:		
	Denaturierung	1 min 20 sec	94°C
	Anlagerung	1 min 20 sec	55°C
	Extension	1 min 20 sec	72°C
	Terminale Extension	5 min	72°C
	Kühlen	∞	4°C

Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend in der Gelelektrophorese aufgetrennt, unter der UV-Bank mittels Ethidiumbromid (0,05% Ethidiumbromid im Agarosegel) sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

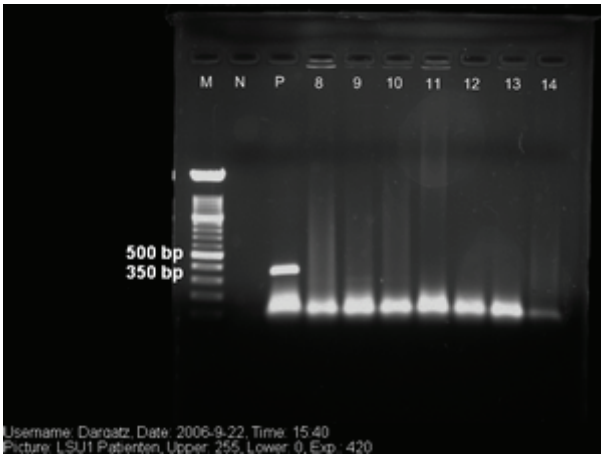
5.6 Gel-Elektrophorese

Zur Herstellung des 1%igen Agarosegels wurden 2g Agarose mit 200ml 1x TBE-Puffer in einem 300ml Erlenmeyerkolben vermischt und bis zur vollständigen Aufklarung in der Mikrowelle geschmolzen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10µl Ethidiumbromid-Stocklösung.

Das 1%ige Agarosegel wurde in der Mikrowelle verflüssigt und in die quer zur Laufrichtung der Elektrophoresekammer gesetzte, mit einem Gelkamm für 10 Proben bestückte Gelkammer gegossen. Nach dem Erkalten wurde die Gelkammer aus der Elektrophoresekammer gelöst und mit den Geltaschen nach links in die Kammer eingesetzt. Der Gelkamm wurde entfernt. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1 x TBE-Laufpuffer bis 1 cm über das Gel gefüllt.

Jeweils 2,6µl GEBS (Gel-Proben-Puffer, gel sample buffer) pro Probe und 10µl PCR-Amplifikat (PCR Stufe 1) wurden in einer Mikropipettierplatte gemischt und in eine Geltasche pipettiert. In die erste Geltasche wurden jeweils 2,6µl 100 bp DNA-Marker (Lifetechnologies) pipettiert. Die zweite Geltasche enthielt die Negativ-, die dritte Geltasche enthielt die Positivkontrolle. In die Geltaschen 4 bis 10 wurden die Amplifikate der jeweiligen Probandenproben pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 200V für 20 min.

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Gele unter einer UV-Bank ausgewertet. Zeigte sich in der ersten Stufe der mtLSU nPCR bei 350 Basenpaaren (bp) eine DNA-Bande, so wurde die Probe zunächst positiv bewertet. Zeigte sich in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR bei 205 bp eine DNA-Bande, so wurde die Probe ebenfalls zunächst positiv bewertet. Als *Pneumocystis*-negativ wurden Proben gewertet, die in beiden Stufen der mtLSU nPCR keine spezifischen Banden zeigten (Abb. 6, 7).



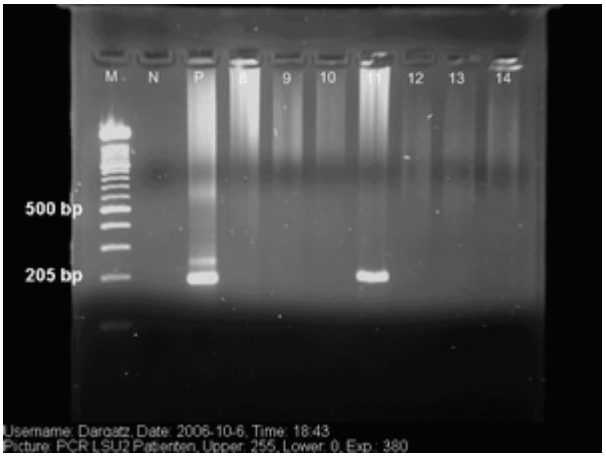


Abb. 6. PCR Stufe 1 Abb. 7. PCR Stufe 2

Legende zu Abb. 6: Spur M: 100 bp Marker, Spur N: Negativkontrolle, Spur P: Positivkontrolle (350 bp), Spuren 8-14: negative Patientenproben.

Legende zu Abb. 7: Spur M: 100 bp Marker, Spur N: Negativkontrolle, Spur P: Positivkontrolle (205 bp); die kleinere Bande bei ca. 250 bp ist unspezifisch, Spur 11: positive Patientenprobe, Spuren 8-10 und 12-14: negative Patientenproben.

5.7 Aufreinigung der PCR-Amplifikate und Sequenzierung

Im Anschluss an die mtLSU nPCR wurden die Amplifikate mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll gereinigt. Danach wurde der DNA-Gehalt der Proben mittels GeneQuant II (Pharmacia) ermittelt. Ein Teil jeder Probe wurde in einem neuen Röhrchen auf 120 ng DNA/ 20 µl verdünnt und sequenziert (MWG Biotech).

Die Auswertung der DNA-Sequenzen erfolgte mittels GenBank (www.pubmed.gov) und BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Alle Sequenzen wurden anschließend zusätzlich manuell verglichen.

Die mtLSU nPCR-Ergebnisse wurden dann als endgültig positiv bewertet, wenn die mitgeführten Negativkontrollen negativ und die Positivkontrollen positiv waren und durch die Ergebnisse der Sequenzierung das PCR-Amplifikat als *P. jirovecii*-DNA bestätigt wurde. War eine Negativkontrolle positiv oder eine Positivkontrolle negativ, so wurde die PCR wiederholt.

Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Gel-Imaging-Systems zur Fotografie von Agarosegelen (Abb. 6, 7).

5.8 Positivkontrolle der PCR

Für die Durchführung der mtLSU nPCR wurde als Positivkontrolle die aufbereitete BAL eines Patienten verwendet, welche durch eine vorab durchgeführte Grocott Färbung und nPCR als sicher positiv identifiziert wurde. Diese Positivkontrolle stammte aus dem Labor für Parasitologie der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock. Eine Probe dieser Positivkontrolle wurde bei jeder PCR mitgeführt. Die Positivkontrolle diente als Hinweis auf das Funktionieren der PCR und half bei der Größeneinordnung der unter der UV-Bank sichtbaren DNA-Banden im Agarosegel. Sobald eine Positivkontrolle negativ war, wurde die gesamte PCR wiederholt.

5.9 Negativkontrolle der PCR

In jeder PCR wurden mehrere Negativkontrollen in Form von Diethylenpyrocarbonat-Wasser (DEPC-Wasser) mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen und falsch positive Ergebnisse zu erkennen. Sobald eine Negativkontrolle positiv war, wurde die gesamte PCR wiederholt.

5.10 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der Daten erfolgte unter Verwendung von SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), Version 14.0 (SPSS GmbH München). In der statistischen Auswertung wurden univariate und multivariate logistische Regressionsanalysen durchgeführt, um zu ermitteln, welche Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die Besiedelung der Probanden mit *P. jirovecii* haben. Eine Signifikanz wurde bei $p = 0,05$ angenommen. Bei der univariaten Regressions-analyse wurde untersucht, ob einer der Faktoren in den untersuchten Gruppen

unterschiedlich verteilt war. Daraus ließ sich die so genannte Odds Ratio als vergleichende epidemiologische Maßzahl ermitteln, die im univariaten Modell für andere Faktoren nicht adjustiert ist. Bei Gültigkeit der Nullhypothese, dass Probanden, die zwei verschiedenen Subgruppen eines Einflussfaktors angehören, ein gleiches Risiko für eine Besiedelung aufweisen, wird erwartet, dass die Odds Ratio den Wert 1.0 annimmt. Wenn dieses Risiko für Probanden in einer bestimmten Kategorie kleiner (größer) ist, als für Probanden einer Referenzkategorie, dann wird die Odds Ratio kleiner (größer) als 1.0. Alle Faktoren, die in der univariaten Regressionsanalyse mit $p < 0,2$ zumindest eine „grenzwertige Signifikanz“ („borderline significance“) als Resultat des Wald-Tests aufwiesen, wurden anschließend einer multivariaten Regressionsanalyse unterzogen (Fietkau et al., 2004). Eine Signifikanz wurde bei $p = 0,05$ angenommen. Als Resultat ergaben sich für die integrierten Parameter adjustierte Odds Ratios. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass die bei der univariaten Regressionsanalyse möglichen Verzerrungen durch die anderen, „im Hintergrund wirkenden“ Parameter, ausgeschlossen worden sind. Die adjustierten Odds Ratios erlauben damit genauere Aussagen.

Da es sich in der vorliegenden Arbeit um kleine Stichproben handelt, sind die statistischen Aussagen mit einer Unsicherheit belastet. Aus diesem Grund wurde das 95%-Konfidenzintervall angegeben. Das 95%-Konfidenzintervall ist derjenige Bereich, in dem der „wahre“ Wert für die Odds Ratio mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt.

Tab. 5. Anzahl der nPCR positiven Proben in der Gruppe der Zahnärzte und Mitarbeiter und in der Gruppe der zahnärztlichen Patienten für das Berechnungsbeispiel der Odds Ratio (OR)

Probanden	n	*P. jirovecii* nPCR 2. Stufe positiv	*P. jirovicii* nPCR 2.Stufe Negativ
Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter	51	13 (25,5%) (a)	38 (74,5%) (c)
Zahnärztliche Patienten	53	8 (15,1%) (b)	45 (84,9%) (d)

$$Odds\ Ratio = \frac{a/c}{b/d} = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$$

$$Odds\ Ratio = \frac{13/38}{8/45} = \frac{13 \cdot 45}{8 \cdot 38} = 1{,}924$$

Abb. 8. Beispiel für die Berechnung der Odds Ratio mit den Zahlen der Tab. 5

6 Ergebnisse

Von den 51 Zahnärzten und Zahnarzthelferinnen waren 4 männlich und 47 weiblich. Mittelwert ± Standardabweichung (MW ± SD) des Durchschnittsalters lag bei 32,5 ± 8,24 Jahren (von 20 bis 48 Jahre).

Von den 53 zahnärztlichen Patienten waren 12 männlich und 41 weiblich. Das Durchschnittsalter betrug in dieser Gruppe 31,5 ± 7,82 Jahre (MW ± SD) (von 19 bis 47 Jahre).

Zur Gruppe der Probanden aus der Reise- und Impfambulanz gehörten 119 Personen, davon waren 71 männlich und 48 weiblich. Das Durchschnittsalter lag bei 42,1 ± 15,6 Jahren (MW ± SD) (von 20 bis 72 Jahre) (Tab. 6).

Tab. 6. Gruppe der Zahnärzte und Zahnarzthelferinnen (1), zahnärztlichen Patienten (2) und der Gruppe der Reise- und Impfambulanz (3).

	n	Alter (MW±SD)	männlich	weiblich
Gesamt	223	35,4 ± 5,86	87	136
Zahnärzte/ Zahnarzthelferinnen (1)	51	32,5 ± 8,24	4	47
Zahnärztliche Patienten (2)	53	31,5 ± 7,82	12	41
Reise- und Impfambulanz (3)	119	42,1 ± 15,6	71	48

Von den 51 Probanden der Gruppe 1 waren alle in der ersten Stufe der mtLSU nPCR negativ. In der zweiten Stufe der PCR waren 13 von 51 (25,5%) Probanden positiv und 38 von 51 (74,5%) negativ. Bei den 13 positiven Probanden waren in der Gel-Elektrophorese die 205 bp großen DNA-Amplifikate nachweisbar, die dann alle bei der Sequenzierung als *P. jirovecii*-spezifische DNA bestätigt wurden.

Von den 53 Probanden der Gruppe 2 waren alle in der ersten Stufe der mtLSU nPCR negativ. In der zweiten Stufe der PCR waren 8 von 53 (15,1%) Probanden positiv und 45 von 53 (84,9%) negativ. Bei den 8 positiven Probanden waren in der Gel-Elektrophorese die 205 bp großen DNA-Amplifikate nachweisbar, die dann bei der Sequenzierung als *P. jirovecii*-spezifische DNA bestätigt wurden (Abb. 9).

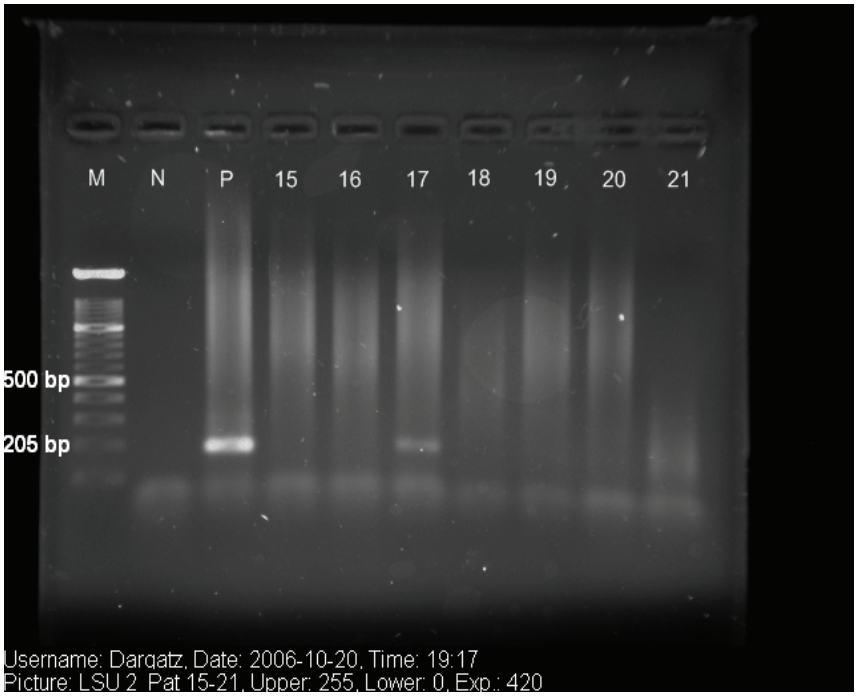


Abb. 9. PCR Stufe 2.

Spur M: 100 bp Marker, Spur N: Negativkontrolle, Spur P: Positivkontrolle (205 bp), Spur 17: positive Patientenprobe, Spuren 15, 16, 18-21: negative Patientenproben. Die verschwommene Bande in Spur 21 bei ca. 200 bp war bei der Wiederholung der nPCR nicht nachweisbar.

Die Auswertung der Fragebögen in der Gruppe der Zahnärzte und der zahnärztlichen Mitarbeiter ergab, dass 25 von 51 Probanden (49,0%) Raucher sind. Von den 25 Rauchern waren 11 (44,0%) in der zweiten Stufe der nPCR positiv. Von den 51 Probanden gaben 24 (47,0%) an, regelmäßig Alkohol zu konsumieren. Von diesen 24 waren 7 (29,2%) in der zweiten Stufe der nPCR positiv. Von den 51 Probanden gaben 31 (60,8%) an, regelmäßig Kontakt zu Tieren zu haben. Von den 31 Probanden mit Tierkontakt waren 10 (32,3%) in der zweiten Stufe der nPCR positiv.

Die Auswertung der Fragebögen für die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter ist in Tab. 7 zusammengefasst.

Tab. 7. Positive PCR-Ergebnisse in der Gruppe der Zahnärzte und der zahnärztlichen Mitarbeiter insgesamt, bei Rauchern, Konsumenten von Alkohol und Probanden mit Tierkontakt.

Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter	n	*P.jirovecii* mtLSU nPCR 2. Stufe positiv
Gesamt	51 (100%)	13 (25,5%)
Nikotinkonsum	25 (49,0%)	11 (44,0%)
Alkoholkonsum	24 (47,0%)	7 (29,2%)
Tierkontakt	31 (60,8%)	10 (32,3%)

Die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter machte zusätzlich Angaben zum Tragen eines Mundschutzes und zum Tragen von Handschuhen.

Von den 51 Probanden trugen 40 (78,4%) „immer“, 7 (13,7%) „häufig“ und 4 (7,8%) „selten“ Handschuhe während der zahnärztlichen Behandlung (Tab. 8).

Von den 40 Zahnärzten und Zahnarzthelferinnen, die „immer“ Handschuhe trugen, waren 8 (20,0%) mit *P. jirovecii* besiedelt. Von den 7 Probanden, die angegeben hatten, „häufig“ mit Handschuhen zu behandeln, waren 2 (28,6%) besiedelt. Bei 3 (75,0%) von 4 Probanden die „selten“ mit Handschuhen arbeiteten, konnte in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR *P. jirovecii*-DNA nachgewiesen werden (Tab. 8).

Tab. 8. Ergebnisse der mtLSU nPCR 2.Stufe für Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter. Einflussfaktor Tragen von Handschuhen.

Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter	Handschuhe n	*P. jirovecii* mtLSU nPCR 2. Stufe positiv
Gesamt	51 (100,0%)	13 (25,5%)
Immer	40 (78,4%)	8 (20,0%)
Häufig	7 (13,7%)	2 (28,6%)
Selten	4 (7,8%)	3 (75,0%)
Nein	0	0

Die Auswertung der Fragebögen ergab, dass von den 51 untersuchten Zahnärzten und zahnärztlichen Mitarbeitern 33 (64,7%) „immer“, 12 (23,5%) „häufig“ und 5 (9,8%) „selten“ einen Mundschutz während der zahnärztlichen Behandlung trugen. Ein Proband (2,0%) gab an, keinen Mundschutz zu tragen (Tab. 9).

Von den 33 Probanden, die „immer“ einen Mundschutz trugen, waren 9 (27,3%) in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR positiv. Von den 12 Probanden, die angaben „häufig“ mit einem Mundschutz zu arbeiten, war ein Proband (8,3%) mit *P. jirovecii* besiedelt. Bei 3 (60,0%) der 5 Probanden, die „selten“ einen Mundschutz bei der zahnärztlichen Behandlung trugen, konnte eine Besiedelung festgestellt werden. Der Proband, der angegeben hatte, keinen Mundschutz zu tragen, war in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR negativ (Tab. 9).

Tab. 9. Ergebnisse mtLSU nPCR 2. Stufe für Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter. Einflussfaktor Tragen eines Mundschutzes.

Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter	Mundschutz n	*P. jirovecii* mtLSU nPCR 2.Stufe positiv
Gesamt	51 (100,0%)	13 (25,5%)
Immer	33 (64,7%)	9 (27,3%)
Häufig	12 (23,5%)	1 (8,3%)
Selten	5 (9,8%)	3 (60,0%)
Nein	1 (1,9%)	0

In der Gruppe der zahnärztlichen Patienten waren 27 der 53 (50,9%) Probanden Raucher. Von den 27 Rauchern konnte bei 7 (25,9%) Probanden *P. jirovecii*-DNA in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR nachgewiesen werden.

Von den 53 Probanden gaben 29 (54,7%) an, regelmäßig Alkohol zu trinken. 7 dieser 29 (24,1%) Probanden waren mit *P. jirovecii* besiedelt.

Unter den 53 Probanden gaben 29 (54,7%) Kontakt zu Tieren an. Von diesen 29 Probanden mit Tierkontakt waren 6 (20,7%) in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR positiv (Tab. 10).

Tab. 10. Positive nPCR-Ergebnisse in der Gruppe der zahnärztlichen Patienten insgesamt, bei Rauchern, Konsumenten von Alkohol und Probanden mit Tierkontakt.

Zahnärztliche Patienten	n	*P. jirovecii* mtLSU nPCR 2. Stufe positiv
Gesamt	53 (100,0%)	8 (15,1%)
Nikotinkonsum	27 (50,9%)	7 (25,9%)
Alkoholkonsum	29 (54,7%)	7 (24,1%)
Tierkontakt	29 (54,7%)	6 (20,7%)

In einer Kontrollgruppe wurde das induzierte Sputum von 119 gesunden Probanden aus der Reise- und Impfambulanz der Universität Rostock untersucht. Alle Probanden waren in der ersten Stufe der mtLSU nPCR negativ auf *P. jirovecii*. In der zweiten Stufe der mtLSU nPCR waren 3 von 119 (2,5%) Probanden positiv und zeigten in der Gelelektrophorese die 205 bp großen DNA-Banden, die in der Sequenzierung als *P. jirovecii*-spezifische DNA bestätigt wurden. Bei 116 Probanden war keine *P. jirovecii* DNA nachweisbar.

Die Auswertung der Fragebögen für die Probanden aus der Reise- und Impfambulanz ergab, dass von den insgesamt 119 Probanden 50 (42,0%) Raucher sind. Von den 50 Rauchern war einer (2,0%) in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR *P. jirovecii* positiv.

Von den 119 Probanden gaben 100 (84,0%) regelmäßigen Alkoholkonsum an. Von diesen 100 Probanden waren 2 (2,0%) in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR positiv. Von den 119 Probanden gaben 70 (58,8%) Kontakt zu Tieren an. Von diesen 70 Probanden war einer (1,4%) in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR positiv (Tab. 11).

Tab. 11. Positive nPCR-Ergebnisse in der Gruppe der Kontrollen (Reise- und Impfambulanz) insgesamt, bei Rauchern, Konsumenten von Alkohol und Probanden mit Tierkontakt.

Probanden Reise- und Impfambulanz	n	*P. jirovecii* mtLSU nPCR 2. Stufe positiv
Gesamt	119 (100,0%)	3 (2,5%)
Nikotinkonsum	50 (42,0%)	1 (2,0%)
Alkoholkonsum	100 (84,0%)	2 (2,0%)
Tierkontakt	70 (58,0%)	1 (1,4%)

6.1 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Gruppenzugehörigkeit“

Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Gruppenzugehörigkeit“ für die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter und die Gruppe der zahnärztlichen Patienten

Betrachtet man die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter und die Gruppe der zahnärztlichen Patienten, so ergab die statistische Auswertung in der logistischen Regression keine signifikanten Unterschiede in der Besiedelung mit *P. jirovecii* (p=0,191; Odds Ratio=1,92) (Tab. 12). Die Odds Ratio (OR) für die

Zahnärzte und deren Mitarbeiter im Vergleich zu den zahnärztlichen Patienten betrug 1,92. Das bedeutet, dass die Zahnärzte und Zahnarzthelferinnen gegenüber den zahnärztlichen Patienten ein 1,92fach höheres Risiko haben mit *P. jirovecii* besiedelt zu sein.

Tab. 12. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter und der Gruppe der zahnärztlichen Patienten in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit.

Faktor	Nicht-adjustierte OR	p-Wert	95%-Konfidenzintervall
Gruppe Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter vs. zahnärztliche Patienten*	1,92	0,191	0,772 – 5,13

*Referenzkategorie

6.2 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Nikotinkonsum“

Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Nikotinkonsum“ für die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter und die Gruppe der zahnärztlichen Patienten

In der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter ergab sich für die Raucher ein signifikant höheres Risiko mit *P. jirovecii* besiedelt zu sein (p=0,027). Die Odds Ratio für die Raucher lag bei 5,11 (Tab. 13). In der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter haben Raucher gegenüber Nichtrauchern ein 5,11fach erhöhtes Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii.*

Tab. 13. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter in Abhängigkeit vom Nikotinkonsum.

Faktor	Nicht-adjustierte OR	p-Wert	95%-Konfidenzintervall
Nikotinkonsum Raucher vs. Nichtraucher*	5,11	0,027	1,205 – 21,679

*Referenzkategorie

In der Gruppe der zahnärztlichen Patienten ergab sich für die Raucher ein signifikant höheres Risiko mit *P. jirovecii* besiedelt zu sein (p=0,05). Die Odds Ratio für die Raucher lag bei 8,75 (Tab. 14). Die Raucher in der Gruppe der zahnärztlichen Patienten haben gegenüber den Nichtrauchern somit ein 8,75fach erhöhtes Risiko für die Besiedelung mit *P. jirovecii.*

Tab. 14. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der zahnärztlichen Patienten in Abhängigkeit vom Nikotinkonsum

Faktor	Nicht-adjustierte OR	p-Wert	95%-Konfidenzintervall
Nikotinkonsum Raucher vs. Nichtraucher*	8,75	0,051	0,993 – 77,114

*Referenzkategorie

Betrachtet man die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter und die Gruppe der zahnärztlichen Patienten in Bezug auf den Einflussfaktor Nikotinkonsum, ergab die logistische Regression, dass Raucher ein signifikant höheres Risiko haben, mit *P. jirovecii* besiedelt zu sein (p=0,003; OR=5,83) (Tab. 15). Die Odds Ratio für die Raucher lag bei 5,83. Raucher beider Gruppen haben demnach ein 5,83fach erhöhtes Risiko gegenüber den Nichtrauchern, mit *P. jirovecii* besiedelt zu sein.

Tab. 15. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter und in der Gruppe der zahnärztlichen Patienten in Abhängigkeit vom Nikotinkonsum.

Faktor	Nicht-adjustierte OR	p-Wert	95%-Konfidenzintervall
Nikotinkonsum Raucher vs. Nichtraucher*	5,83	0,003	1,803 – 18,838

*Referenzkategorie

6.3 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Alkohol“

Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Alkoholkonsum“ für die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter und die Gruppe der zahnärztlichen Patienten

In der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter ergab sich kein signifikant erhöhtes Risiko für die Alkoholkonsumenten hinsichtlich einer Besiedelung mit *P. jirovecii* (p=0,571). Die Odds Ratio für die Alkoholkonsumenten dieser Gruppe lag bei 1,44 (Tab. 16). Die Odds Ratio von 1,44, räumt den Zahnärzten und zahnärztlichen Mitarbeitern, die Alkohol konsumieren, gegenüber denen, die keinen Alkohol trinken, ein 1,44fach erhöhtes Risiko ein, mit *P. jirovecii* besiedelt zu sein.

Tab. 16. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum.

Faktor	Nicht-adjustierte OR	p-Wert	95%-Konfidenzintervall
Alkoholkonsum ja vs. nein*	1,44	0,571	0,407 – 5,102

*Referenzkategorie

Für die Gruppe der zahnärztlichen Patienten ergab die logistische Regression hinsichtlich der Besiedelung mit *P. jirovecii* in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum kein signifikant erhöhtes Risiko (p=0,073). Die Odds Ratio lag für die Alkoholkonsumenten dieser Gruppe bei 7,32 (Tab. 17). Bei einer Odds Ratio von 7,32 besteht für die Patienten, die Alkohol trinken, gegenüber denen, die keinen Alkohol konsumieren, ein 7,32fach erhöhtes Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii*.

Tab. 17. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der zahnärztlichen Patienten in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum.

Faktor	Nicht-adjustierte OR	p-Wert	95%-Konfidenzintervall
Alkoholkonsum ja vs. nein*	7,32	0,073	0,831 – 64,434

*Referenzkategorie

Hinsichtlich der Besiedelung mit *P. jirovecii* in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum, ergab die logistische Regression für die Alkoholkonsumenten beider Gruppen kein signifikant höheres Risiko (p=0,112). Die Odds Ratio für beide Gruppen lag bei 2,26 (Tab. 18). Bei einer OR von 2,26 besteht für die Probanden, die regelmäßig Alkohol konsumieren gegenüber denen, die auf Alkohol verzichten, ein 2,26fach höheres Risiko mit *P. jirovecii* besiedelt zu sein.

Tab. 18. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter und der Gruppe der zahnärztlichen Patienten in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum.

Faktor	Nicht-adjustierte OR	p-Wert	95%-Konfidenzintervall
Alkoholkonsum ja vs. nein*	2,26	0,112	0,826 – 6,161

*Referenzkategorie

6.4 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Tierkontakt“

Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Tierkontakt“ für die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter und die Gruppe der zahnärztlichen Patienten

In der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter ergab sich kein signifikant erhöhtes Risiko einer *P. jirovecii*-Besiedelung bei Probanden mit Tierkontakten (p=0,177). Die Odds Ratio lag bei 2,70, womit Zahnärzte und

zahnärztliche Mitarbeiter mit Tierkontakten ein 2,70fach größeres Risiko haben, mit *P. jirovecii* besiedelt zu sein (Tab. 19).

Tab. 19. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter in Abhängigkeit von Tierkontakten.

Faktor	Nicht-adjustierte OR	p-Wert	95%-Konfidenzintervall
Tierkontakt ja vs. nein*	2,70	0,177	0,639 – 11,389

*Referenzkategorie

Bei den untersuchten zahnärztlichen Patienten mit Tierkontakten ergab sich kein signifikant erhöhtes Risiko einer *P. jirovecii*-Besiedelung (p=0,225). Die Odds Ratio lag bei 2,87, womit zahnärztliche Patienten mit Tierkontakten gegenüber denen ohne Tierkontakte ein 2,870fach erhöhtes Risiko haben, mit *P. jirovecii* besiedelt zu sein (Tab. 20).

Tab. 20. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der zahnärztlichen Patienten in Abhängigkeit von Tierkontakten.

Faktor	Nicht-adjustierte OR	p-Wert	95%-Konfidenzintervall
Tierkontakt ja vs.nein*	2,87	0,225	0,522 – 15,766

*Referenzkategorie

Betrachtet man die Ergebnisse aller Probanden beider Gruppen in Bezug auf bestehende Tierkontakte, ergab sich mit der logistischen Regression kein signifikant erhöhtes Risiko einer *P. jirovecii*-Besiedelung für die Probanden mit Tierkontakten (p=0,062). Die Odds Ratio für beide Gruppen lag bei 2,84 (Tab. 21). Für die Probanden mit Tierkontakten besteht gegenüber denen ohne Tierkontakte ein 2,84fach erhöhtes Risiko, mit *P. jirovecii* zu besiedelt zu sein.

Tab. 21. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter und der Gruppe der zahnärztlichen Patienten in Abhängigkeit von Tierkontakten.

Faktor	Nicht-adjustierte OR	p-Wert	95%-Konfidenzintervall
Tierkontakt ja vs. nein*	2,84	0,062	0,951 – 8,460

*Referenzkategorie

6.5 Besiedelung mit *P. jirovecii* und alle Einflussfaktoren

6.5.1 Besiedelung mit *P. jirovecii* und alle Einflussfaktoren für die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter

Betrachtet man die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter für sich allein, so zeigte sich außer für den Einflussfaktor Alkoholkonsum, für alle anderen Einflussfaktoren Nikotinkonsum, Tierkontakte, Tragen eines Mundschutzes und Tragen von Handschuhen in der univariaten Analyse mit $p<0,20$ ein Einfluss („grenzwertige Signifikanz“) auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* (Tab. 22).

In der multivariaten Analyse wurde deutlich, dass Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter, die „selten“ Handschuhe tragen, gegenüber denen, die „immer“ Handschuhe tragen, ein signifikant erhöhtes Risiko haben, mit *P. jirovecii* besiedelt zu sein ($p=0,030$; adjustierte OR=20,3). Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter, die „selten“ Handschuhe tragen, müssen gegenüber denen, die „immer“ Handschuhe tragen, mit einem 20,3fach erhöhten Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii* rechnen (Tab. 22).

Die multivariate Analyse zeigte außerdem, dass die Raucher unter den Zahnärzten und zahnärztlichen Mitarbeitern gegenüber den Nichtrauchern, ein signifikant höheres Risiko für die Besiedelung mit *P. jirovecii* haben ($p=0,022$; adjustierte OR=7,07). Das Risiko der Besiedelung ist für rauchende Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter 7,07fach höher als für nicht rauchende Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter (Tab. 22).

Die Auswertung der Einflussfaktoren Alkoholkonsum, Tierkontakte und Tragen eines Mundschutzes ergab in der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter weder in der univariaten, noch in der multivariaten Analyse einen signifikanten Einfluss auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* (Tab. 22).

Tab. 22. Resultate der univariaten und multivariaten logistischen Regression für alle Einflussfaktoren für die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter

	Univariate logistische Regression			Multivariate logistische Regression		
Parameter	p Wert	Nicht Adjustierte OR	95% Konfidenzintervall	p Wert	Adjustiertes OR	95% Konfidenzintervall
Tierkontakt						
ja vs. nein*	0,177	2,70	0,64 11,4	0,143	3,16	0,68 14,7
Mundschutz	0,184			0,160		
nicht bzw. selten vs. immer*	0,279	2,67	0,45 15,7	0,209	3,45	0,51 22,1
häufig vs. immer*	0,204	0,24	0,03 2,16	0,212	0,24	0,03 2,23
Handschuhe	0,123			0,090		
selten vs. immer*	0,042	12,0	1,10 131,2	0,030	20,3	1,33 308,1
häufig vs. immer*	0,612	1,60	0,26 9,81	0,495	2,00	0,27 14,7
Nikotinkonsum						
ja vs. nein*	0,027	5,11	1,21 21,7	0,022	7,07	1,32 37,9
Alkoholkonsum						
ja vs. nein*	0,571	1,44	0,41 5,10			

*Referenzkategorie

6.5.2 Besiedelung mit *P. jirovecii* und alle Einflussfaktoren für die Gruppe der zahnärztlichen Patienten

In der Gruppe der zahnärztlichen Patienten zeigte die univariate Analyse, dass die Einflussfaktoren Nikotinkonsum (p=0,051) und Alkoholkonsum (p=0,073) einen Einfluss auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* haben (Tab. 23).

In der univariaten Analyse lag die Odds Ratio für den Einflussfaktor Nikotinkonsum bei 8,75, das heißt, dass die Raucher gegenüber den Nichtrauchern ein 8,75fach erhöhtes Risiko für die Besiedelung mit *P. jirovecii* haben. Die Odds Ratio für die regelmäßig Alkohol trinkenden zahnärztlichen Patienten lag bei 7,32, das heißt, dass

sie ein 7,32fach erhöhtes Risiko der Besiedelung haben. Im Ergebnis der multivariaten Analyse zeigte sich bei beiden Parametern keine Signifikanz.

Tierkontakte haben in der Gruppe der zahnärztlichen Patienten weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse einen signifikanten Einfluss auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* ergeben (Tab. 23).

Die Einflussfaktoren Tragen eines Mundschutzes und Tragen von Handschuhen trafen für die Gruppe der zahnärztlichen Patienten nicht zu und ergaben daher keine verwertbaren Daten für die univariate oder multivariate Regressionsanalyse (Tab. 23).

Tab. 23. Resultate der univariaten und multivariaten logistischen Regression für alle Einflussfaktoren und die Gruppe der zahnärztlichen Patienten.

	Univariate logistische Regression			Multivariate logistische Regression		
Parameter	p Wert	Nicht adjustierte OR	95% Konfidenzintervall	p Wert	Adjustiertes OR	95% Konfidenzintervall
Tierkontakt ja vs. nein*	0,225	2,87	0,52 15,8			
Mundschutz						
Handschuhe						
Nikotinkonsum ja vs. nein*	0,051	8,75	0,99 77,1	0,110	6,15	0,66 57,1
Alkoholkosum ja vs. nein*	0,073	7,32	0,83 64,4	0,169	4,83	0,51 45,4

*Referenzkategorie

6.5.3 Besiedelung mit *P. jirovecii* und alle Einflussfaktoren für die Gruppe der gesunden Probanden aus der Reise- und Impfambulanz

In der Gruppe der Probanden aus der Reise- und Impfambulanz war weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse in Bezug auf die untersuchten Einflussfaktoren ein erhöhtes Risiko für die Besiedelung mit *P. jirovecii* feststellbar (Tab. 24).

Die Einflussfaktoren Tragen eines Mundschutzes und Tragen von Handschuhen trafen für die Gruppe der Probanden aus der Reise- und Impfambulanz nicht zu. Es

waren daher für diese Parameter keine verwertbaren Daten für die univariate und die multivariate Regressionsanalyse vorhanden (Tab. 24).

Tab. 24. Resultate der univariaten und multivariaten logistischen Regression für alle Einflussfaktoren für die Gruppe der Probanden aus der Reise- und Impfambulanz.

	Univariate logistische Regression			Multivariate logistische Regression		
Parameter	p Wert	Nicht adjustierte OR	95% Konfidenzintervall	p Wert	Adjustierte OR	95% Konfidenzintervall
Tierkontakt ja vs. nein*	0,385	0,341	0,03 3,86			
Mundschutz						
Handschuhe						
Nikotinkonsum ja vs. nein*	0,759	0,684	0,06 7,76			
Alkoholkonsum ja vs. nein*	0,453	0,392	0,03 4,54			

*Referenzkategorie

6.5.4 Besiedelung mit *P. jirovecii* und alle Einflussfaktoren für die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter, die Gruppe der zahnärztlichen Patienten und die Gruppe der Probanden aus der Impfambulanz

Bei der Betrachtung der Probanden aus allen 3 Gruppen lag für die Parameter Gruppenzugehörigkeit, Tierkontakte, Tragen eines Mundschutzes, Tragen von Handschuhen und Nikotinkonsum nach der unvariaten Analyse ein Einfluss auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* vor ($p<0,20$). Für den Parameter Alkoholkonsum traf dies nicht zu (Tab. 25).

Die Parameter, die in der univariaten Analyse mit $p<0,20$ zumindest eine „grenzwertige Signifikanz“ zeigten, wurden anschließend einer multivariaten Analyse unterzogen. Es zeigte sich sowohl für die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter ($p<0,001$; adjustierte OR=43,6), als auch für die Gruppe der zahnärztlichen Patienten ($p=0,005$; adjustierte OR=7,17), gegenüber der Gruppe der gesunden Probanden aus der Reise- und Impfambulanz ein signifikant erhöhtes Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii*. Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter haben demnach gegenüber den gesunden Probanden aus der Reise- und

Impfambulanz ein 43,6fach erhöhtes Risiko für die Besiedelung mit *P. jirovecii.* Die Gruppe der zahnärztlichen Patienten weist gegenüber den gesunden Probanden aus der Reise- und Impfambulanz ein 7,17fach erhöhtes Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii* auf (Tab. 25).

Für die Raucher aller drei Gruppen ergab sich in der multivariaten Analyse gegenüber den Nichtrauchern ein signifikant erhöhtes Risiko für die Besiedelung mit *P. jirovecii* (p=0,006; adjustierte OR=4,52). Das Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii* ist für Raucher gegenüber Nichtrauchern 4,52fach erhöht (Tab. 25).

Für die Einflussfaktoren Tierkontakt, Tragen eines Mundschutzes und Tragen von Handschuhen konnten in der multivariaten Analyse keine signifikanten Einflüsse auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* festgestellt werden (Tab. 25).

Tab. 25. Resultate der univariaten und multivariaten logistischen Regression für alle Einflussfaktoren und die Probanden aller drei Gruppen.

	Univariate logistische Regression			**Multivariate logistische Regression**		
Parameter	p Wert	OR	95% Konfidenzintervall	p Wert	Adjustierte OR	95% Konfidenzintervall
Gruppe	0,001				0,001	
Zahnärzte vs. Gesunde*	<0,001	13,2	3,58 48,9	<0,001	43,6	5,87 323
Patienten vs. Gesunde*	0.006	6,87	1,75 27,1	0,005	7,17	1,81 28,4
Tierkontakt						
ja vs. nein*	0,192	1,85	0,73 4,66	0,156	2,05	0,76 5,52
Mundschutz	0,008			0,172		
häufig vs. selten*	0,954	1,07	0,13 8,86	0,062	0,081	0,006 1,13
immer vs. selten*	0,002	4,39	1,72 11,3	0,232	0,331	0,054 2,03
Handschuhe	0,001			0,093		
selten vs. nein*	0,002	43,6	4,19 455	0,031	16,4	1,29 209
häufig vs. nein*	0,049	5,82	1,01 33,5	0,520	1,87	0,28 12,8
immer vs. nein*	0,010	3,64	1,36 9,75			
Nikotin						
ja vs. nein*	0,004	4,11	1,56 10,8	0,006	4,52	1,54 13,2
Alkohol						
ja vs. nein*	0,868	0,93	0,38 2,28			

*Referenzkategorie

7 Diskussion

Das Habitat von *P. jirovecii* beim Menschen sind die Lunge bzw. die Luftwege. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob Personen bestimmter Berufsgruppen, die insbesondere menschlichen Aerosolen ausgesetzt sind, ein erhöhtes Risiko einer *P. jirovecii*-Besiedelung haben. Zahnärzte und ihre Mitarbeiter gehören zu einer solchen Berufsgruppe. Durch den engen räumlichen Kontakt zwischen Behandler, Zahnarzthelfer/-in und Patient und die bei der zahnärztlichen Behandlung auftretenden Aerosole, ist eine gegenseitige Übertragung von Krankheitserregern wie z.B. *P. jirovecii* möglich.

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob Zahnärzte und Mitarbeiter in Zahnarztpraxen tatsächlich häufiger mit *P. jirovecii* besiedelt sind und ob es mögliche Einflussfaktoren für die Besiedelung gibt.

7.1 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Gruppenzugehörigkeit“

Vorangegangene Untersuchungen von induziertem Sputum bei immungesunden Probanden aus der Reise- und Impfambulanz der Universität Rostock, die laut eigener Angaben beruflich keiner besonderen Exposition menschlicher Aerosole ausgesetzt waren, haben ergeben, dass 3 von 119 Untersuchten (2,5%) mit *P. jirovecii* besiedelt waren.

In einer im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Pilotstudie bei 25 Zahnärzten und Zahnarzthelferinnen konnte gezeigt werden, dass 12 Probanden (48,0%) mit *P. jirovecii* besiedelt waren. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass die Mitarbeiter einer Zahnarztpraxis aufgrund der auftretenden Aerosole bei der Behandlung und der engen räumlichen Nähe zu den Atemwegen der Patienten gefährdet sind, eine *P. jirovecii*-Besiedelung zu erlangen. Daraufhin wurde für die vorliegende Studie auf Basis der vorhandenen Daten eine Fallzahlberechnung durchgeführt, um die

Hypothese der vermehrten Besiedelung mit *P. jirovecii* bei Mitarbeitern von Zahnarztpraxen statistisch belegen zu können.

Von den 51 Proben der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter waren 13 Proben in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR und bei der Sequenzierung positiv. Die mtLSU nPCR ist eine sehr spezifische Methode zum Nachweis von *P. jirovecii*, so dass man davon ausgehen kann, dass die Probanden mit *P. jirovecii* besiedelt waren. Das PCR-Ergebnis entsprach einer Besiedelungsrate von 25,5%. Das Ergebnis der statistischen Auswertung durch univariate und multivariate Regressionsanalysen ergab für die Zahnärzte und deren Mitarbeiter ein signifikant erhöhtes Risiko für die Besiedelung mit *P. jirovecii* ($p<0,001$; adjustierte OR=43,6). Demnach haben Mitarbeiter in Zahnarztpraxen gegenüber der Vergleichsgruppe aus der Reise- und Impfambulanz ein 43,6fach erhöhtes Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii*.

Die Hypothese der höheren Besiedelung von Mitarbeitern in Zahnarztpraxen mit *P. jirovecii* konnte damit belegt werden.

In einer weiteren Gruppe wurden 53 Sputumproben von Patienten einer Zahnarztpraxis auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* untersucht. Die 53 Patienten, deren Sputumproben untersucht wurden, befanden sich über einen Zeitraum von 4-8 Wochen in regelmäßiger zahnärztlicher Behandlung. Im Durchschnitt besuchten die Patienten die Praxis in dieser Zeit 2mal.

Für diese Gruppe wurde angenommen, dass das Ergebnis der Untersuchungen im Hinblick auf die Besiedelungsrate im Vergleich zur Gruppe der Zahnärzte und Zahnarzthelfer/-innen, ähnlich niedrig ausfallen würde, wie für die Gruppe der Probanden aus der Reise- und Impfambulanz, da es sich ebenfalls um immungesunde Probanden ohne berufliche Exposition mit Aerosolen menschlicher Körperflüssigkeiten handelte. Die Bedingungen, unter denen das induzierte Sputum gewonnen wurde und die Versuchsanordnung für die Aufbereitung der Sputumproben, waren für alle untersuchten Probanden bzw. Gruppen identisch. Bei den zahnärztlichen Patienten stellte sich jedoch heraus, dass von den 53 untersuchten Sputumproben 8 (15,1%) mit *P. jirovecii* besiedelt waren. Die Besiedelungsrate lag damit deutlich über der Besiedelungsrate bei den Probanden

aus der Reise- und Impfambulanz. Auch das Ergebnis der univariaten und multivariaten Regressionsanalysen ergab für die Patienten der Zahnarztpraxis ein signifikant erhöhtes Risiko für die Besiedelung mit *P. jirovecii* gegenüber der Gruppe aus der Reise- und Impfambulanz (p=0,005; adjustierte OR=7,17). Es besteht demnach für die Patienten der Zahnarztpraxis gegenüber der Vergleichsgruppe aus der Reise- und Impfambulanz ein 7,17fach erhöhtes Risiko für eine Besiedelung mit *P. jirovecii*.

Sowohl die Mitarbeiter in Zahnarztpraxen als auch die zahnärztlichen Patienten der untersuchten Zahnarztpraxis haben gegenüber den Probanden aus der Reise- und Impfambulanz ein signifikant höheres Risiko für die Besiedelung mit *P. jirovecii*.

Verantwortlich dafür könnten zum einen mit *P. jirovecii* kontaminierte Aerosole in der Raumluft der Zahnarztpraxen sein oder auch kontaminierte Arbeits- und Geräteoberflächen. Die DNA von *P. jirovecii* ist in der Raumluft und auf den Oberflächen medizinischer Geräte in Krankenhäusern mittels PCR bereits nachgewiesen worden. Im Rahmen einer Untersuchung stellte sich heraus, dass *Pneumocystis* DNA bei Raumtemperatur und täglicher 2-stündiger UV-Bestrahlung 12 Tage lang auf Oberflächen medizinischer Geräte nachweisbar bleibt. Erst nach der Behandlung der Oberflächen mit 0,1%iger Chlorlösung und der anschließenden UV-Bestrahlung für 30 Minuten waren die PCR- Ergebnisse negativ (Kunakbaeva et al., 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass die Übertragung von *P. jirovecii* von Patienten, die an einer PCP erkrankt waren auf das behandelnde Krankenhauspersonal und Angehörige, die zu den Patienten direkten Kontakt hatten, erfolgte (Vargas et al., 2000). Damit wurde die direkte Übertragung des Erregers von Mensch zu Mensch nachgewiesen.

Einen wesentlichen Einfluss auf den Nachweis von *P. jirovecii* haben die Qualität und die Quantität des Untersuchungsmaterials und die angewandte Untersuchungsmethode. Broncho-alveoläre Lavage, Trachealsekret und induziertes Sputum in ausreichender Menge und Qualität eignen sich besonders gut zum Nachweis von *P. jirovecii* (Riebold et al., 2005).

In einer dänischen Studie wurde Krankenhauspersonal mit und ohne direkten Kontakt zu PCP-Patienten auf das Vorkommen von *P. carinii* (Anmerkung: damals noch nicht *P. jirovecii*) in Mund-Rachen-Spülungen mittels PCR untersucht. Es ergab sich kein Unterschied in der Besiedelung der Mund-Rachen-Spülungen. Auch die Antikörper gegen *P. carinii* waren bei beiden Gruppen gleich (Lundgren et al., 1997). Dieses Ergebnis hinterlässt den Eindruck, dass immungesunde Mitarbeiter, die PCP-Patienten behandeln, keine Infektionsquelle für immunsupprimierte Patienten darstellen. Mund- Rachen-Spülungen scheinen aber nach derzeitigen Erkenntnissen nicht das geeignete Untersuchungsmaterial zu sein, um eine Besiedelung mit *P. jirovecii* nachzuweisen (Matos et al., 2001).

Risikofaktoren, die bei der Besiedelung mit *P. jirovecii* eine Rolle spielen, sind in der Literatur wenig beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, herauszufinden, ob Einflussfaktoren die für alle Probandengruppen zutrafen, wie Nikotinkonsum, Alkoholgenuss und Tierkontakte, eine Besiedelung mit *P. jirovecii* begünstigen. Zusätzlich wurde bei der Gruppe der Zahnärzte und Zahnarzthelferinnen untersucht, welchen Einfluss das Tragen von Mundschutz und Handschuhen auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* haben.

7.2 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Nikotinkonsum“

Durch die univariate und multivariate Regressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass Nikotinkonsum in allen drei Probandengruppen zu einer erhöhten Besiedelungsrate mit *P. jirovecii* führt. Für die Raucher (p=0,006; adjustierte OR=4,52) ergab sich ein signifikant erhöhtes Risiko für die Besiedelung mit *P. jirovecii*. Das Risiko, sich mit *P. jirovecii* zu besiedeln, war bei den Rauchern 4,52fach höher als bei den Nichtrauchern der untersuchten Probandengruppen.

Eine amerikanische Studie, bei der Lungengewebe HIV-Infizierter, die nicht an einer PCP verstorben waren, untersucht wurde, konnte zeigen, dass das Lungengewebe der Raucher signifikant höher mit *Pneumocystis* besiedelt war (p=0,02; OR=4,5). Daraus lässt sich schließen, dass Nikotinkonsum bei HIV-Infizierten Personen ein

unabhängiger Risikofaktor für die Besiedelung mit *Pneumocystis* ist (Morris et al., 2004a).

Bei Immunsupprimierten, deren CD4- Zellzahl unter 200/µl sinkt, ist das Risiko, an einer PCP zu erkranken, groß. Insbesondere bei HIV-Positiven ist die PCP nach wie vor die häufigste tödlich verlaufende opportunistische Infektion. Wenn Nikotinkonsum zu einer höheren Besiedelung bei HIV-Infizierten beiträgt, ist auch das Risiko, tatsächlich an einer PCP zu erkranken, für diesen Personenkreis erhöht.

Eine Studie untersuchte das erhöhte Risiko der Erkrankung an einer PCP und auch an der zu Hause erworbenen Pneumonie (CAP; community acquired pneumonia) bei rauchenden HIV-Patienten. Die rauchenden HIV-Infizierten (p=0,003) mussten signifikant häufiger mit einer Infektion der Atemwege stationär behandelt werden, als die Nichtraucher unter den untersuchten Patienten. Rauchende HIV-Infizierte wurden laut dieser Studie 3 mal häufiger mit einer PCP und 2 mal häufiger mit einer CAP krankenhauspflichtig als nichtrauchende HIV positive Patienten (Miguez-Burbano et al., 2005). Es ist bekannt, dass eine Besiedelung mit *P. jirovecii* bei Immungesunden selten zu einer PCP führt. Wir konnten erstmals zeigen, dass Rauchen bei Immungesunden zu einer vermehrten Besiedelung mit *P. jirovecii* führt. Inwieweit Nikotinkonsum als Risikofaktor der Besiedelung zum vermehrten Auftreten einer PCP bei Immungesunden beiträgt, bleibt offen.

7.3 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Alkohol“

Betrachtet man die Probanden aus allen 3 Gruppen, so lag bei der univariaten und der multivariaten Analyse für den Parameter Alkoholkonsum kein signifikanter Einfluss auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* vor.

Lediglich für die Gruppe der Patienten aus der Zahnarztpraxis konnte bei separater Betrachtung dieser Gruppe in den Resultaten der univariaten Regressionsanalyse für den Parameter Alkoholkonsum (p=0,051; OR=7,32), zumindest ein Trend für die Besiedelung festgestellt werden. Für die zahnärztlichen Patienten, die angaben, regelmäßig in Maßen Alkohol zu trinken, war das Risiko der Besiedelung mit *P.*

jirovecii im Vergleich zu denen, die keinen Alkohol konsumierten, 7,32fach erhöht. Im Ergebnis der multivariaten Analyse zeigte sich für den Parameter Alkoholkonsum jedoch kein signifikanter Einfluss auf die Besiedelung mit *P. jirovecii*.

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass chronischer Alkoholkonsum bei Mäusen die Anfälligkeit der Tiere an einer PCP zu erkranken, erhöht. Ursache dafür ist eine durch den Alkohol bedingte verminderte Einwanderung von T-Lymphozyten in das Lungengewebe und die Beeinträchtigung der Funktion der $CD4^+$-T-Lymphozyten (D'Souza et al., 1995). Die erhöhte Morbidität und Mortalität von Lungenentzündungen bei Alkoholikern kann durch die Beeinträchtigung der Einwanderung von T-Lymphozyten in das erkrankte Gewebe erklärt werden (Shellito & Olariu, 1998). Die $CD4^+$-T-Lymphozyten sind auch von entscheidender Bedeutung bei der Beseitigung von Pneumocysten aus infiziertem Lungengewebe (Hanano, Reifenberg & Kaufmann, 1998). Eine Studie an der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universität Rostock untersuchte die Prävalenz der Besiedelung mit *P. jirovecii* bei Patienten mit chronischem Alkoholkonsum und verglich die Ergebnisse mit immungesunden Probanden. Die Untersuchungen ergaben, dass Alkoholiker signifikant häufiger mit *P. jirovecii* besiedelt waren als die Immungesunden der Vergleichsgruppe (Hörning, 2005).

7.4 Besiedelung mit *P. jirovecii* und der Einflussfaktor „Tierkontakt“

Pneumocystis sp. ist in der jeweiligen spezies-spezifischen Form bei vielen Säugetieren und auch bei Vögeln vorhanden. *Pneumocystis* sp. kann bei den einzelnen Tierspezies ebenfalls Pneumonien verursachen.

Bis zu Beginn der 90er Jahre wurde davon ausgegangen, dass eine Übertragung von tierpathogenen *Pneumocystis*-Spezies auf den Menschen oder zwischen verschiedenen Tierspezies nicht möglich ist (Gigliotti et al., 1993). Dann konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Übertragung von humanpathogenen *P. jirovecii* und tierpathogenen *P. carinii* Stämmen von anderen Tierspezies auf Versuchstiere möglich ist (Dumoulin et al., 2000; Gigliotti, Harmsen & Wright, 2003; Yuezhong, Li & Baoping, 1996). Die Übertragung von *Pneumocystis* innerhalb einer Tierspezies ist

wahrscheinlich, konnte bisher aber nur in Einzelfällen nachgewiesen werden (An, Gigliotti & Harmsen, 2003).

Die Prävalenz von *Pneumocystis* sp. bei Tieren hat besonders in der Nutztierhaltung eine große Bedeutung (Kondo et al., 2000; Settnes & Henriksen, 1989). Die heute weit verbreitete Massentierhaltung erleichtert die Übertragung von Krankheitserregern von infizierten auf gesunde Tiere. Viele unter den Nutztieren verbreitete Krankheitserreger sind auf den Menschen übertragbar (Anthropozoonosen). Betroffen sind vor allem Personen, die mit den Tieren Kontakt haben, z.B. Stallpersonal und Veterinärmediziner. Die Übertragung der Krankheitserreger erfolgt entweder durch direkten Kontakt mit den Tieren, aerogen, durch kontaminierte Kot- und Futterreste oder über Zwischenwirte (Läuse, Flöhe, Wanzen, Zecken, Ratten, Mäuse). Hier stellt sich die Frage, ob Personen, die Kontakt zu den Tieren haben, einer Gefahr der Übertragung von Pneumocysten ausgesetzt sind. Eine in der Literatur beschriebene Untersuchung von Hühnerstallpersonal hat eine erhöhte Besiedelung der Mitarbeiter mit *Pneumocystis* gezeigt. Allerdings konnte nur der humane Stamm der Pneumocysten bei den Mitarbeitern nachgewiesen werden (Riebold, 2007).

Inwieweit die bei Haustieren vorkommenden spezies-spezifischen Pneumocysten eine Gefahr für die Gesundheit des Menschen bedeuten, ist bisher wenig untersucht. Fest steht, dass *Pneumocystis* sowohl beim Menschen als auch bei Tieren, bei Immunschwäche zu Erkrankungen führen kann (Atzori et al., 1999; Hagiwara et al., 2001; Shiota et al., 1990).

Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass bei Menschen mit Tierkontakten ein Trend zur vermehrten Besiedelung mit *P. jirovecii* erkennbar ist (Armstrong et al., 1991). Bei der Betrachtung der Probanden aus allen 3 Gruppen und unter Berücksichtigung aller Einflussfaktoren, lag nach der univariaten Analyse für den Einflussfaktor Tierkontakte zumindest ein Einfluss auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* vor (p=0,19; OR=1,85). Die Probanden, die angaben Tierkontakte zu haben, waren einem 1,85fach höheren Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii* ausgesetzt gegenüber denen, die keine Tierkontakte hatten. In der multivariaten Analyse konnte

für den Parameter Tierkontakte kein signifikanter Einfluss auf die Besiedelung festgestellt werden.

7.5 Besiedelung mit *P. jirovecii* und die Einflussfaktoren „Handschuhe“ und „Mundschutz“

Die Auswertung der eigenen Daten ergab, dass die Einhaltung von Hygienemaßnahmen in der Zahnarztpraxis einen Einfluss auf die Besiedelung der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter mit *P. jirovecii* hat. Das Tragen von Mundschutz und Handschuhen trägt zu einer geringeren Besiedelung mit *P. jirovecii* bei.

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurden die Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter gefragt, wie oft sie mit Mundschutz und Handschuhen arbeiten. Die Annahme, dass Zahnärzte und ihre Mitarbeiter generell mit Mundschutz und Handschuhen am Patienten arbeiten, konnte im Rahmen dieser Studie nicht bestätigt werden. Von den 51 befragten Probanden gaben lediglich 33 (64,7%) an, immer einen Mundschutz zu tragen. 12 Probanden (23,5%) tragen den Mundschutz häufig, 5 (9,8%) selten. Ein Zahnarzt gab an, keinen Mundschutz zu tragen.

In der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter waren von den insgesamt 51 Probanden 13 Probanden (25,5%) in der mtLSU nPCR positiv. Das entsprach einer Besiedelungsrate von 25,5%. Von den 33 Probanden, die angaben, immer einen Mundschutz zu tragen, konnte bei 9 (27,3%) *P. jirovecii* nachgewiesen werden. Von den 12 Probanden, die angaben, häufig einen Mundschutz zu tragen, war nur einer (8,3%) besiedelt. Bei den Zahnärzten und Mitarbeitern, die angegeben hatten, nur selten einen Mundschutz zu tragen, lag die Besiedelungsrate wie erwartet am höchsten. Von diesen 5 Probanden waren 3 (60,0%) mit *P. jirovecii* besiedelt.

Noch deutlicher wird die Bedeutung von Hygienemaßnahmen in der Zahnarztpraxis, bei der Betrachtung der Ergebnisse in Bezug auf das Tragen von Handschuhen. 40 (78,4%) der 51 befragten Probanden gaben an, immer mit Handschuhen zu arbeiten. Von diesen 40 Probanden konnte bei 8 Probanden (20,0%) *P. jirovecii* im

induzierten Sputum nachgewiesen werden. Das entsprach einer Besiedelungsrate von 20%. Von den 7 Zahnärzten und zahnärztlichen Mitarbeitern, die angaben, häufig bei der zahnärztlichen Behandlung Handschuhe zu tragen, waren 2 (28,6%) mit *P. jirovecii* besiedelt. Die Besiedelungsrate lag bei 28,6%. Von den 4 Zahnärzten und zahnärztlichen Mitarbeitern, die selten Handschuhe trugen, waren 3 (75,0%) besiedelt. Das entsprach einer Besiedelungsrate von 75,0%. Interessant zu erwähnen ist hierbei, dass diese 3 Probanden in derselben Zahnarztpraxis beschäftigt waren, wobei eine Stammtypisierung mit der mtLSU nPCR nicht möglich ist.

In Bezug auf das Tragen von Handschuhen bei der zahnärztlichen Behandlung konnte die multivariate Analyse zeigen, dass Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter, die selten Handschuhe tragen, gegenüber denen, die immer Handschuhe tragen, ein signifikant höheres Risiko haben, sich mit *P. jirovecii* zu besiedeln (p=0,030; adjustierte OR=20,3). Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter, die angaben, selten Handschuhe zu tragen, müssen gegenüber denen die immer Handschuhe tragen, von einem 20,3fach erhöhten Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii* ausgehen.

Diese Ergebnisse unterstreichen eindrucksvoll, wie wichtig das Einhalten von Hygienemaßnahmen in einer Zahnarztpraxis ist. Vor dem Hintergrund, dass eine Übertragung von *P. jirovecii* von Mensch zu Mensch möglich ist, können einfach umzusetzende Hygienemaßnahmen dazu beitragen, eine Besiedelung mit dem Erreger zu vermeiden (Mounib et al., 1994) . *P. jirovecii* konnte, wie bereits erwähnt, in verschiedenen medizinischen Einrichtungen in der Raumluft von Patientenzimmern und auf den Oberflächen medizinischer Geräte nachgewiesen werden (Kunakbaeva et al., 2006; Olsson et al., 1998; Wakefield, 1996). Über die Belastung der Raumluft und der Geräte mit *P. jirovecii* in einer Zahnarztpraxis liegen bisher keine Daten vor. Wenn man davon ausgeht, dass *P. jirovecii* als Kommensale in der Bevölkerung vorkommt, liegt die Vermutung nahe, dass aufgrund der bei einer zahnärztlichen Behandlung auftretenden Aerosole die Raumluft der Behandlungszimmer ebenfalls mit *P. jirovecii* belastet ist. Diese Vermutung zu bestätigen, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

In der Literatur gibt es nur wenige Angaben darüber, wie verbreitet das Tragen von Mundschutz und Handschuhen in Zahnarztpraxen ist. Im Rahmen einer in Großbritannien durchgeführten Studie, an der 6.588 Allgemeinzahnärzte des staatlichen Gesundheitswesens (NHS) teilnahmen, gaben 70% der Teilnehmer an, routinemäßig bei der zahnärztlichen Behandlung Handschuhe zu tragen. Nur 36% der Befragten gaben an, mit einem Mundschutz zu arbeiten (Scully et al., 1994). Bei einer in Ontario/Kanada durchgeführten Untersuchung, wurden 5.176 Allgemeinzahnärzte nach ihren Maßnahmen zum Infektionsschutz bei der zahnärztlichen Behandlung befragt. Die Antwortrate lag bei 70%. Aus der Umfrage geht hervor, dass 91,8% der Befragten „immer“ und 7,8% „selten“ mit Handschuhen arbeiten. Bezogen auf das Tragen eines Mundschutzes ergab diese Studie, dass 74,8% „immer“ und 21,1% „selten“ mit einem Mundschutz arbeiten (McCarthy & MacDonald, 1997).

Zahnärzte und Zahnarzthelferinnen, die Handschuhe und Mundschutz tragen, tun dies in erster Linie zum eigenen Schutz vor möglichen Infektionen (HIV, Hepatitis B, HSV, Staphylococcus aureus, MRSA etc.). Zahnärzte und Zahnarzthelfer/-innen stellen aber auch für ihre Patienten ein Infektionsrisiko dar und sollten zum Schutz der Patienten auf Handschuhe und Mundschutz nicht verzichten.

Die eigenen Erhebungen und die Beispiele aus der Literatur zeigen, dass das Infektionsrisiko bei der zahnärztlichen Behandlung häufig unterschätzt wird. Regelmäßige Aufklärung über mögliche Infektionsrisiken sind notwendig, um Zahnärzte und ihre Mitarbeiter zu motivieren, alle empfohlenen Infektionsschutzmaßnahmen konsequent durchzuführen.

8 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	acquired immunodeficiency syndrom
BAL	Broncho-alveoläre-Lavage
BGA	Blutgasanalyse
bp	Basenpaar(e)
CAP	community acquired pneumonia; zu Hause erworbene Pneumonie
C°	Grad Celsius
CD4	cluster of differentiation, Erkennungsprotein auf der Oberfläche von T-Helferzellen, Monozyten und Makrophagen
CPAP	continuous positive airway pressure, kontinuierlich positiver Beatmungsdruck
CRP	C-reaktives Protein, Entzündungsparameter
CT	Computertomographie
DFT	Direkter Immunfluoreszenztest
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
g	Erd(schwere)beschleunigung ($g=9{,}81 m/s^2$)
GEBS	gel sample buffer, Gel-Proben-Puffer
HAART	highly active antiretroviral therapy, Hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV	human immunodeficiency virus, Humanes Immundefizienz Virus
i.v.	Intravenös
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
LDH	Laktatdehydrogenase

M	Molar
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
min	Minute
MRSA	methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
mtLSU	mitochondrial transcribed large subunit rRNA Gen
NHS	National Health Services
nPCR	nested PCR, geschachtelte PCR
OR	Odds Ratio
p	probability (Messgröße für die statistische Signifikanz)
Pat.	Patient
p.o.	per os, orale Einnahme
PCP	*Pneumocystis* Pneumonie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
P. jirovecii	*Pneumocystis jirovecii*
PO_2	Sauerstoffpartialdruck
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
ZÄ	Zahnärzte
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. *Pneumocystis* sp. Lebenszyklus (nach Matsumoto und Yoshida) 8
Abb. 2. Grocott Färbung von *P. jirovecii* 12
Abb. 3. Giemsa Färbung von *P. jirovecii* 13
Abb. 4. Schematische Darstellung: PCR-Prinzip (nach Riebold 2007) 27
Abb. 5. Schematische Darstellung: Prinzip der nPCR (nach Riebold 2007) 28
Abb. 6. PCR Stufe 1…….. 32
Abb. 7. PCR Stufe 2……..... 32
Abb. 8. Beispiel für die Berechnung der Odds Ratio mit den Zahlen der Tab. 5..... 35
Abb. 9. PCR Stufe 2 37

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Medikamente zur Therapie der PCP (Hoffmann 2005)..... 16
Tab. 2 . Medikamente zur Prophylaxe der PCP (Hoffmann 2005)..... 18
Tab. 3. *P. jirovecii* mtLSU rRNA Gen nPCR. Primer und PCR-Programm Stufe 1 .. 30
Tab. 4. *P. jirovecii* mtLSU rRNA Gen nPCR. Primer und PCR-Programm Stufe 2 .. 30
Tab. 5. Anzahl der nPCR positiven Proben in der Gruppe der Zahnärzte und Mitarbeiter und in der Gruppe der zahnärztlichen Patienten für das Berechnungsbeispiel der Odds Ratio (OR)..... 35
Tab. 6. Gruppe der Zahnärzte und Zahnarzthelferinnen (1), zahnärztlichen Patienten (2) und der Gruppe der Reise- und Impfambulanz (3)..... 36
Tab. 7. Positive PCR-Ergebnisse in der Gruppe der Zahnärzte und der zahnärztlichen Mitarbeiter insgesamt, bei Rauchern, Konsumenten von Alkohol..... 38
Tab. 8. Ergebnisse der mtLSU nPCR 2.Stufe für Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter. Einflussfaktor Tragen von Handschuhen. 39
Tab. 9. Ergebnisse der mtLSU nPCR 2.Stufe für Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter. Einflussfaktor Tragen eines Mundschutzes. 39
Tab. 10. Positive nPCR-Ergebnisse in der Gruppe der zahnärztlichen Patienten insgesamt, bei Rauchern, Konsumenten von Alkohol und Probanden mit Tierkontakt..... 40
Tab. 11. Positive nPCR-Ergebnisse in der Gruppe der Kontrollen (Reise- und Impfambulanz) insgesamt, bei Rauchern, Konsumenten von Alkohol und Tierkontakten..... 41
Tab. 12. Besiedelung mit *P.jirovecii* in der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter und der Gruppe der zahnärztlichen Patienten in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit..... 42
Tab. 13. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter in Abhängigkeit vom Nikotinkonsum..... 42
Tab. 14. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der zahnärztlichen Patienten in Abhängigkeit vom Nikotinkonsum..... 43
Tab. 15. Besiedelung mit *P.jirovecii* in der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter und der Gruppe der zahnärztlichen Patienten in Abhängigkeit vom Nikotinkonsum..... 43

Tab. 16. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum 44
Tab. 17. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der zahnärztlichen Patienten in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum 45
Tab. 18. Besiedelung mit *P.jirovecii* in der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter und der Gruppe der zahnärztlichen Patienten in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum 45
Tab. 19. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter in Abhängigkeit von Tierkontakten 46
Tab. 20. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der zahnärztlichen Patienten in Abhängigkeit von Tierkontakten 46
Tab. 21. Besiedelung mit *P. jirovecii* in der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter und der Gruppe der zahnärztlichen Patienten in Abhängigkeit von Tierkontakten 47
Tab. 22. Resultate der univariaten und multivariaten logistischen Regression für alle Einflussfaktoren für die Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter 48
Tab. 23. Resultate der univariaten und multivariaten logistischen Regression für alle Einflussfaktoren und die Gruppe der zahnärztlichen Patienten 49
Tab. 24. Resultate der univariaten und multivariaten logistischen Regression für alle Einflussfaktoren für die Gruppe der Probanden aus der Reise- und Impfambulanz 50
Tab. 25. Resultate der univariaten und multivariaten logistischen Regression für alle Einflussfaktoren und die Probanden aller drei Gruppen 51

11 Literaturverzeichnis

1. ALIOUAT EL, M., DUJARDIN, L., MARTINEZ, A., DURIEZ, T., RICARD, I. & DEI-CAS, E. (1999). Pneumocystis carinii growth kinetics in culture systems and in hosts: involvement of each life cycle parasite stage. *J Eukaryot Microbiol* **46,** 116-117.

2. AN, C. L., GIGLIOTTI, F. & HARMSEN, A. G. (2003). Exposure of immunocompetent adult mice to Pneumocystis carinii f. sp. muris by cohousing: growth of P. carinii f. sp. muris and host immune response. *Infect Immun* **71,** 2065-70.

3. ARMSTRONG, M. Y., SMITH, A. L. & RICHARDS, F. F. (1991). Pneumocystis carinii pneumonia in the rat model. *J Protozool* **38,** 136-138.

4. ATZORI, C., AGOSTONI, F., ANGELI, E., MAININI, A., MICHELI, V. & CARGNEL, A. (1999). P.carinii host specificity: attempt of cross infections with human derived strains in rats. *J Eukaryot Microbiol* **46,** 112.

5. BENFIELD, T. L., HELWEG-LARSEN, J., BANG, D., JUNGE, J. & LUNDGREN, J. D. (2001). Prognostic markers of short-term mortality in AIDS-associated Pneumocystis carinii pneumonia. *Chest* **119,** 844-51.

6. CHABE, M., DEI-CAS, E., CREUSY, C., FLEURISSE, L., RESPALDIZA, N., CAMUS, D. & DURAND-JOLY, I. (2004). Immunocompetent hosts as a reservoir of pneumocystis organisms: histological and rt-PCR data demonstrate active replication. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23,** 89-97.

7. CHAGAS, C. (1909). Über eine neue Trypanosomiasis des Menschen. *Archiv f Schiffs Trop Hyg* **13,** 351-353.

8. CONFALONIERI, M., CALDERINI, E., TERRACIANO, S., CHIDINI, G., CELESTE, E., PUCCIO, G., GREGORETTI, C. & MEDURI, G. U. (2002). Noninvasive ventilation for treating acute respiratory failure in AIDS patients with Pneumocystis carinii pneumonia. *Intensive Care Med* **28,** 1233-8.

9. D'SOUZA, N. B., MANDUJANO, J. F., NELSON, S., SUMMER, W. R. & SHELLITO, J. E. (1995). Alcohol ingestion impairs host defenses predisposing otherwise healthy mice to Pneumocystis carinii infection. *Alcohol Clin Exp Res* **19,** 1219-25.

10. DUMOULIN, A., MAZARS, E., SEGUY, N., GARGALLO-VIOLA, D., VARGAS, S., CAILLIEZ, J. C., ALIOUAT, E. M., WAKEFIELD, A. E. & DEI-CAS, E. (2000). Transmission of Pneumocystis carinii disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19,** 671-8.

11. FATKENHEUER, G., FRANZEN, C., HARTMANN, P., WASSERMANN, K., SCHRAPPE, M., DOLKEN, W., DIEHL, V. & SALZBERGER, B. (1997). [Cystic form of Pneumocystis carinii pneumonia]. *Dtsch Med Wochenschr* **122,** 1441-6.

12. FIETKAU, R., ZETTL, H., KLÖCKING, S. & KUNDT, G. (2004). Incidence, therapy and prognosis of colorectal cancer in different age groups – a population-based cohort study of the Rostock Cancer Registry. *Strahlenther Onkol* **180,** 478-487.

13. GAYET-AGERON, A., BARATIN, D., MARCEILLAC, E., ALLARD, R., PEYRAMOND, D., CHIDIAC, C., TREPO, C., LIVROZET, J. M., TOURAINE, J. L., RITTER, J., SEPETJAN, M., FABRY, J. & VANHEMS, P. (2004). The AIDS epidemic in Lyon: patient characteristics and defining illnesses between 1985 and 2000. *HIV Med* **5,** 163-70.

14. GIGLIOTTI, F., HARMSEN, A. G., HAIDARIS, C. G. & HAIDARIS, P. J. (1993). Pneumocystis carinii is not universally transmissible between mammalian species. *Infect Immun* **61,** 2886-90.

15. GIGLIOTTI, F., HARMSEN, A. G. & WRIGHT, T. W. (2003). Characterization of transmission of Pneumocystis carinii f. sp. muris through immunocompetent BALB/c mice. *Infect Immun* **71,** 3852-6.

16. HAGIWARA, Y., FUJIWARA, S., TAKAI, H., OHNO, K., MASUDA, K., FURUTA, T., NAKAYAMA, H., DOI, K. & TSUJIMOTO, H. (2001). Pneumocystis carinii pneumonia in a Cavalier King Charles Spaniel. *J Vet Med Sci* **63,** 349-51.

17. HANANO, R. & KAUFMANN, S. H. (1998). Pneumocystis carinii and the immune response in disease. *Trends Microbiol* **6,** 71-5.

18. HANANO, R., REIFENBERG, K. & KAUFMANN, S. H. (1998). Activated pulmonary macrophages are insufficient for resistance against Pneumocystis carinii. *Infect Immun* **66,** 305-14.

19. HOFFMANN, C. (2003). Pneumocystis Pneumonie (PCP). In *HIV.NET 2003* (ed. C. Hoffmann und B. S. Kamps). Steinhäuser Verlag, Wuppertal.

20. HOFFMANN, C. (2005). Pneumocystis Pneumonie (PCP). In *HIV.NET 2005* (ed. C. Hoffmann und B. S. Kamps). Steinhäuser Verlag, Wuppertal.

21. HÖRNING, M., Riebold, D., Niebuhr, J., Munk, A.K., Broese, T., Herpertz, S. und Reisinger, E.C. (2005). Prävalenz der Besiedelung mit Pneumocystis jirovecii bei Patienten mit chronischem Alkoholabusus im Vergleich zu immungesunden Probanden. Poster. 8. Kongress für Infektions- und Tropenkrankheiten. Hamburg.

22. KOLETAR, S. L., HEALD, A. E., FINKELSTEIN, D., HAFNER, R., CURRIER, J. S., MCCUTCHAN, J. A., VALLEE, M., TORRIANI, F. J., POWDERLY, W. G., FASS, R. J. & MURPHY, R. L. (2001). A prospective study of discontinuing primary and secondary Pneumocystis carinii pneumonia prophylaxis after CD4 cell count increase to > 200 x 10^6 /l. *Aids* **15,** 1509-15.

23. KONDO, H., HIKITA, M., ITO, M. & KADOTA, K. (2000). Immunohistochemical study of Pneumocystis carinii infection in pigs: evaluation of Pneumocystis pneumonia and a retrospective investigation. *Vet Rec* **147,** 544-9.

24. KUNAKBAEVA, A. F., KARAZHAS, N. V., ZIGANGIROVA, N. A., RYBALKINA, T. N., GALSTIAN, G. M., OSMANOV, E. A., PETROSOV, V. V., BOSH'IAN, R. E., SAVITSKAIA, N. V., FEKLISOVA, L. V. & IUDITSKII, M. V. (2006). [Detection of Pneumocystis carinii DNA in air and washes from medical equipment in hospitals]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol***,** 100-3.

25. LOPEZ BERNALDO DE QUIROS, J. C., MIRO, J. M., PENA, J. M., PODZAMCZER, D., ALBERDI, J. C., MARTINEZ, E., COSIN, J., CLARAMONTE, X., GONZALEZ, J., DOMINGO, P., CASADO, J. L. & RIBERA, E. (2001). A randomized trial of the discontinuation of primary and secondary prophylaxis against Pneumocystis carinii pneumonia after highly active antiretroviral therapy in patients with HIV infection. Grupo de Estudio del SIDA 04/98. *N Engl J Med* **344,** 159-67.

26. LUNDGREN, B., ELVIN, K., ROTHMAN, L. P., LJUNGSTROM, I., LIDMAN, C. & LUNDGREN, J. D. (1997). Transmission of Pneumocystis carinii from patients to hospital staff. *Thorax* **52,** 422-4.

27. MATOS, O., COSTA, M. C., LUNDGREN, B., CALDEIRA, L., AGUIAR, P. & ANTUNES, F. (2001). Effect of oral washes on the diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia with a low parasite burden and on detection of organisms in subclinical infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20,** 573-5.

28. MCCARTHY, G. M. & MACDONALD, J. K. (1997). The infection control practices of general dental practitioners. *Infect Control Hosp Epidemiol* **18,** 699-703.

29. MIGUEZ-BURBANO, M. J., ASHKIN, D., RODRIGUEZ, A., DUNCAN, R., PITCHENIK, A., QUINTERO, N., FLORES, M. & SHOR-POSNER, G. (2005). Increased risk of Pneumocystis carinii and community-acquired pneumonia with tobacco use in HIV disease. *Int J Infect Dis* **9,** 208-17.

30. MORRIS, A., KINGSLEY, L. A., GRONER, G., LEBEDEVA, I. P., BEARD, C. B. & NORRIS, K. A. (2004a). Prevalence and clinical predictors of Pneumocystis colonization among HIV-infected men. *Aids* **18,** 793-8.

31. MORRIS, A., LUNDGREN, J. D., MASUR, H., WALZER, P. D., HANSON, D. L., FREDERICK, T., HUANG, L., BEARD, C. B. & KAPLAN, J. E. (2004b). Current epidemiology of Pneumocystis pneumonia. *Emerg Infect Dis* **10,** 1713-20.

32. MOUNIB, B., CABANE, J., BLUM, L., PICARD, O., WATTIAUX, M. J. & IMBERT, J. C. (1994). [Risk of nosocomial Pneumocystis carinii pneumonia in immunosuppressed patients non-infected by human immunodeficiency viruses]. *Rev Med Interne* **15,** 95-100.

33. MÜLHARDT, C. (2006). *Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*, 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, München.

34. NG, V. L., YAJKO, D. M. & HADLEY, W. K. (1997). Extrapulmonary pneumocystosis. *Clin Microbiol Rev* **10,** 401-18.

35. OLSSON, M., LIDMAN, C., LATOUCHE, S., BJORKMAN, A., ROUX, P., LINDER, E. & WAHLGREN, M. (1998). Identification of Pneumocystis carinii f. sp. hominis gene sequences in filtered air in hospital environments. *J Clin Microbiol* **36,** 1737-40.

36. RAVIGLIONE, M. C. (1990). Extrapulmonary pneumocystosis: the first 50 cases. *Rev Infect Dis* **12,** 1127-38.

37. RIEBOLD, D. (2007). Pneumocystis jirovecii - Optimierung der Diagnostik, Evaluierung des therapeutischen Effekts und Erregerreservoire. Doktorarbeit an der Universität Rostock.

38. RIEBOLD, D., FRITZSCHE, C., LADEMANN, M. & REISINGER, E. C. (2005). Laboratory diagnosis of Pneumocystis pneumonia--new developments. *Dtsch Med Wochenschr* **130,** 1377-80.

39. RIEBOLD, D., LADEMANN, M., MÖLLER, F.-W., DREßLER, M. & REISINGER, E.C. (2003). *Pneumocystis jirovecii*. In *Infektiologie - Aktuelle Aspekte - Jahrbuch 2003/2004* (ed. O. Janata und E.C. Reisinger). pm Verlag, Wien.

40. ROBLOT, F. (2005). Management of Pneumocystis pneumonia in patients with inflammatory disorders. *Expert Rev Anti Infect Ther* **3,** 435-44.

41. SCHNEIDER, M. M., BORLEFFS, J. C., STOLK, R. P., JASPERS, C. A. & HOEPELMAN, A. I. (1999). Discontinuation of prophylaxis for Pneumocystis carinii pneumonia in HIV-1-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *Lancet* **353,** 201-3.

42. SCULLY, C., BLAKE, C., GRIFFITHS, M. & LEVERS, H. (1994). Protective wear and instrument sterilisation/disinfection in UK general dental practice. *Health Trends* **26,** 21-2.

43. SERRAINO, D., PURO, V., BOUMIS, E., ANGELETTI, C., GIRARDI, E., PETROSILLO, N. & IPPOLITO, G. (2003). Epidemiological aspects of major opportunistic infections of the respiratory tract in persons with AIDS: Europe, 1993-2000. *Aids* **17,** 2109-16.

44. SETTNES, O. P. & HENRIKSEN, S. A. (1989). Pneumocystis carinii in large domestic animals in Denmark. A preliminary report. *Acta Vet Scand* **30,** 437-40.

45. SHELLITO, J. E. & OLARIU, R. (1998). Alcohol decreases T-lymphocyte migration into lung tissue in response to Pneumocystis carinii and depletes T-lymphocyte numbers in the spleens of mice. *Alcohol Clin Exp Res* **22,** 658-63.

46. SHIOTA, T., SHIMADA, Y., KURIMOTO, H. & OIKAWA, H. (1990). Pneumocystis carinii infection in corticosteroid-treated cats. *J Parasitol* **76,** 441-5.

47. SOWDEN, E. & CARMICHAEL, A. J. (2004). Autoimmune inflammatory disorders, systemic corticosteroids and pneumocystis pneumonia: a strategy for prevention. *BMC Infect Dis* **4,** 42.

48. STELLBRINK, H. J. & PRAMOD, M. S. (2005). *Infektionskrankheiten*, 12. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

49. STRINGER, J. R., BEARD, C. B., MILLER, R. F. & WAKEFIELD, A. E. (2002). A new name (Pneumocystis jiroveci) for Pneumocystis from humans. *Emerg Infect Dis* **8,** 891-6.

50. TOTET, A., MELIANI, L., LACUBE, P., PAUTARD, J. C., RACCURT, C., ROUX, P. & NEVEZ, G. (2003). Immunocompetent infants as a human reservoir for Pneumocystis jirovecii: rapid screening by non-invasive sampling and real-time PCR at the mitochondrial large subunit rRNA gene. *J Eukaryot Microbiol* **50 Suppl,** 668-9.

51. VARGAS, S. L., PONCE, C. A., GIGLIOTTI, F., ULLOA, A. V., PRIETO, S., MUNOZ, M. P. & HUGHES, W. T. (2000). Transmission of Pneumocystis carinii DNA from a patient with P. carinii pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *J Clin Microbiol* **38,** 1536-8.

52. WAKEFIELD, A. E. (1996). DNA sequences identical to Pneumocystis carinii f. sp. carinii and Pneumocystis carinii f. sp. hominis in samples of air spora. *J Clin Microbiol* **34,** 1754-9.

53. WEVERLING, G. J., MOCROFT, A., LEDERGERBER, B., KIRK, O., GONZALES-LAHOZ, J., D'ARMINIO MONFORTE, A., PROENCA, R., PHILLIPS, A. N., LUNDGREN, J. D. & REISS, P. (1999). Discontinuation of Pneumocystis carinii pneumonia prophylaxis after start of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. EuroSIDA Study Group. *Lancet* **353,** 1293-8.

54. YUEZHONG, Y., LI, Z. & BAOPING, T. (1996). Pneumonia in cats caused by Pneumocystis carinii purified from mouse lungs. *Vet Parasitol* **61,** 171-5.

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik und Werkstoffkunde
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. H. von Schwanewede)
der
Klinik und Polikliniken für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. habil. H. von Schwanewede)
und
der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. E. C. Reisinger)
der
Klinik für Innere Medizin
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. habil. R. Schmidt)
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Die Prävalenz von *Pneumocystis jirovecii* bei zahnärztlichem Personal und zahnärztlichen Patienten

Thesen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin
(Dr. med. dent.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Kathrin Dargatz
geboren am 29.10.1967 in Schönebeck/Elbe
Rostock, 2007

Dekan: Prof. Dr. med. habil. E. C. Reisinger

1) *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) ist ein ubiquitär vorkommender Pilz. Sowohl Gesunde, als auch immunsupprimierte Personen können mit *P. jirovecii* besiedelt sein. Die Besiedelung ist beim Menschen und auch bei Tieren hauptsächlich auf die Lunge begrenzt. *P. jirovecii*, als der Erreger der *Pneumocystis* Pneumonie (PCP), wird aerogen über kontaminierte Tröpfchen und Staub sowie durch Schmierinfektion übertragen.

2) In der vorliegenden Arbeit sollte nachgewiesen werden, ob und in welchem Maße, Zahnärzte und Mitarbeiter in zahnärztlichen Praxen im Vergleich zu zahnärztlichen Patienten bzw. zur gesunden Bevölkerung mit *P. jirovecii* besiedelt sind. Aufgrund der engen räumlichen Nähe zwischen Patient und Behandler, insbesondere bei der zahnärztlichen Behandlung und der dabei auftretenden Aerosole, lag die Vermutung nahe, dass der Erreger bei Zahnärzten und ihren Mitarbeitern häufiger in Bezug auf die immungesunde Bevölkerung nachzuweisen ist.

3) Der labordiagnostische Nachweis von *P. jirovecii* erfolgte aus induziertem Sputum mit Hilfe einer für *P. jirovecii* spezifischen nested PCR (verschachtelte Polymerase-Kettenreaktion).

4) Die Ergebnisse belegen, dass Zahnärzte und ihre Mitarbeiter gegenüber ihren Patienten und auch gegenüber der immungesunden Bevölkerung, ein höheres Risiko haben, mit *P. jirovecii* besiedelt zu sein. Univariate und multivariate Regressionsanalysen ergaben für die Zahnärzte und deren Mitarbeiter ein signifikant erhöhtes Risiko für die Besiedelung mit *P. jirovecii* ($p<0,001$; adjustierte OR=43,6). Demnach haben diese gegenüber der immungesunden Bevölkerung ein 43,6fach erhöhtes Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii*.

5) Für die zahnärztlichen Patienten machen univariate und multivariate Regressionsanalysen ebenfalls ein signifikant erhöhtes Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii* ($p<0,005$; OR=7,17) deutlich. Es besteht im unmittelbaren Zeitraum der Behandlung demnach ein 7,17fach erhöhtes

Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii* gegenüber der immungesunden Bevölkerung.

6) Als mögliche Ursachen für das gesteigerte Besiedelungsrisiko mit *P. jirovecii* in einer Zahnarztpraxis, sowohl bei den Mitarbeitern als auch bei den behandelten Patienten, können kontaminierte Aerosole in der Raumluft oder auch kontaminierte Arbeitsoberflächen angesehen werden. Die erhöhte Prävalenz von *P. jirovecii* bei Zahnärzten und zahnärztlichen Mitarbeitern gegenüber der immungesunden Bevölkerung konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden.

7) Die erhöhte Prävalenz von *P. jirovecii* bei Zahnärzten und deren Mitarbeitern unterstreicht die Dringlichkeit der Einhaltung, der bei der zahnärztlichen Behandlung notwendigen Hygienemaßnahmen, insbesondere das Tragen von Mundschutz und Handschuhen. Durch die konsequente Einhaltung der Hygienemaßnahmen müssen besonders die immunsupprimierten Patienten vor einer Infektion mit *P. jirovecii* geschützt werden, da bei diesen Patienten die Gefahr an einer PCP zu erkranken erhöht ist.

8) Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob Einflussfaktoren wie Rauchen, Alkoholkonsum, Tierkontakte und bei den Zahnärzten und zahnärztlichen Mitarbeitern, das Tragen von Mundschutz und Handschuhen eine Besiedelung mit *P. jirovecii* begünstigen.

9) Bei immunsupprimierten Patienten konnte post mortem gezeigt werden, dass vorausgegangener Nikotinkonsum das Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii* erhöht. Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass bei allen immungesunden Probanden die angegeben hatten zu rauchen ein signifikant erhöhtes Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii* besteht ($p<0,006$; $OR=4,52$). Die Raucher haben demnach ein 4,52fach erhöhtes Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii* gegenüber den Nichtrauchern. Nikotinkonsum konnte erstmals als unabhängiger Einflussfaktor bei lebenden Immungesunden nachgewiesen werden. Er erhöht das Besiedelungsrisiko mit *P. jirovecii*.

10) Untersuchungen chronisch alkoholabhängiger Patienten haben ergeben, dass Alkoholiker signifikant häufiger mit *P. jirovecii* besiedelt sind als immungesunde Probanden. Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass für den Einflussfaktor Alkoholkonsum kein signifikant höheres Besiedelungsrisiko festgestellt werden konnte. Lediglich in der Gruppe der zahnärztlichen Patienten war für den Einflussfaktor Alkoholkonsum nach univariater und multivariater Regressionsanalyse, zumindest ein Trend für eine höhere Besiedelung mit *P. jirovecii* zu eruieren (p=0,051; OR=7,32). Univariate und multivariate Regressionsanalyse für den Einflussfaktor Alkoholkonsum lassen bei mäßigem Alkoholgenuss kein signifikant höheres Besiedelungsrisiko mit *P. jirovecii* erkennen.

11) Für den Einflussfaktor Tierkontakte lag, nach der univariaten Analyse, zumindest ein Einfluss auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* vor (p=0,19; OR=1,85). Das Risiko der Besiedelung mit *P. jirovecii* ist demnach bei vorliegenden Tierkontakten 1,85fach erhöht. In der multivariaten Analyse wurde kein signifikanter Einfluss von Tierkontakten auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* festgestellt.

12) In der Gruppe der Zahnärzte und zahnärztlichen Mitarbeiter wurden das Tragen von Mundschutz und Handschuhen als mögliche Einflussfaktoren auf die Besiedelung mit *P. jirovecii* untersucht. In der multivariaten Analyse konnte gezeigt werden, dass Zahnärzte und zahnärztliche Mitarbeiter, die selten Handschuhe tragen, gegenüber denen, die immer Handschuhe tragen, ein signifikant höheres Risiko haben, sich mit *P. jirovecii* zu besiedeln (p=0,03; OR=20,3).

13) Vor dem Hintergrund der Möglichkeit einer Übertragung von *P. jirovecii* von Mensch zu Mensch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich, wie wichtig die Einhaltung von einfach umzusetzenden Hygienemaßnahmen bei der zahnärztlichen Behandlung ist.

14) Die eigenen Erhebungen darüber, wie verbreitet das Tragen von Handschuhen und Mundschutz in den Zahnarztpraxen ist, unterstreichen,

dass das Infektionsrisiko bei der zahnärztlichen Behandlung häufig unterschätzt wird. Regelmäßige Aufklärung der Zahnärzte und ihrer Mitarbeiter über mögliche Infektionsrisiken bei der zahnärztlichen Behandlung und im Umgang mit kontaminierten Geräte- und Arbeitsoberflächen sind notwendig, um einen sicheren Infektionsschutz sowohl für die Patienten, als auch für die Mitarbeiter der Zahnarztpraxen, zu gewährleisten.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation „Die Prävalenz von *Pneumocystis jirovecii* bei zahnärztlichem Personal und zahnärztlichen Patienten“ selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Die für die Ausführung der Dissertation verwendeten Quellen und Hilfsmittel wurden von mir angegeben und die aus den Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Rostock, den 31.08.2007

Kathrin Dargatz

Lebenslauf

Persönliche Daten	Name	Kathrin Dargatz
	Geburtstag	29. Oktober 1967
	Geburtsort	Schönebeck/Elbe
	Familienstand	ledig
Schulbildung	1974 – 1984	Polytechnische Oberschule
	1984 – 1986	Erweiterte Oberschule
	1986	Abitur
Praktikum	1986 – 1987	Pflegepraktikum im Klinikum Südstadt in Rostock
Hochschulbildung	1987 – 1992	Studium der Zahnmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Beruflicher Werdegang	1992 – 1994	Assistenzzahnärztin in Hamburg Zahnarztpraxis J. Plume
	1994 – 1995	Assistenzzahnärztin in Ribnitz-Damgarten Zahnarztpraxis Dr. K. Ziegler
	1995 –	Niederlassung in eigener Praxis in Rostock

Rostock, den 31.08.2007

Kathrin Dargatz

Danksagungen

Ein herzlicher Dank gilt meinen beiden Betreuern, Prof. Dr. med. habil. Heinrich von Schwanewede und Prof. Dr. med. habil. Emil Christian Reisinger, für ihre fachliche Beratung bei der Betreuung, ihre konstruktive Kritik und für ihre Geduld beim Durcharbeiten der Entwürfe der vorliegenden Arbeit.

Meinen besonderen Dank richte ich an PD Dr. Günther Kundt, der mich mit den Geheimnissen der statistischen Analysen bekannt machte. Geduldig ertrug er meine Fragen und unterstützte mich bei der Auswertung der gewonnenen Daten.

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich der Leiterin des Parasitologischen Labors der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universität Rostock, Frau Dr. Diana Riebold und ihrem Team, aussprechen. Frau Dr. Riebold stand mir zu Fragen der labordiagnostischen Methoden jederzeit mit ihrem Wissen zur Seite und war mir bei der Gestaltung der Arbeit eine unentbehrliche Hilfe.

Frau Maria Hörning danke ich für die Überlassung der Probandendaten aus der Reise- und Impfambulanz der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock.

Ein besonders lieber Dank geht an meine Mitarbeiterinnen Frau Doreen Schwarz und Frau Manuela Jurkschat. Seit über zehn Jahren stehen sie mir in der Praxis zur Seite und haben auch diese Hürde mit mir genommen. Danke.

Sehr verbunden bin ich meiner Freundin, Frau Kerstin Grimm, die der deutschen Sprache sehr zugetan, die Korrektur der Arbeit übernommen hat. Ohne ihren Rotstift wären einige Satzzeichen weniger vorhanden.

An dieser Stelle möchte ich allen Mitarbeitern der Zahnarztpraxen danken, die an dieser Studie teilgenommen haben und ohne deren freundliche Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht zustande gekommen wäre.