

Zur ätiologischen Bedeutung des Zytomegalie-Virus für die Parodontitis und die akute nekrotisierende ulzerative Gingivitis

Zusammenfassung

In der Literatur wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Zytomegalie-Virus (ZMV) eine ätiologische Rolle für die Gingivitis und Parodontitis, speziell für die akute nekrotisierende ulzerative Gingivitis (ANUG) spielt. Ziel der Studie war es, klinische und mikrobiologische Daten zur Prüfung dieser Hypothese zu sammeln. Zu diesem Zweck wurden bei verschiedenen Probandengruppen klinische Parameter erhoben, Serum auf Antikörper gegen ZMV sowie Speichel und Taschenflüssigkeit auf das Vorhandensein des Virus untersucht. Von 37 Parodontitispatienten waren 37,8% seropositiv, aber bei keinem konnte Virus in Speichel oder Taschenflüssigkeit nachgewiesen werden. Die klinischen Parameter waren bei den seropositiven Patienten nicht stärker ausgeprägt als bei den seronegativen. Sieben weitere Patienten, bei denen eine akute ZMV-Infektion diagnostiziert worden war, wiesen drei bis 16 Wochen später keine auffälligen gingivalen oder parodontalen Messgrößen auf. Bei keinem dieser Patienten wurde Virus aus Taschenflüssigkeit isoliert. Von zehn ANUG-Patienten waren acht seropositiv, aber auch bei diesen liess sich kein Virus nachweisen. Einundzwanzig Taschenproben dieser ANUG-Patienten wurden mit der PCR Technik auf ZMV-DNS untersucht. In vier der 16 Proben (25%) von sieben seropositiven Patienten wurde ZMV-DNS nachgewiesen. Diese Daten können bei unseren Probanden eine ätiologische Rolle von ZMV bei der ANUG vermuten lassen.

Acta Med Dent Helv 4: 86–92 (1999)

Schlüsselwörter: ZMV, ANUG, Parodontitis

Zur Veröffentlichung angenommen: 17. Februar 1999

JEAN-PIERRE EBNER^{1,2}, CATHERINE WEBER^{1,2},
EVA KULIK¹, KLAUS H. RATEITSCHAK³, KURT BIENZ⁴
und JÜRIG MEYER¹

¹ Institut für Präventivzahnmedizin und Orale Mikrobiologie,

² Klinik für Parodontologie, Endodontologie und Kariologie,

³ (em.) Abteilung für Kariologie und Parodontologie,
Zentrum für Zahnmedizin der Universität Basel

⁴ Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Basel

Einleitung

Der ursächliche Zusammenhang zwischen der bakteriellen Plaque und der Gingivitis ist seit mehr als drei Jahrzehnten bekannt (LÖE et al. 1965). So ist nicht verwunderlich, dass Hunderte von mikrobiologischen Untersuchungen über die Ätiologie von Parodontalerkrankungen sich mehrheitlich mit Bakterien und in einem viel geringeren Ausmass mit anderen Mikroorganismen befassten (HAFFAJEE & SOCRANSKY 1994, MOORE & MOORE 1994, ZAMBON 1996). Nur einige wenige Arbeiten diskutierten, ob auch Viren in der Ätiologie und Pathogenese der Gingivitis, insbesondere der akuten nekrotisierenden ulzerativen Gingivitis (ANUG) und der Parodontitis eine Rolle spielen (CASSINGHAM et al. 1971, CARNEY et al. 1981, SABISTON 1986, MAIDEN et al. 1990), und erst kürzlich wurden dazu auch einige Daten erhoben (PARRA & SLOTS 1996, CONTRERAS et al. 1997, CONTRERAS & SLOTS 1998).

Es ist denkbar, dass Viren über mehrere Schädigungsmechanismen die Destruktion von parodontalem Stützgewebe erreichen oder zumindest begünstigen. Basierend auf den Kenntnissen über die Biologie des Zytomegalie-Virus (ZMV), kann man sich mehrere Arten der Gewebsschädigung vorstellen:

Erstens wäre eine Virusvermehrung und eine daraus folgende Schädigung von Saumepithelzellen denkbar, welche einen *locus minoris resistentiae* bilden und somit als Eintrittspforte für Bakterien dienen könnten. Diese Bakterien leiteten dann die apikale Proliferation des Taschenepithels und durch die Ulzeration des Taschenepithels die echte Taschenbildung und somit die Parodontitis ein. Einige Studien zeigten Resultate, die solche Schlussfolgerungen unterstützen: ZMV kann Endothelzellen, Fibroblasten und Epithel von Speicheldrüsen infizieren (DREW 1988) und *in vitro* zu einer Lyse von infizierten Fibroblasten führen (ALFORD & BRITT 1990). Selten wurde von oralen Ulzerationen als Folge einer ZMV-Infektion berichtet, die überwie-

Korrespondenzadresse:

Dr. med. dent. Jean-Pierre Ebner, Zentrum für Zahnmedizin der Universität Basel, Klinik für Parodontologie, Endodontologie und Kariologie, Hebelstrasse 3, 4056 Basel
Tel. 061/267 26 22, Fax 061/267 26 59

gend bei immungeschwächten Patienten auftraten (SCHUBERT 1991, SCULLY et al. 1991).

Eine zweite Möglichkeit wäre eine wenig produktive Infektion weniger Gingivazellen (evtl. im Verlauf einer produktiven Infektion, z. B. in der Speicheldrüse) ohne Gewebeschäden. Erst die Immunantwort würde in der Gingiva zu Schädigungen führen.

Eine dritte Möglichkeit wäre eine Gewebeschädigung durch Plaquebakterien als Folge einer lokalen Abschwächung von Schutzmechanismen des Immunsystems im Verlauf einer ZMV-Infektion. So kann ZMV Lymphozyten und Monozyten infizieren und auf diese Weise eine signifikante Reduktion der Interleukinproduktion und eine Verminderung der reaktiven Proliferation als Antwort auf Mitogene bewirken (KAPASI & RICE 1988). Andere Studien zeigten eine generelle Abnahme der zellulären Immunantwort durch die virale Infektion und eine darauf folgende Sekundärinfektion durch eine bakterielle Flora (MERIGAN 1981, ROBERTSON & PENNINGTON 1984, ROOK 1988). Ob diese dritte Möglichkeit bei der Parodontitis von praktischer Bedeutung ist, scheint fraglich, weil eine lokale Abnahme der zellulären Immunität bei ZMV nicht nachgewiesen ist und bei der Abwehr bakterieller Infekte die zelluläre Immunität weniger wichtig als die humorale ist.

Zusammenhänge zwischen einer Gingivitisform (ANUG) und ZMV wurden schon vor über zehn Jahren vermutet. Aufgrund dreier epidemiologischer Ähnlichkeiten schlug SABISTON (1986) einen ursächlichen Zusammenhang zwischen ZMV-Infektion und Gingivitis, insbesondere der ANUG vor: Die Altersbereiche der Erstinfektion mit ZMV und des Vorkommens der ANUG korrelieren sowohl in Industrie- als auch in Entwicklungsländern. In den USA und in Nordeuropa treten die ANUG- und die ZMV-Serokonversion überwiegend in einem schmalen Altersabschnitt zwischen 15 und 25 Jahren auf. Im Gegensatz dazu trifft man diese Erkrankung wie auch die ZMV-Serokonversion in gewissen Drittwelt- und Entwicklungsländern in noch jüngeren Altersgruppen an, nämlich deutlich vor der Pubertät (HO 1990, TAIWO 1993). Hier scheint die Unterernährung den wichtigsten prädisponierenden Faktor darzustellen, wohingegen das Rauchen und der Stress in den zivilisierten Ländern grössere Bedeutung haben. Bei jungen homosexuellen Männern ist ein häufigeres Vorkommen sowohl der ZMV-Infektion (DREW et al. 1981, 1982, JACOBSEN & MILLS 1988) wie auch der ANUG (DENNISON et al., J Dent Res 64: Special Issue/abstract #204, 1985) anzutreffen. Sowohl bei der ANUG als auch bei ZMV-Infektion wurde eine Verminderung der zellulären Immunität beobachtet, welche u. a. eine Beeinträchtigung der Phagozytose- und Chemotaxisaktivität der polymorphkernigen Granulozyten beinhaltet (COGEN et al. 1983).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von ZMV als Ursache der Gingivitis und Parodontitis abzuschätzen. Wenn das Virus eine wichtige Rolle spielen würde, müsste der Durchseuchungsgrad im Parodontitis-Patientenkollektiv höher sein als in der parodontal gesunden Kontrollgruppe. Man könnte weiter erwarten, das Virus nicht nur im Speichel, sondern auch in gingivalen, vielleicht später auch in parodontalen Taschen nachzuweisen.

Um diese Frage abzuklären wurde versucht, bei verschiedenen Probandengruppen (Parodontitispatienten, Patienten mit einer akuten ZMV-Vermehrung und ANUG-Patienten) das ZMV aus der Taschenflüssigkeit zu isolieren und in Beziehung zu klinischen Parametern, zum Antikörpertiter und zu bakteriologischen Daten zu setzen.

Material und Methoden

Probandinnen und Probanden

In dieser Studie wurden insgesamt 74 Probanden untersucht, welche in die nachfolgend definierten vier Gruppen eingeteilt waren (I–IV). Alle Patienten wurden vor den klinischen Untersuchungen durch eine umfassende mündliche Besprechung sowie ein Patienteninformationsblatt über Art und Ziel der Studie aufgeklärt und erst nach mündlicher Einverständniserklärung untersucht.

Bei jedem Patienten wurde eine medizinische Anamnese durchgeführt, mit der auch Kontraindikationen für die Studienteilnahme eruiert wurden. Kontraindikationen waren: (1) HIV-Träger, (2) eine Antibiotikatherapie innerhalb der letzten drei Monate vor Studienbeginn, (3) eine unmittelbar vorgängige Behandlung der ANUG, Parodontitis oder der ZMV-Infektion. Es wurden das Geschlecht und das Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung aufgenommen. Das Parodont wurde mit den folgenden klinischen Parametern beschrieben: Sondierungstiefen (ST), Sulkus-Blutungs-Index (SBI/MÜHLEMANN & SON 1971), Blutung auf Sondierung (BOP/LANG et al. 1986) und Taschenaktivität (Pusaustritt auf Fingerdruck).

Gruppe I (Parodontitispatienten): Diese Patientengruppe umfasste 37 Parodontitispatienten, deren klinische Merkmale in Tabelle I

Tab. I Klinische Parameter der Probandengruppen I–IV

	Gruppe I seropos.	Gruppe I seroneg.	Gruppe I gesamt	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
Anzahl Pat.	14	23	37	7	10	20
Geschlecht (m)	8 (57%)	10 (44%)	18 (49%)	4 (57%)	4 (40%)	9 (45%)
Geschlecht (w)	6 (43%)	13 (57%)	19 (51%)	3 (43%)	6 (60%)	11 (55%)
Alter (Jahre)	43,6	39,1	40,8	36,6	31,2	39,8
AP	11	19	30	3	0	•
RPP	3	3	6	0	0	•
LJP	0	1	1	0	0	•
ANUG	0	0	0	0	10	•
ST-V (mm)	5,8	5,1	5,4	3,8	3,0	•
ST-B (mm)	6,6	6,2	6,4	3,9	3,2	•
SBI	2,6	2,7	2,7	3,2	4,8	•
BOP ¹⁾	93	88	90	75	100	•
Pusa Austritt ¹⁾	11	4	6,8	0	0	•

AP = Erwachsenenparodontitis

RPP = Schnell verlaufende Parodontitis

LJP = Lokalisierte, juvenile Parodontitis

ST-V = mittlere Sondierungstiefe, Stellen Virologie

ST-B = mittlere Sondierungstiefe, Stellen Bakteriologie

¹⁾ = % Stellen

• = nicht anwendbar

zusammengestellt sind. Für den ZMV-Nachweis wurde Material aus vier parodontalen Taschen entnommen sowie zusätzlich eine Blut- und Speichelentnahme durchgeführt. Aus vier weiteren, ähnlich tiefen Taschen, zum Teil aber auch aus zwei gingivalen und zwei parodontalen Taschen, wurde mittels Papierspitzen Tascheninhalt für die bakteriologische Untersuchung gewonnen.

Gruppe II (ZMV-positive Patienten): Sieben Patienten, bei denen vor drei bis 16 Wochen eine akute ZMV-Vermehrung durch Virusnachweis in Körperflüssigkeiten (Serum, Bronchiallavage, Speichel oder Urin) nachgewiesen worden war, wurden uns freundlicherweise aus den Kliniken für Hämatologie, Innere Medizin und Nephrologie des Kantonsspitals Basel zur Abklärung überwiesen. Sie wurden analog zur ersten Gruppe untersucht (Tab. I).

Gruppe III (ANUG-Patienten): Dieses Kollektiv bestand aus zehn Patienten, bei denen klinisch eine akute nekrotisierende ulzerative Gingivitis (ANUG) diagnostiziert worden war. Die Diagno-

sekkriterien waren Nekrose oder Ulzeration von mindestens drei Papillenspitzen und eine deutliche Blutung auf Sondierung (BOP). Sie wurden gleich wie die Patienten der Gruppe I untersucht (Tab. I).

Gruppe IV (parodontal gesunde Probandengruppe): Bei 20 Mitarbeitern des Zahnmedizinischen Zentrums (Tab. I), bei welchen die orale Hygiene ausgesprochen gut und klinisch nur geringe Entzündungszeichen an wenigen Stellen vorhanden waren, wurde eine Blutentnahme zum Nachweis von ZMV-Antikörpern durchgeführt. Infolge der zu seichten Taschen (≤ 4 mm) wurde bei diesem Kollektiv bewusst auf eine Sulkusflüssigkeitsentnahme zum ZMV-Nachweis und zur bakteriologischen Untersuchung verzichtet. So konnten auch keine klinischen Parameter von Entnahmestellen erhoben werden.

ZMV-Nachweis und ZMV-Serologie

Probenentnahme: Die Selektionskriterien für die Stellenwahl zur Probenentnahme waren neben der Sondierungstiefe (bei Gingivitisstellen die Ausprägung der klinischen Entzündungssymptome) auch die Zugänglichkeit.

Zur Gewinnung von Taschenflüssigkeit wurden mittels einer μ l-Präzisionspritze (Serie 700, Hamilton) 20–30 μ l Pufferlösung (PBS) in die Tasche gegeben und der so aufgeschwemmte Tascheninhalt wieder aufgesogen, in einen Behälter mit Virus-transportmedium (BURKHARDT 1992) zugegeben und gepoolt. Der Speichel wurde in unstimuliertem Zustand während einer Minute gesammelt.

Virusnachweis durch Amplifikationskultur (Shell vial assay): Der Virusnachweis erfolgte nach Zentrifugation des Untersuchungsmaterials auf eine MRC5-Zellkultur innerhalb von 24 Stunden durch Nachweis viraler Frühproteine mittels Immunfluoreszenzmethode (Argène Biosoft) bzw. von viraler DNS durch *in-situ*-Hybridierung (Enzo PathoGene) nach fünf Tagen. Die Methodik hat eine Sensitivität von bis zu 95% und ist als rascher und empfindlicher Nachweis von ZMV zu werten (CATHOMAS & BIENZ 1989). Mit dieser Methodik werden nur infektiöse Viren nachgewiesen. Damit zeigt ein positives Resultat eine aktive Virusreplikation im Patienten an.

Nachweis viraler DNS durch PCR: 21 Proben von 9 Patienten der ANUG-Probandengruppe wurden mit der PCR-Technik auf Vorhandensein des ZMV-Genoms hin untersucht. Die Extraktion der genomischen DNS aus je 100 μ l der mit Papierspitzen gewonnenen Tascheninhalte erfolgte nach der Methode von BOOM et al. (1990), mit Hilfe von Guanidin-rhodanid und Silica-Partikeln. Für die PCR-Amplifikation wurde eine Doppel-PCR («nested PCR») gewählt, die ein 191 bp langes Stück des 5'-terminalen Teiles der immediate-early Region des ZMV-Genoms amplifiziert. Für die äussere PCR wurden die Primer M482 (5'-AAAACACTACGTCACCCGACAC-3') und M483 (5'-CTGTCCG-TGATGGTCTCTTC-3'), für die innere PCR die Primer M485 (5'-AAGACCGTCACAATAAACCG-3') und M484 (5'-TCTCTGGTCCTGATCGTCTT-3') verwendet (Hans Hirsch, in Vorbereitung). Die Reaktionsbedingungen für die PCR-Reaktionen wurden anhand positiver und negativer Kontrollen bestimmt. Um möglichen Kontaminationen bei der PCR vorzubeugen, wurde die UDG-Methode verwendet.

Für die äussere PCR wurde 1 μ l DNS, je 0,3 μ M Primer M482 und M483, je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und 0,4 mM dUTP (Boehringer Mannheim), 3 mM MgCl₂, 0,5 U Uracil DNA Glykosylase (Gibco), 1 U AmpliTaq Gold (Perkin Elmer) und 5 μ l 10 \times Perkin Elmer Puffer II in einem Endvolumen von 50 μ l inkubiert. Das gewählte Temperaturprofil bestand aus einem ersten Denaturierungsschritt während 8 min bei 95 °C, gefolgt

von 35 Zyklen mit je 1 min bei 95 °C, 55 °C und 72 °C und einem abschliessenden Polymerisationsschritt von 7 min bei 72 °C.

Für die innere PCR wurde 1 μ l PCR-Produkt der äusseren PCR unter analogen Bedingungen mit 40 Zyklen reamplifiziert.

Amplifikons wurden durch Elektrophorese von 10 μ l des PCR-Produktes in einem 2%-Agarose-Gel in der Gegenwart von 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid detektiert und auf einem Geldokumentationssystem (Bio-Rad Laboratories) analysiert.

Antikörpernachweis: Der Nachweis von IgM- und IgG-Antikörpern gegen ZMV wurde mit einem ELISA-Test (Abbott, Baar) quantitativ bis 250 Arbiträre Einheiten (AE) pro ml durchgeführt. Antikörper von 15 und mehr AE pro ml wurden als positiv beurteilt, kleinere Titer galten als negativ.

Bakteriologische Untersuchungen

Bei den ersten drei Patientengruppen (I–III) wurden an je vier Zahnstellen (Taschentiefen von 3–11 mm) Material mit Papierspitzen entnommen, in 0,5 ml RTF gegeben und einzeln wie folgt bakteriologisch untersucht (WEBER et al. 1998):

Nach einminütigem Mischen mit dem Vortexgerät wurden 10 μ l der Suspension für die Dunkelfeldmikroskopie verwendet. Bei 700facher Vergrösserung wurden 100 Bakterienzellen gezählt und folgenden sechs Morphotypen zugeordnet: Spirochäten, bewegliche Stäbchen, unbewegliche Stäbchen, fusiforme Bakterien, Kokken und übrige (z. B. Filamente).

Durch Kultur wurden aerob und anaerob die Gesamtkeimzahl und der Anteil der schwarzpigmentierten Kolonien bestimmt sowie gezielt die Parodontopathogene *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum* und *Eikenella corrodens* gesucht.

Zur Identifizierung der Isolate wurden neben der Sauerstoffempfindlichkeit, der Koloniemorphologie und der Gramfärbung folgende biochemische Merkmale herangezogen: Katalase- und Oxidase-Aktivität/Bildung von Indol/ α -Glucosidase-, β -Galaktosidase-, β -N-Acetylglucosaminidase- und Ornithin-decarboxylase-Aktivität/Säurebildung aus Glukose, Laktose und Saccharose.

Statistische Methoden

Die logistische Regression wurde angewendet, um eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von positiven IgG-Antikörpertitern und den klinischen wie auch bakteriologischen Parametern zu beurteilen. Die Analyse wurde mit Hilfe des Programms S-PLUS, Version 3.3 für Windows (MathSoft Inc., Seattle 1995) durchgeführt.

Resultate

Um die ätiologische Bedeutung des Zytomegalie-Virus für die ANUG und die Parodontitis zu beleuchten, wurde versucht, das ZMV in den verschiedenen Probandengruppen nachzuweisen. Einerseits wurden in Seren die IgM- und IgG-Antikörpertiter bestimmt, andererseits wurde versucht, das Virus aus Speichel und Taschenflüssigkeit zu isolieren.

Probandengruppe I (Parodontitispatienten)

Die klinischen Parameter sind in Tabelle I – auch getrennt für seropositive und -negative Probanden – zusammengefasst.

ZMV- und Antikörpernachweis: Vierzehn der 37 Patienten hatten positive IgG-Antikörpertiter gegen ZMV. Dies entspricht einer Prävalenz von 38% (Abb. 1) Die Mittelwerte der IgG-Anti-

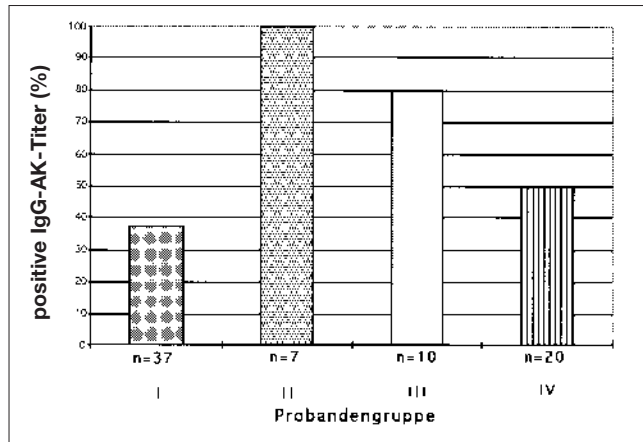


Abb. 1 Anteil Probanden mit positivem IgG-Antikörpertiter für die Probandengruppen I-IV

körpertiter betragen 184,6 AE/ml (minimal 39 AE/ml, maximal 250 AE/ml). Bei keinem fanden sich IgM-Antikörpertiter, die auf eine Neuinfektion hingewiesen hätten. Weder im Speichel noch in der Taschenflüssigkeit dieser 37 Patienten wurde Zytomegalie-Virus nachgewiesen.

Die bakteriologischen Untersuchungen zeigten eine enorme Variabilität der Taschen. Die Mittelwerte der Dunkelfelduntersuchung (Tab. II) und der Kulturen (Tab. III) liessen keine auffälligen Befunde erkennen.

Probandengruppe II (ZMV-positive Patienten)

Zur Überprüfung der Hypothese wurden als zweites Probandenkollektiv sieben Patienten untersucht, bei denen eine aktive ZMV-Vermehrung vor drei bis 16 Wochen nachgewiesen worden war. Falls sich das Virus auch im parodontalen Gewebe ver-

Tab. II Mittlere Anteile der bakteriellen Morphotypen in der Taschenflora der Probandengruppen I-III

Morphotypen	Gruppe I seropos.	Gruppe I seroneg.	Gruppe I gesamt	Gruppe II	Gruppe III
Spirochäten (%)	18	13	15	10	28
bew. Stäb. (%)	18	15	16	5	28
unbew. Stäb. (%)	11	13	12	32	16
Fusiforme (%)	2	1	1	9	1
Kokken (%)	30	39	35	23	26
übrige (%)	21	19	21	21	1

Tab. III Bakteriologische Untersuchung der Taschenflora bei den Probandengruppen I-III

	Gruppe I seropos.	Gruppe I seroneg.	Gruppe I gesamt	Gruppe II	Gruppe III
GKZ aerob (× 1 Mio.)	30	6	15	1	6
GKZ anaerob (× 1 Mio.)	183	80	119	5	29
Schwarzpigmentierte (%)	21	21	21	9	22
<i>P. gingivalis</i> (%) ¹⁾	41	34	36	4	20
<i>P. intermedia</i> / <i>P. nigrescens</i> (%) ¹⁾	57	62	60	29	93
<i>A. actinomycetem-comitans</i> (%) ¹⁾	41	18	27	0	10
<i>E. corrodens</i> (%) ¹⁾	34	30	32	21	55
<i>F. nucleatum</i> (%) ¹⁾	50	65	59	29	68

GKZ = Gesamtkeimzahl

¹⁾ = bezogen auf untersuchte Stellen

mehren würde, müsste es sich dort nachweisen lassen, und Entzündungen müssten klinisch erkennbar sein.

Die klinischen Parameter (Tab. I) zeigten gegenüber der Gruppe I geringere Sondierungstiefen, einen leicht höheren Mittelwert für den SBI und einen tieferen BOP-Index. Dafür erfolgte nie ein Pusaustritt aus der Tasche.

ZMV-Nachweis: Nur gerade bei einem Patienten (14%) wurde im Speichel Virus nachgewiesen. Aus den gingivalen und parodontalen Taschen konnte kein Virus isoliert werden, auch nicht beim Patienten mit Virus im Speichel.

Die bakteriologischen Untersuchungen zeigten einen geringen Anteil von Spirochäten und beweglichen Stäbchen (Tab. II), wesentlich tiefere Gesamtkeimzahlen sowie eine niedrigere Prävalenz von parodontopathogenen Keimen (Tab. III) als in der Probandengruppe I. Diese Befunde entsprachen den geringeren Taschentiefen und dem niedrigeren BOP (Tab. I). Bei diesen sieben Patienten ergaben sich also keine Hinweise, die für eine ätiologische Rolle des ZMV sprechen würden.

Probandengruppe III (ANUG-Patienten)

Die klinischen Parameter ergaben geringe Sondierungstiefen, aber da das Parodont oft Ulzerationen zeigte, einen hohen SBI-Durchschnittswert und infolge der hohen Blutungstendenz einen BOP von 100%, aber keinen Pusaustritt auf Fingerdruck (Tab. I).

ZMV- und Antikörpernachweis: In acht von zehn Fällen konnten IgG-Antikörper gegen ZMV nachgewiesen werden, was einer Prävalenz von 80% entspricht (Abb. 1). Die Mittelwerte der IgG-Antikörpertiter betragen 116,2 AE/ml (minimal 18 AE/ml, maximal 250 AE/ml). Es wurden keine IgM-Antikörper gefunden, die auf eine Frischinfektion hingewiesen hätten. Weder aus Speichel noch aus gingivalen Taschen konnte Virus isoliert werden.

Aus 16 Proben von 7 der 8 seropositiven und aus 5 Proben der beiden seronegativen ANUG-Patienten wurde DNS isoliert und versucht, ein Teil des ZMV-Genoms mittels PCR zu amplifizieren. Vier der 16 Proben, die von 3 seropositiven ANUG-Patienten stammten, zeigten das erwartete 191bp lange PCR-Produkt, während die 5 Proben der beiden seronegativen ANUG-Patienten negativ blieben (Abb. 2).

Bakteriologische Untersuchungen: Die Resultate der Dunkelfeldmikroskopie zeigten einen relativ hohen Anteil von Spirochäten und beweglichen Stäbchen sowie einen unerwartet niedrigen Anteil von fusiformen Zellen (Tab. II).

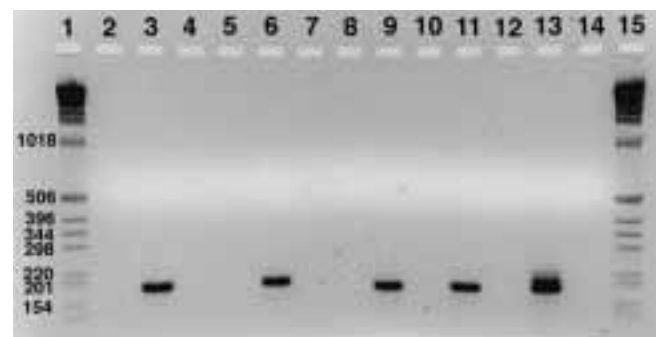


Abb. 2 Agarose-Gel Elektrophorese von spezifischen ZMV-PCR-Amplifikons der Proben aus drei oder vier verschiedenen Stellen von ZMV-seropositiven ANUG-Patienten:

Spur 1 & 15: Längenstandard, 2-5: Patient A mit 4 Proben, 6-8: Patient B mit 3 Proben, 9-12: Patient C mit 4 Proben, 13: Positivkontrolle, 14: Negativkontrolle

Die Kulturen ergaben die erwartete hohe Prävalenz von *P. intermedia*/*P. nigrescens*- und *F. nucleatum*-positiven Taschen (Tab. III).

Probandengruppe IV (parodontal gesunde Probanden)

Klinische Parameter: Die Probanden waren oral gesund, weshalb keine gingivalen und parodontalen Parameter aufgenommen wurden (Tab. I).

Antikörpernachweis: 10 von insgesamt 20 Probanden zeigten einen positiven IgG-Antikörpertiter (Abb. 1). Die Mittelwerte der IgG-Antikörpertiter betragen 200,2 AE/ml (minimal 68 AE/ml, maximal 250 AE/ml). Der IgM-Antikörpernachweis war bei allen Personen negativ.

Diskussion

Der kulturelle Virusnachweis aus einer gingivalen oder parodontalen Tasche, der als direkter Hinweis für eine ätiologische Bedeutung von ZMV hätte angesehen werden können, gelang in keinem Fall, auch nicht beim einzigen Patienten, bei dem ZMV in der Mundflüssigkeit nachgewiesen wurde. Der Virusnachweis in einem relativ kleinen Volumen Taschenflüssigkeit hat möglicherweise keine sehr hohe Empfindlichkeit, obwohl der Shell vial assay (CATHOMAS & BIENZ 1989) eine empfindliche Routinemethode darstellt. Bei einer ZMV-Vermehrung im parodontalen Gewebe können in der Sulkusflüssigkeit wohl ähnlich hohe Virustiter wie im Speichel nach Vermehrung in den Speicheldrüsen erwartet werden, nämlich über 5000 infektiöse Einheiten pro ml. Das für den kulturellen Nachweis untersuchte Volumen von etwa 10 µl müsste also über 50 infektiöse Virus-einheiten enthalten. Bei der ZMV-Latenz ist diese Methodik wenig sensitiv.

Der Nachweis von ZMV-DNS in einem Teil der Taschenproben (25%) seropositiver ANUG-Patienten mittels PCR könnte im Sinne der Hypothesen (SABISTON 1986, CONTRERAS & SLOTS 1997) als Hinweis für eine lokale Virusvermehrung angesehen werden. Der ZMV-DNS-Nachweis belegt aber nicht zwingend einen ätiologischen Zusammenhang. Da das Untersuchungsmaterial häufig mit Blut belastet war, muss die nachgewiesene ZMV-DNS nicht unbedingt aus Viruspartikeln, sondern könnte von latent infizierten Zellen stammen. Eine lokale Virusvermehrung müsste aber zu infektiösen Viruspartikeln führen, die auch kulturell nachzuweisen wären.

Kürzlich wurde in zwei Studien mit Hilfe der PCR aus mehreren Taschenproben von total 39 Parodontitis- und 26 Gingivitispatienten ZMV-DNS nachgewiesen (PARRA & SLOTS 1996, CONTRERAS & SLOTS 1998). Eine weitere Studie (CONTRERAS et al. 1997) konnte mit der PCR aus einer ANUG-Patientengruppe, bestehend aus 22 unterernährten nigerianischen Kindern, aus Taschenproben von 13 Individuen (59%) ZMV-DNS isolieren. Leider wurde in diesen Studien kein Virusnachweis gemacht, und sie geben auch keine Angaben über den Serostatus der Probanden.

Indirekte Hinweise aus dem Vergleich seropositiver mit seronegativen Probanden ergaben sich wenige. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den klinischen Krankheitsparametern von seropositiven und seronegativen Probanden gefunden. Der Durchseuchungsgrad war in der Probandengruppe I (38% bei Parodontitispatienten) nicht höher als in der Kontrollgruppe (50%). Die Mittelwerte der Antikörpertiter lagen im Bereich von 145 bis 200 AE/ml und zeigten auch keine deutlichen Unterschiede. Für einen Vergleich mit der Normalbevölkerung kann die Prävalenz von ZMV-Seropositiven in St. Gallen (KRECH 1973) herangezogen werden. Sie lag mit 45%

für 20–40-Jährige in der gleichen Grössenordnung. Allerdings stützen sich diese Angaben auf die Komplementfixation und sind nicht direkt mit der Prävalenz auf Grund der Elisa-Technik vergleichbar. Neuere Daten oder Vergleichszahlen für die Region Basel existieren unseres Wissens nicht. Allerdings zeigte die ANUG-Probandengruppe mit 80% einen deutlich erhöhten Anteil von ZMV-seropositiven Patienten, was tendenziell Sabiston's Hypothese unterstützt. Doch ist hier die Patientenzahl zu gering, um statistisch gesicherte Aussagen zu erlauben.

Die Symptomatik der Gingivitis und Parodontitis war in der kleinen Probandengruppe der Virusausscheider (Probandengruppe II) nicht auffälliger als in den anderen Patientenkollektiven. Eine gesicherte Aussage ist allerdings nicht möglich, da die Patientenzahl zu gering war.

Bei positivem Virusnachweis wären die bakteriologischen Resultate und ihre Beziehung zu klinischen Parametern von besonderem Interesse gewesen. Da die Zahl der Taschen mit positivem ZMV-DNS-Nachweis gering ist, lassen sich keine gesicherten Korrelationen herstellen. Die bakteriologischen Daten von seropositiven und seronegativen Probanden weisen keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. Sie widerspiegeln die grosse Variabilität der Taschenflora zwischen verschiedenen Individuen (MAIDEN et al. 1990, HAFFAJEE & SOCRANSKY 1994).

Die bakteriologischen Resultate in der ANUG-Probandengruppe entsprachen weitgehend der Literatur (LOESCHE et al. 1982). Mit einer Nachweishäufigkeit von 93% wurde auch *P. intermedia*/*P. nigrescens* als weiteres «Leitbakterium» bestätigt (LOESCHE et al. 1982).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ZMV bei unseren Probanden eine eher untergeordnete Bedeutung in der Ätiologie der Parodontitis haben dürfte. In Bezug auf die ANUG könnte ZMV eine ätiologische Rolle spielen; unsere Daten liefern dafür aber keinen Beweis. Es wäre denkbar, dass das Virus nur in einem Anfangsstadium (Gingivitis) für eine begrenzte Zeit im Sulkus vorhanden ist und durch Schädigung von Saumpithelzellen eine Eintrittspforte für Bakterien bildet. Diese Bakterien würden daraufhin die gingivale oder parodontale Tasche besiedeln, sodass das Virus später allenfalls noch in der Mundflüssigkeit nachweisbar ist.

Auch die Daten anderer neuerer Arbeiten erlauben keine definitive Aussage darüber, ob Viren, insbesondere das ZMV, in der Ätiologie und Pathogenese der ANUG und der Parodontitis eine Rolle spielen. Orale Ulzerationen als Folge einer ZMV-Reaktivierung/-vermehrung wurden zwar, wenn auch selten, überwiegend bei Immungeschwächten beobachtet (LANGFORD et al. 1990, SCHUBERT 1991, SCULLY et al. 1991, EPSTEIN et al. 1992, EPSTEIN et al. 1993). Sie sind aber meist nicht an der Gingiva lokalisiert (im Gegensatz zur ANUG), und die erwähnte Gingivahyperplasie (EPSTEIN et al. 1992) ist nicht mit der untersuchten Gingivitis identisch.

Um SABISTON'S (1986) Hypothese sorgfältig zu überprüfen, müsste ein grösseres Kollektiv von ANUG-Patienten mit einer Kombination von PCR-Nachweis viraler DNS und kulturellem Virusnachweis, verbunden mit der Antikörper-Titerbestimmung, untersucht werden. Wegen der Seltenheit der ANUG-Patienten eine wohl eher langwierige Aufgabe.

Verdankungen

Für die Ermöglichung der klinischen Untersuchungen von ZMV-ausscheidenden Patienten danken wir den Herren Prof. Dr. A. Gratwohl (Hämatologie), Prof. Dr. K. Gyr (Innere Medizin) und Prof. Dr. G. Thiel (Nephrologie) vom Kantonsspital Basel. Prof. Dr. P. Erb und

Dr. H. Hirsch (Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Basel) gebührt unser Dank für die Bestimmung der Antikörpertiter und das PCR-Protokoll. Den Damen E. Ruesch-Ankli, K. Lenkeit und K. Hinni danken wir für die zuverlässige Laborarbeit. Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung sei Frau Dr. P. Godelmann-Vounatsou und Herrn Dr. M. Weber bestens gedankt.

Résumé

Le rôle du cytomégalovirus (CMV) dans l'étiologie de la parodontite a été rapporté, notamment dans les cas de gingivite ulcéro-nécrotique (GUN). Pour tester cette hypothèse, plusieurs groupes de patients ont été soumis à certains paramètres cliniques. La salive et le sérum ont été prélevés et des méthodes d'identification immunologique (anticorps anti CMV) et génétique (détection de fragments d'ADN) ont été utilisées. De plus, la flore sous-gingivale était analysée.

37,8% des patients ayant une parodontite étaient séropositifs, bien que le virus n'eût jamais pu être isolé. Les paramètres cliniques ne différaient pas significativement entre patients séropositifs et patients séronégatifs.

Sept autres patients, chez lesquels une infection productive au CMV pouvait être diagnostiquée, ne montraient aucun signe clinique associé à la maladie parodontale. Chez ces patients, le virus n'était détecté qu'à une seule reprise dans un échantillon salivaire, mais jamais dans les échantillons sous-gingivaux.

Parmi les dix patients souffrant de GUN, huit étaient séropositifs, mais le virus ne pouvait être isolé d'aucun des échantillons. Cependant, dans quatre des seize échantillons prélevés chez les sujets séropositifs, le virus était identifié par la méthode génétique; il n'était jamais identifié parmi les échantillons prélevés chez les individus séronégatifs.

Parmi nos patients, le CMV pourrait donc jouer un rôle chez les patients souffrant d'une GUN.

Summary

EBNER J P, WEBER C, KULIK E, RATEITSCHAK K H, BIENZ K, MEYER J: **An etiologic role for cytomegalovirus in periodontitis and acute necrotizing ulcerative gingivitis?** (in German). Acta Med Dent Helv 4: 86–92 (1999)

It has been postulated that cytomegalovirus (CMV) may play an etiologic role in periodontitis, particularly in acute necrotizing ulcerative gingivitis. In order to test the hypothesis, this study used tissue culture methods for virus identification and polymerase chain reaction (PCR) for CMV-DNA-detection in subgingival samples of various patient groups. In addition, serum anti-CMV, IgG- and IgM-antibodies were determined. For comparison the bacterial microflora was also analyzed in subgingival samples. Fourteen of 37 periodontitis patients were seropositive, but no virus was isolated from saliva and subgingival samples. Clinical parameters did not differ significantly between seropositive and seronegative patients. Seven additional patients who had been shown to secrete CMV did not show clinical signs indicative for severe gingivitis or periodontitis. Virus was detected in one saliva sample but not in subgingival samples.

Of ten patients suffering from acute necrotizing ulcerative gingivitis, eight were seropositive, but virus was isolated from none of the samples. However, from four of 16 subgingival samples tested from seropositive patients, CMV-DNA was amplified by PCR, while none of the five samples from the two seronegative individuals was PCR-positive.

Thus, CMV could play an etiologic role in these acute necrotizing ulcerative gingivitis patients.

Literatur

- ALFORD A JR, BRITT W J: Cytomegalovirus. In: Fields, B., Howley, P., Nipe, D. et al. (Eds): Field's Virology. Raven Press, New York, pp 1981–2010 (1990)
- BOOM R, SOL C J, SALIMANS M M, JANSEN C L, WERTHEIM-VAN DILLEN P M, VAN DER NOORDAA J: Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. J Clin Microbiol 28: 495–503 (1990)
- BURKHARDT F: Mikrobiologische Diagnostik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1992)
- CARNEY W P, RUBIN R H, HOFFMANN R A, HANSEN W P, HEALEY K, HIRSCH M S: Analysis of T-lymphocytes subsets in cytomegalovirus mononucleosis. J Immunol 126: 2114–2116 (1981)
- CASSINGHAM R J, O'LEARY T J, HANSEN N M, SWENSON H M, WALKER F E: A possible relationship between acute necrotizing ulcerative gingivitis and infectious mononucleosis. J Oral Med 26: 134–137 (1971)
- CATHOMAS G, BIENZ K: Cytomegalovirus-Diagnostik beim Immunsupprimierten: Nachweis von viralem Frühprotein und viraler Nukleinsäure in der Amplifikationskultur. Schweiz med Wschr 119: 75–80 (1989)
- COGEN R B, STEVENS A W, COHEN-COLE S, KIRK K, FREEMAN A: Leukocyte function in the etiology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. J Periodontol 54: 402–407 (1983)
- CONTRERAS A, FALKLER W A JR, ENWONWU C O, IDIGBE E O, SAVAGE K O, AFOLABI M B, ONWUJEKWE D, RAMS T E, SLOTS J: Human *Herpesviridae* in acute necrotizing ulcerative gingivitis in children in Nigeria. Oral Microbiol Immunol 12: 259–265 (1997)
- CONTRERAS A, SLOTS J: Active cytomegalovirus infection in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol 13: 225–230 (1998)
- DREW W L: Herpesviridae: cytomegalovirus. In: Balows A, Hausler W R Jr, Lennette E H (Eds): Laboratory diagnosis of infectious diseases. Principles and practice. Springer-Verlag, New York, pp 247–260 (1988)
- DREW W L, MINTZ L, MINER R C, SANDS M, KETTERER B: Prevalence of cytomegalovirus infection in homosexual men. J Infect Dis 143: 188–192 (1981)
- DREW W L, MINER R C, ZIEGLER J L, GULLETT J H, ABRAMS D I, CONANT M A, HUANG E S, GROUNDWATER J R, VOLBERDING P, MINTZ L: Cytomegalovirus and Kaposi's sarkoma in young homosexual men. Lancet 2: 125–127 (1982)
- EPSTEIN J B, WOLBER R A, SHERLOCK C H: Cytomegalovirus-induced gingival hyperplasia following cardiac transplantation. Ann Intern Med 116: 1034 (1992)
- EPSTEIN J B, SHERLOCK C H, WOLBER R A: Oral manifestations of cytomegalovirus infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 75: 443–451 (1993)
- HAFFAJEE A D, SOCRANSKY SS: Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000 5: 78–111 (1994)
- HO M: Epidemiology of cytomegalovirus infections. Rev Infect Dis 12 (suppl 7): 701–710 (1990)
- JACOBSON M A, MILLS J: Serious cytomegalovirus disease in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): clinical findings, diagnosis and treatment. Ann Intern Med 108: 585–594 (1988)
- KAPASI K, RICE G P A: Cytomegalovirus infection of peripheral blood mononuclear cells: effects on interleukin-1 and -2 production and responsiveness. J Virol 62: 3603–3613 (1988)

- KRECH U: Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bull WHO* 49: 103–106 (1973)
- LANG N P, JOSS A, ORSANIC T, GUSBERTI F A, SIEGRIST B E: Bleeding on probing. A predictor for the progression of periodontal disease? *J Clin Periodontol* 13: 590–596 (1986)
- LANGFORD A, KUNZE R, TIMM H, RUF B, REICHART P: Cytomegalovirus associated oral ulcerations in HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med* 19: 71–76 (1990)
- LOESCHE W J, SYED S A, LAUGHON B E, STOLL J: The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol* 53: 223–230 (1982)
- LÖE H, THEILADE E, JENSEN S: Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 36: 177–187 (1965)
- MAIDEN M F J, CARMAN R J, CURTIS M A, GILLET I R, GRIFFITH G S, STERNE J A C, WILTON J M A, JOHNSON N W: Detection of high risk groups and individuals for periodontal diseases: laboratory markers based on the microbiological analysis of subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 17: 1–13 (1990)
- MERIGAN T: Immunosuppression and herpesviruses. In: Nahmias A J, Dowdle W R, Schinazi R F (Eds): *The Human Herpesviruses*. Elsevier, New York, pp 308–316 (1981)
- MOORE W E C & MOORE L V H: The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5: 66–77 (1994)
- MÜHLEMANN H R, SON S: Gingival sulcus bleeding – A leading symptom in initial gingivitis. *Helv odont Acta* 15: 107–113 (1971)
- PARRA B, SLOTS J: Detection of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 5: 289–293 (1996)
- ROBERTSON A S, PENNINGTON C R: Cytomegalovirus and its association with multiple infections: a case report. *Scott Med J* 29: 25–26 (1984)
- ROOK A H: Interactions of cytomegalovirus with the human immune system. *Rev Infect Dis* 10: 460–467 (1988)
- SABISTON C B: A review and proposal for the etiology of acute necrotizing gingivitis. *J Clin Periodontol* 13: 727–734 (1986)
- SCHUBERT M M: Oral manifestations of viral infections in immunocompromised patients. *Curr Opin Dent* 1: 384–397 (1991)
- SCULLY C, EPSTEIN J, PORTER S, COX M: Viruses and chronic disorders involving the human oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 72: 537–544 (1991)
- TAIWO J O: Oral hygiene status and necrotizing ulcerative gingivitis in Nigerian children. *J Periodontol* 63: 1071–1074 (1993)
- WEBER C, JAQUIERY C, MEYER J, LAMBRECHT J T: Klinische und mikrobiologische Nachuntersuchung von Ha-Ti[®]-Implantaten. *Acta Med Dent Helv* 3: 203–208 (1998)
- ZAMBON J J: Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol* 1: 879–925 (1996)