

Diplomarbeit

**Klinische Anwendbarkeit eines chairside- Tests
parodontopathogener Keime**

eingereicht von

Dr.med. univ. Christof Lerch

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Zahnheilkunde
(Dr. med. dent.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Zahnmedizin und Mundgesundheit Klin.
Abteilung für Zahnerhaltung, Parodontologie und
Zahnersatzkunde**

unter der Anleitung von

Univ.- Ass. Dr.med.dent. Behrouz Arefnia

Univ.-Ass. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Gernot Wimmer

Graz, am 14.03.2019

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 14.03.2019

Dr. med. univ. Christof Lerch, eh

Vorwort

Erkrankungen des Zahnhalteapparats, dazu zählen Alveolarknochen, Gingiva, Desmodont und Zement, gehören weltweit zu den häufigsten Krankheiten.

In Deutschland gehen ab dem 40. Lebensjahr mehr Zähne durch Parodontalerkrankungen als durch Karies verloren.

Die Pathogenese der Parodontalerkrankungen ist ein multifaktorielles Geschehen. Das Vorkommen bestimmter parodontopathogener Mikroorganismen, deren toxische Potenz und Penetration ins Gewebe, hat einen großen Einfluss auf die Entstehung und Progression einer Parodontitis. Hinzu kommen die unterschiedlichen Parameter des Wirtes, wie beispielsweise der Immunstatus. Erkrankungen des Parodonts beginnen mit einer reversiblen Entzündung der Gingiva. Wird eine Intervention unterlassen, schreitet der Prozess kontinuierlich fort, bis zu einer chronischen Zerstörung des Zahnhalteapparates, der Bildung von Zahntaschen und letztlich kommt es zum Verlust des Zahnes.

Von weit über 700 nachgewiesenen Mikroorganismen der subgingivalen Plaque besitzt nur eine kleine Gruppe von Bakterien die Fähigkeit Entzündungen des Zahnfleisches hervorzurufen und unterhalten zu können. Die Tatsache, dass eine Parodontitistherapie klinisch erfolgreich ist, obwohl Bakterien in den unterschiedlichen intraoralen Habitaten mittels PCR- Analyse noch nachweisbar sind, erlaubt die Frage, ob die Mikroorganismen nicht doch erfolgreich zerstört wurden, aber noch DNA- Bestandteile vorliegen. Derzeit gibt es aufgrund fehlender Evidenz international wenig Vergleich von RNA- basierten parodontologischen Bakterientests. Ein möglicher Vorteil in der Ermittlung von RNA- Sequenzen ist, lebende von toten Bakterien zu unterscheiden. DNA- Bestandteile verbleiben längere Zeit, obwohl die Bakterien per se nicht mehr existieren. In der Arbeit wurden die Ergebnisse von der bis jetzt hauptsächlich angewendeten PCR- Analyse mit dem Schnelltest PerioPOC® verglichen.

Der Neuigkeitswert besteht in der Tatsache, dass mit dem Testkit von PerioPOC® bakterielle RNA- Bestandteile detektiert werden, welche nur lebende Zellen produzieren. Möglicherweise kann somit eine tatsächliche Besiedelung von einer bereits abgelaufenen unterschieden werden.

Danksagungen

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Herr Priv. Doz. Dr. Gernot Wimmer für die freundliche Überlassung dieses Themas und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Diplomarbeit. Seine Expertise und seine wissenschaftlichen Arbeiten auf dem Gebiet der Parodontologie waren für mich Motivation meine Kenntnisse zu vertiefen. Großer Dank gilt auch meinem Zweitbetreuer Dr. Behrouz Arefnia.

Ein großes Dankeschön geht an diejenigen, die mich bei der Erstellung dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Ebenso möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht hat und die mir immer unterstützend zur Seite stand. Besonders hervorheben möchte ich meinen lieben Freund Sascha alias King Siwa, ohne den das Leben nur halb so schön wäre.

Nicht zuletzt danke ich meiner Freundin Andrea, die meine Launen mit viel Geduld ertragen hat und mich auch in stressigen Zeiten aufheitert und mir die wichtigen Dinge im Leben aufzeigt.

Vielen Dank an alle Wegbegleiter.

Zusammenfassung

Ziel: Ziel dieser Arbeit ist es einen Vergleich zwischen DNA und RNA- basierten Bakterientests und ihrer Anwendung zu untersuchen. Es wird die Detektion von den fünf wichtigsten parodontal-pathogenen Bakterien gegenübergestellt.

Material und Methoden: Es wurden 30 Patientinnen und Patienten mit nachgewiesener Parodontitis auf folgende Keime: *Treponema denticola* (Td), *Tannerella forsythia* (Tf), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi) und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) untersucht. Dabei wurden jeweils zwei DNA und RNA Tests an zwei aktiven (bleeding on probing positiv) und zwei inaktiven (bleeding on probing negativ) Zahntaschen durchgeführt (insgesamt 240 Proben).

Resultate: Vergleicht man die Ergebnisse des RNA und DNA- Tests miteinander, kommt man bezogen auf die einzelnen Bakterien zu folgenden Ergebnissen: Aa: 82,9%, Pg: 68,4%, Pi: 80,3%, Td: 65% und Tf: 63,2%. Die Ergebnisse von Aa sind aber aufgrund des geringen Nachweises nicht aussagekräftig. Die Übereinstimmung kann bei Pg, Td und Tf als hoch, und bei Pi als sehr hoch bezeichnet werden.

Betrachtet man die Blutungsaktivität der Zahntaschen (BOP) in Hinblick auf die nachgewiesenen Bakterien des RNA und DNA- Tests, wurden folgende Resultate erzielt: Für das Bakterium Aa konnte aufgrund der geringen positiven Ergebnisse kein Zusammenhang festgestellt werden. Bei Pg und Pi zeigt der RNA- Test mehr positive Ergebnisse beim Vorliegen einer BOP positiven Tasche. Bei Td und Tf zeigen der RNA und der DNA Test mehr positive Ergebnisse beim Vorliegen einer BOP positiven Tasche.

Konklusion:

Eine chairside Testung der wichtigsten parodontopathogenen Bakterien bringt mehrere Vorteile mit sich. Das Testergebnis ist in wenigen Minuten vorhanden. Man benötigt keine aufwendigen Laborgeräte oder sonstige Utensilien. Die Patientinnen und Patienten erfahren ihren Befund noch in derselben Sitzung. Adjuvante Antibiotikatherapien können direkt im Anschluss an das Testergebnis zielgerecht begonnen werden. Unnötige Proben-Lagerung, Verpackung oder Versand sind nicht notwendig.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine gute Übereinstimmung der beiden Bakterientests. Es werden mehr parodontopathogene Bakterien in BOP positiven als in BOP negativen Taschen nachgewiesen.

Abstract

Aim: The aim of this work is to prove if there is a difference in the detection of DNA-based and RNA-based bacterial tests in clinical use. We compared the test results for five periodontal pathogens.

Material and methods: 30 female and male patients suffering from periodontitis were tested for the following pathogens: *Treponema denticola* (Td), *Tannerella forsythia* (Tf), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). For each DNA and RNA- Test we took two samples from an active (bleeding on probing positive) tooth pocket and two samples from an inactive (bleeding on probing negative) tooth pocket (totally 240 samples).

Results: Comparing the results of the RNA and DNA test with each other, the following results are obtained for the individual bacteria: Aa: 82.9%, Pg: 68.4%, Pi: 80.3%, Td: 65% and Tf: 63.2%. However, the results of Aa are not meaningful due to the lack of evidence. The match can be described as high for Pg, Td and Tf, and as very high for Pi. Considering the bleeding activity of the tooth pockets (BOP) with regard to the proven bacteria of the RNA and DNA tests, the following results were obtained: For the bacterium Aa no correlation could be established due to the low positive results. For Pg and Pi, the RNA test shows more positive results in the presence of a BOP positive pocket. For Td and Tf, the RNA and the DNA test show more positive results in the presence of a BOP positive pocket.

Conclusion: A chairside test of the most important periodontal pathogens several advantages. The test result will be available in a few minutes. You do not need expensive laboratory equipment or other utensils. The female and male patients will find out their findings in the same session. Adjuvant antibiotic therapies can be started directly after the test result. Unnecessary sample storage, packaging or shipping is not necessary.

In the present work a good agreement of the two bacterial tests is shown. More periodontal pathogens are detected in BOP positive than in BOP negative pockets

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	ii
Danksagungen	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract.....	v
Inhaltsverzeichnis	vi
Glossar und Abkürzungen	viii
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xi
1 Parodontitis.....	1
1.1 Definition, Epidemiologie.....	1
1.2 Ätiologie	2
1.3 Mikrobiologie	3
1.3.1 Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa).....	10
1.3.2 Porphyromonas gingivalis (Pg)	10
1.3.3 Tannerella forsythia (Tf)	11
1.3.4 Treponema denticola (Td)	11
1.3.5 Prevotella intermedia (Pi).....	12
1.4 Klassifikation.....	15
1.5 Testmethoden/ Nachweisverfahren.....	18
1.6 Entnahmetechnik klinischer Proben	19
1.6.1 Mikroskopische Verfahren	19
1.6.2 Kulturverfahren	19
1.6.3 Immunassay	20
1.6.4 Enzymatische Methoden.....	21
1.6.5 Genetische Testmethoden.....	21
2 Zielsetzung und Fragestellung.....	26
2.1 Testablauf.....	27
3 Material und Methoden	28
3.1.1 Material.....	32
Studienablauf.....	33
4 Ergebnisse – Resultate.....	39

5	Diskussion	46
5.1	Ausblick	52
6	Conclusio	54
7	Literaturverzeichnis	56

Glossar und Abkürzungen

Aa	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
AAP	American Academy of Periodontology
BANA	N- α -Benzoyl-DL-Arginin-2-Naphtylamid
BOP	Bleeding on Probing (Blutung nach Sondierung)
Cr	Campylobacter rectus
CRF	Case Report Form
Cs	Capnocytophaga Species
DNA	Deoxyribonucleic acid
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn – und Kieferheilkunde
DGP	Deutsche Gesellschaft für Parodontologie
Ec	Eikenella corrodens
EFP	European Federation of Periodontology
En	Eubacterium nodatum
Fn	Fusobacterium nucleatum
FISH	Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
LOS	Lipooligosaccharide
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
NASBA	Nukleinsäuresequenz-basierte Amplifikation
NUG	nekrotisierende ulzerierende Gingivitis
NUP	nekrotisierende ulzerierende Parodontitis
ÖGP	Österreichische Gesellschaft für Parodontologie
PCR	polymerase chain reaction
Pg	Porphyromonas gingivalis
PGU	parodontale Grunduntersuchung
Pi	Prevotella intermedia
Pm	Parvimonas micra
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomale RNA
rtPCR	Reverse-Transkriptase-PCR

s	Sekunde
sp.	Species
Spp	species pluralis
SRP	scaling and root planning
Td	Treponema denticola
Tf	forsythia
TGL	total germ load
VBNC	viable but non-culturable

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ätiologie Erkrankungen des Parodonts in Anlehnung an (1).....	2
Abbildung 2: Nachweis der Kombinationen von P.gingivalis, T. denticola und T. forsythia. Die subgingivalen Plaqueproben wurden mittels real- Time PCR, von 37 Menschen mit kürzlich diagnostizierter chronischer Parodontitis, ermittelt. Übersetzt aus dem Englischen:(18).....	7
Abbildung 3: PCR Zyklus (57).....	23
Abbildung 4: Testablauf.....	27
Abbildung 5: Entnahme subgingivaler Plaque mit einer Papierspitze	31
Abbildung 6: Testkit PerioPOC® (62).....	32
Abbildung 7: sechs Tropfen "Solution A" ins Probenröhren applizieren und anschließend in den Mini- Heizblock bei 95°C für 6 Minuten	34
Abbildung 8: Auftropfen von Lysat in das Inlet des PerioPOC® Test- Chips (62).....	35
Abbildung 9: Einbringen von "Solution B -D" in das Inlet.....	35
Abbildung 10: Kurzanleitung PerioPOC®.....	36
Abbildung 11: Testergebnisse der PerioPOC®- Chips. Jede blaue Bande ist als positives Testergebnis zu werten.	37
Abbildung 12: Geschlechtsverteilung der Probanden grafisch dargestellt.....	39
Abbildung 13: Prozentueller Vergleich der Ergebnisse des RNA und DNA-	42
Abbildung 14:Prozentueller Vergleich der Ergebnisse des RNA- Tests in Abhängigkeit BOP der Zahntaschen	44
Abbildung 15: Prozentueller Vergleich der Ergebnisse des DNA- Tests in Abhängigkeit BOP der Zahntaschen.	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prädominante Bakterien der menschlichen Mundhöhle in Anlehnung an (2)	3
Tabelle 2: Parodontale Markerkeime in Anlehnung an (44)	14
Tabelle 3: Einteilung parodontaler Erkrankungen in Anlehnung an (46)	17
Tabelle 4: Verwendete Materialien des RNA- Tests und DNA- Tests	32
Tabelle 5: Verwendete Laborgerät des RNA- Tests.....	32
Tabelle 6: Übereinstimmung RNA- und DNA- Test für Aa	40
Tabelle 7: Übereinstimmung RNA- und DNA- Test für Pg.....	40
Tabelle 8: Übereinstimmung RNA- und DNA- Test für Pi	41
Tabelle 9: Übereinstimmung RNA- und DNA- Test für Td	41
Tabelle 10: Übereinstimmung RNA- und DNA- Test für Tf.....	41
Tabelle 11: Nachweis von Aa in Abhängigkeit BOP der Zahntaschen.....	42
Tabelle 12: Nachweis von Pg in Abhängigkeit BOP der Zahntaschen	42
Tabelle 13: Nachweis von Pi in Abhängigkeit BOP der Zahntaschen	43
Tabelle 14: Nachweis von Td in Abhängigkeit BOP der Zahntaschen.....	43
Tabelle 15: Nachweis von Tf in Abhängigkeit BOP der Zahntaschen.....	44
Tabelle 16: Antibiotisches Behandlungskonzept der Grazer Dentalhygieneschule Teil I ..	53
Tabelle 17: Antibiotisches Behandlungskonzept der Grazer Dentalhygieneschule Teil II.	53

1 Parodontitis

1.1 Definition, Epidemiologie

Der Zahnhalteapparat oder das Parodont (lat.: „para“= neben; gr.: „odus“=Zahn) bezeichnet Weich- und Hartgewebe, welches den Zahn umgibt und im Kiefer befestigt.

Folgende Strukturen sind daran beteiligt (1):

- Gingiva
- Desmodont
- Wurzelzement
- Alveolarknochen

Es gibt eine Vielzahl von Erkrankungen des Parodonts mit unterschiedlicher Klassifizierung. Primär kann man zwischen Gingivitiden (Zahnfleischentzündung ohne Attachmentverlust) und Parodontitiden (Zahnfleischentzündung mit Zahnbettschwund) unterscheiden (1).

Eine Gingivitis zeigt sich klinisch durch Bleeding on Probing (BOP=Blutung auf Sondierung) des gingivalen Sulkus, und bei schweren Fällen durch ein Rötung und Schwellung des Zahnfleisches (1,2). Die Inflammation beschränkt sich auf das marginale suprakrestale Weichgewebe. Bei suffizienter Mundhygiene sind die Symptome reversibel und es kommt zu keinem Attachmentverlust. Aufgrund von verschiedenen Faktoren, beispielsweise: Präsenz von Risikofaktoren, reduziertem Immunstatus, psychosozialen Stress, proinflammatorischen Mediatoren als auch bei Überhandnehmen parodontopathogener Bakterien, kann eine Gingivitis in eine Parodontitis übergehen. Die Entzündung schreitet nun in tiefere Strukturen fort. Es kommt zum irreversiblen Abbau der desmodontalen Fasern und des Knochens (Attachmentverlust). Das Saumepithel wird in ein Taschenepithel umgewandelt (1,2).

Laut WHO sind weltweit 10-15% der Bevölkerung von Zahnfleischerkrankungen betroffen (3).

In den Vereinigten Staaten von Amerika leidet ein Drittel der über 30- Jährigen unter Erkrankungen des Zahnhalteapparats und Parodontitis ist der Hauptgrund für Zahnverluste (4).

1.2 Ätiologie

Erkrankungen des Zahnhalteapparats sind multifaktoriell. Das bedeutet, dass sie von unterschiedlichen Faktoren ausgelöst und unterhalten werden. Einer Parodontitis geht eine Gingivitis voraus. Jedoch kann eine Gingivitis viele Jahre bestehen ohne sich auf tiefere Strukturen auszubreiten. Die Ursache, warum aus einer Gingivitis eine Parodontitis entsteht, ist noch Gegenstand der Forschung. Ursächlich beteiligt sind auf der einen Seite der Wirt mit individuellen Reaktionen auf die Infektion und auf der anderen Seite Mikroorganismen. Das Vorhandensein bestimmter Bakterien, die Vermehrung, die Fähigkeit zur Penetration ins Gewebe, toxische Potenz sowie Auslösung von Immunantworten haben Einfluss auf die Pathogenese (1).

Zahlreiche Studien belegen, dass Parodontitiden gehäuft bei Menschen mit Risikofaktoren auftreten (Immunsuppression, Diabetes Mellitus, HIV, Leukämie, Down Syndrom) (5).

Der alleinige Nachweis von parodontopathogenen Bakterien im Mundraum muss nicht heißen, dass sie eine Parodontitis auslösen oder die Ursache dafür sind. Es kann auch sein, dass pathogene Mikroorganismen in bereits zerstörten parodontalen Nischen passende Lebensbedingungen finden und dadurch zu einer Vermehrung befähigt sind (1).

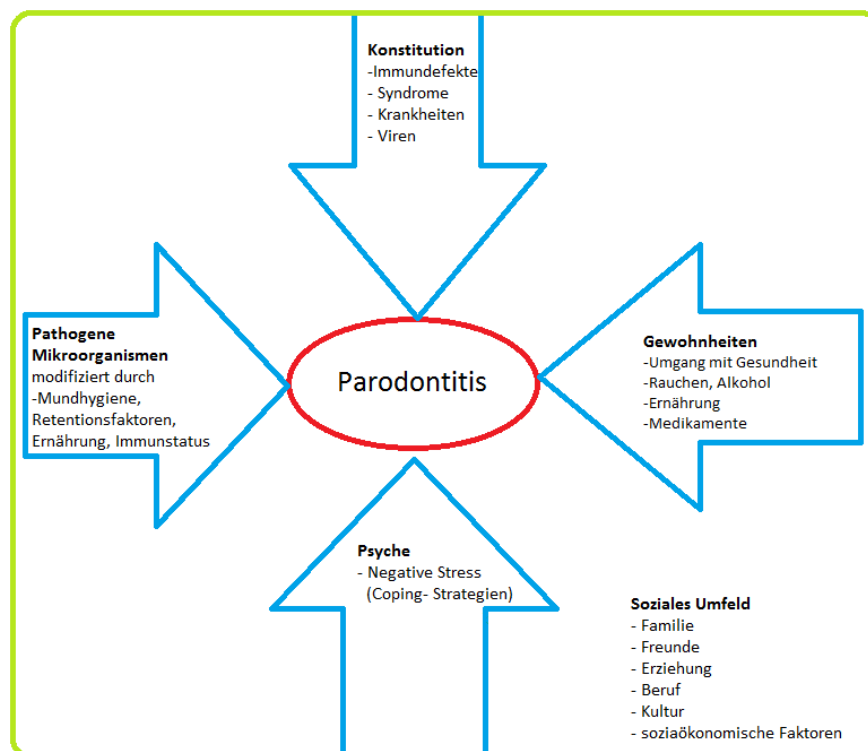


Abbildung 1: Ätiologie Erkrankungen des Parodonts in Anlehnung an (1)

1.3 Mikrobiologie

Eine Parodontitis wird durch verschiedene Ursachen und Wechselwirkungen ausgelöst. Das Verständnis dieser Beziehungen setzt den Grundstein für eine gezielte Behandlung und einen langfristigen Therapieerfolg.

Unser Mundraum wird von etwa einer Billionen Bakterien besiedelt. Etwa 700 verschiedene Spezies sind nachweisbar und bilden ein komplexes Ökosystem (6,7). Grund dafür sind die guten Lebensbedingungen in diesem Habitat: Geringe Temperaturschwankungen (34 bis 36°C), pH- Wert im neutralen Bereich und feuchte Umgebung aufgrund der Speichelsekretion (8). Es ist nicht verwunderlich, dass eine Verschiebung des komplexen subgingivalen Keimspektrums dieses Ökosystem ins Wanken bringt und als Auslöser für die Zerstörung parodontaler Strukturen verantwortlich sein kann. Ein Großteil der Mikroorganismen lebt in Symbiose mit dem Wirt und ist ein wichtiger Bestandteil der Mundraumflora. Hauptsächlich daran beteiligt sind grampositive aerobe Bakterien. Aber auch eine geringe Anzahl von parodontopathogenen Bakterien kann in der „normalen“ - nicht entzündlichen- Flora nachgewiesen werden (6,9,10).

Tabelle 1: Prädominante Bakterien der menschlichen Mundhöhle in Anlehnung an (2)

Mikrobiologische Gruppe	Mikrobiologische Spezies/ Abstammung
Grampositiv	
<u>Aerob oder fakultativ aerob</u>	Streptokokken (S.gordonii, S. mitis, S. auralis, S. salivarius)
	Staphylokokken (S. aureus, S. epidermidis)
	Enterokokken (E.faecalis)
	Laktobacillen (L. casei, L. fermentum)
	Corynebakterien (C.matruchotii)
	Actinomyces (A.naeslundii, A. israeli, A. visosus)
	Arachnia (A.propionica)
	Rothia (R.dentocariosa)
<u>Obligat anaerob</u>	Bacillus (B. cereus)
	Propionibakterium (P.acnes)
	Peptostreptokokkus (Parvimonas micra, P. anaerobius)

Gramnegativ	
<u>Aerob oder fakultativ aerob</u>	Campylobacter (C. rectus, C. concisus, C. gracilis)
	Aggregatibacter (A. actinomycetemcomitans)
<u>Obligat anaerob</u>	Fusobacterium (F. nucleatum)
	Porphyromonas (P. gingivalis)
	Prevotella (P. melaninogenica, P. oralis, P. intermedia)

Parodontopathogene Bakterien gehören meist der Gruppe der gramnegativen anaeroben Spezies an. Anaerobe Lebewesen brauchen für ihren Stoffwechsel keinen molekularen Sauerstoff. Es ist wenig verwunderlich, dass solche Mikroorganismen an Orten mit reduziertem Sauerstoffangebot beispielsweise am Gingivasaum in akkumulierter Plaque gute Lebensbedingungen vorfinden. Bildet sich aufgrund mangelnder Dentalhygiene eine Gingivitis, kann neben einer Blutung, Rötung und Schwellung eine sogenannte Zahnfleischtasche entstehen. Dort wiederum verbessern sich die Lebensbedingungen der anaeroben Keime. Die Krankheitskaskade nimmt ihren Lauf. Die parodontopathogenen Mikroorganismen bilden einerseits verschiedenste proteolytische und zytotoxische Substanzen, mit denen Hart- und Weichgewebsstrukturen des dentalen Halteapparats angegriffen werden. Andererseits unterhalten sie den Entzündungsprozess indirekt durch die Stimulierung der entzündlichen Immunantwort des Wirtes. Diese Zerstörung wird hauptsächlich durch Matrixmetalloproteinasen ausgelöst (1).

Gramnegative Bakterien können auf ihrer Oberfläche Lipopolysaccharidketten (LPS) exprimieren. Diese Antigene werden von immunkompetenten Zellen erkannt und führen zur Aktivierung einer Entzündungskaskade. Es kommt zur Freisetzung von Zytokinen (Interleukin 1, Interleukin 6, Interleukin 8, Tumornekrosefaktor alpha usw.).

Kann diese Entzündung marginal eingedämmt werden, können sich die destruktiven Prozesse regenerieren. Gelingt das nicht, wird das Parodont irreversibel geschädigt, und eine Parodontitis manifestiert sich. Auch der Wirt und seine Abwehrmechanismen spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese (1). Große Bedeutung haben dabei die Zytokine Interleukin-1 alpha (IL-1A) und Interleukin- 1 beta (IL-1B), sowie der Rezeptorantagonist

Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1RN). Der Botenstoff Interleukin 1 ist an der Zerstörung von Mikroorganismen und geschädigten, entarteten Zellen beteiligt. Auch der Knochenstoffwechsel ist mit seinen Auf- und Umbauprozessen auf diese Entzündungsmediatoren angewiesen. Interleukin 1 ist dafür verantwortlich, dass das Gleichgewicht in Richtung Knochenabbau verschoben wird. Es ist bei der Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoklasten teilnehmend und hemmt außerdem die Osteoblastenbildung. Versuchen parodontopathogene Erreger im menschlichen Organismus einzugreifen, bindet IL-1 am Rezeptor, der sich auf der Oberfläche der Zielzelle befindet. Durch diese Bindung wird die Entzündungskaskade in Gang gesetzt und weitere Mediatoren freigesetzt. IL-1RN, der Gegenspieler von IL-1, bindet ebenfalls an dem Rezeptor. Er löst im Gegensatz zu IL-1 aber keine Immunreaktion aus, sondern blockiert den Rezeptor. Im Fall einer bekämpften Infektion ist eine weitere Aktivierung nicht notwendig und IL-1 RN ist dafür verantwortlich den Immunprozess zu stoppen (11). In einer Arbeit von Michalowicz et al. (12) wurden anhand von 110 Paaren von erwachsenen Zwillingen die genetischen Faktoren in Bezug auf Parodontitis untersucht. Sie kamen zu dem Schluss, dass Erbanlagen einen wesentlichen Einfluss auf den Verlauf von Zahnfleischerkrankungen haben.

Die genetische Erbinformation für die Interleukine IL-1A, IL-1B und IL-1RN sind auf den gleichnamigen Genen auf Chromosom 2 hinterlegt. Personen mit Veränderungen dieser Genabschnitte reagieren mit überschießenden Entzündungsreaktionen. Es wird dabei mehr Knochen abgebaut, und es wurde eine erhöhte Entzündungsneigung nachgewiesen. In Europa sind etwa 30 Prozent der Bevölkerung Träger eines mutierten IL-1- Gens und somit einer erhöhten Gefahr für Parodontalerkrankungen ausgesetzt (13). Aber auch die IL-1- Rezeptorantagonisten können betroffen sein. Liegt hier ein Defekt vor, wird der Entkopplungsmechanismus nicht ordnungsgemäß durchgeführt. Die Folge ist eine zu geringe Hemmung der entzündlichen Prozesse. Nun kann es sein, dass jemand Träger von Interleukin-1alpha -, Interleukin-1beta - sowie Interleukin-Rezeptorantagonist-Genveränderungen ist. Die betroffenen Personen reagieren äußerst empfindlich auf parodontopathogene Bakterien. Dieses erhöhte Krankheitsrisiko kann zu einer frühen Manifestation der Krankheit und schwerwiegenden Verlaufsformen führen (14).

Sind nicht nur erbliche Dispositionen, sondern auch noch weitere Risikofaktoren vorhanden, verstärkt sich die Wirkung: Beispielsweise hat ein Raucher ein 2,9- faches erhöhtes Risiko von Zahnverlust. Eine Person die raucht und zusätzlich eine Veränderungen in den IL-1 Genen hat, kommt auf ein 7,7- faches erhöhtes Risiko (11,15).

Die Komplextheorie

Die unspezifische Plaquehypothese besagt, dass allein die Menge an Zahnbelag für die Entstehung einer Zahnfleischentzündung verantwortlich ist. Diese Hypothese wurde überarbeitet und dahingehend weiter entwickelt, dass nicht allein die Menge, sondern auch die Zusammensetzung des Bakterienverbundes ausschlaggebend für eine Zahnfleischerkrankung ist (16). Diese sogenannte Komplextheorie weist darauf hin, dass eine gesunde orale Flora hauptsächlich aus grampositiven aeroben Keimen aufgebaut ist. Auf dem krankhaften Parodont besteht die bakterielle Zusammensetzung hingegen aus gramnegativen anaeroben Bakterien. Weiters konnten bestimmte Markerkeime (parodontopathogene Bakterien) identifiziert werden. Diese Keime sind durch ihre speziellen Eigenschaften besonders befähigt Krankheiten im oralen Halteapparat auszulösen. Aufgrund ihrer Pathogenität und den Wechselwirkungen untereinander teilten Socransky und Haffajee (10) diese Mikroorganismen in fünf Hauptkomplexe ein: roter Komplex, oranger Komplex, gelber Komplex, violetter Komplex und grüner Komplex. Das Bakterium *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* hat aufgrund seiner Pathogenität eine Sonderstellung (10). Die zahlreichen Wechselbeziehungen zwischen physiologischer und parodontopathogener Bakterien in dem intraoralen Biofilm ist weiterhin Gegenstand der Forschung.

Roter Komplex

Vertreter des roten Komplexes sind gramnegative strikt anaerobe Mikroorganismen. Dazu zählen: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* und *Tannerella forsythia* (10). Die Keime sind hauptverantwortlich für die Destruktion des Zahnhalteapparats. Sie produzieren zahlreiche proteolytische Enzyme (Phosphatasen, Kollagenasen), die nicht nur Weich- und Knochengewebe zerstören, sondern auch die invasiven Eigenschaften begründen. Durch diese Invasion ins umliegende Gewebe ist die rein mechanische Therapie meist unzulänglich (2,17).

Eine Studie über die bakterielle Zusammensetzung subgingivaler Plaque bei Menschen mit chronischer Parodontitis zeigt, dass *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, und *Tannerella forsythia* oftmals zusammen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2) (18). Erstaunlicherweise wurde *Porphyromonas gingivalis* oder *Treponema denticola* selten in subgingivaler Plaque ohne *Tannerella forsythia* detektiert. Mineoka et al. (19) haben ebenfalls einen Zusammenhang im Vorkommen zwischen *Tannerella forsythia* und

Porphyromonas gingivalis gefunden. Tannerella forsythia wurde außerdem vor Porphyromonas gingivalis nachgewiesen (20,21). Das könnte bedeuten, dass Tannerella forsythia vor Porphyromonas gingivalis und Treponema denticola die subgingivale Plaque kolonisiert. Zijnga et al. (22) konnten bei in vivo Untersuchungen des oralen Biofilms mithilfe von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung feststellen, dass Tannerella sp. in der intermediären Schicht der subgingivalen Plaque und Porphyromonas gingivalis in Mikrokolonien in der obersten Schicht zu finden ist. Treponema- Arten wurden außerhalb der obersten Schicht detektiert. Diese Ergebnisse passen zu der These, dass Tannerella forsythia ein wichtiger Vorarbeiter für die Kolonisation von Porphyromonas gingivalis und Treponema denticola ist. Die Interaktionen der Bakterien des roten Komplexes, die Kolonisierung und das Wachstum sind noch Gegenstand der Forschung (23).

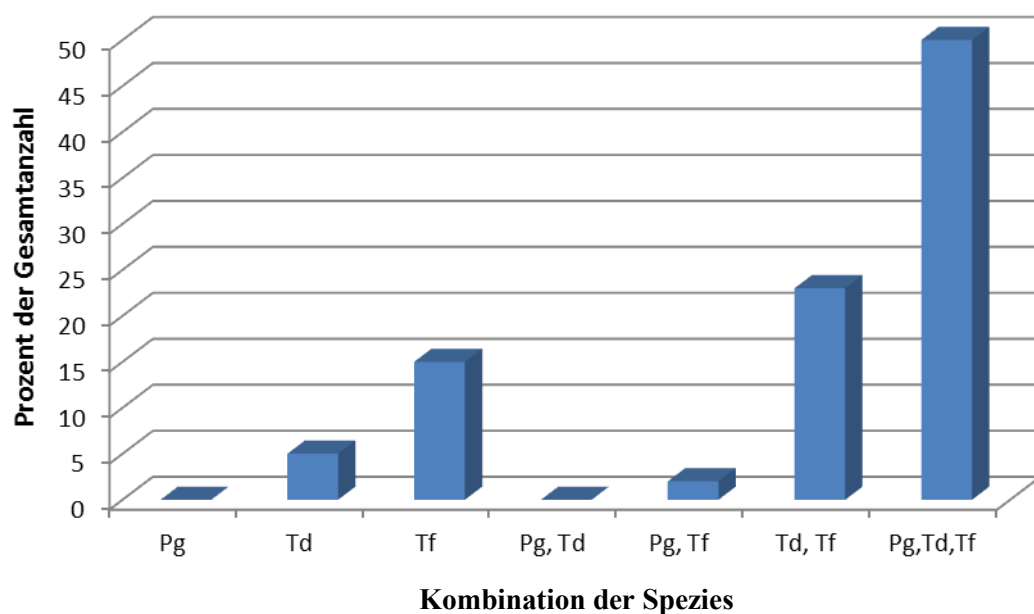


Abbildung 2: Nachweis der Kombinationen von *P.gingivalis*, *T. denticola* und *T. forsythia*. Die subgingivalen Plaqueproben wurden mittels real- Time PCR, von 37 Menschen mit kürzlich diagnostizierter chronischer Parodontitis, ermittelt. Übersetzt aus dem Englischen:(18)

Oranger Komplex

Zu dieser Gruppe gehören *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum* (orangeassoziiert), *Campylobacter rectus* (orangeassoziiert), *Campylobacter showae* (orangeassoziiert), *Campylobacter gracilis* (orangeassoziiert), und *Streptococcus constellatus* (orangeassoziiert) (10). Diese Vertreter werden als Brückenkeime zwischen den frühkolonisierenden (violetter, gelber, bzw. orange assoziierter Komplex) und den stark parodontopathogenen Keimen (roter Komplex) bezeichnet. Durch die Produktion von Toxinen und Enzymen sind die Mikroorganismen moderat bis stark pathogen gegenüber dem menschlichen Parodont. Sie sind zwar schwach beteiligt an destruktiven Prozessen, aber ihre eigentliche Bedeutung erlangen sie durch die Vorbereitungsmaßnahmen für die Bakterien des roten Komplexes. Die Stoffwechsellleistungen der Brückenkeime erlauben den stark pathogenen Keimen (roter Komplex), welche auf strikt anaerobe Lebensbedingungen angewiesen sind, sich zu integrieren. Beispielsweise sind sie in der Lage den Sauerstoffgehalt des umgebenen Milieus durch aeroben Zuckermetabolismus zu verringern, oder auch sogenannte Koaggregationsbrücken zu bilden. *Fusobacterium nucleatum* ist dadurch eine wichtige Andockstelle für Sekundärbesiedler. Als therapeutische Maßnahme ist bei niedriger Keimzahl meist eine mechanische Reinigung ausreichend. Bei ausgeprägter Symptomatik und hoher bakterieller Keimzahl muss über eine antibiotische Behandlung nachgedacht werden (1,10,21).

Gelber Komplex

Die Vertreter dieser Gruppe sind: *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii* und *Streptococcus Intermedius* (10).

Viridans-Streptokokken, einschließlich *Streptococcus gordonii* und *Streptococcus intermedius* sind Frühkolonisierer. Diese oralen Bakterien, die häufig mit der Bildung von Zahnbelag in Verbindung gebracht werden, sind grampositive, nicht bewegliche Kokken. Ihr Stoffwechsel ist fakultativ anaerobe, (*Streptococcus intermedius*: aerotolerant) (24–26). Diese Erreger können auch endokardiale Krankheiten verursachen. Als Therapie im Bereich des Zahnhalteapparats ist meist eine mechanische Reinigung genügend (1,23–25).

Grüner Komplex

Die Bakterien des grünen Komplexes, *Capnocytophaga* sp, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter concisus* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotyp a betreiben einen fakultativ anaeroben Stoffwechsel (10). Das heißt, wenn Sauerstoff in ihrer Umgebung vorhanden ist, reagieren diese Bakterien weniger empfindlich und verhalten sich deshalb anders als die bakteriellen Vertreter der anderen Komplexe. Als Therapie ist meist eine mechanische Reinigung ausreichend. Der Einsatz von Antibiotika kann bei hoher Keimzahl und/oder massiver klinischer Symptomatik erforderlich sein (1,10,11).

Violetter Komplex

Vertreter dieser Gruppe (*Veillonella parvula*, *Actinomyces odontolyticus*) sind die sogenannten Frühkolonisierer (10). Ihr eigentliches pathogenes Potenzial ist zwar begrenzt, aber sie besitzen die Fähigkeit durch spezielle Adhäsionsmoleküle den gingivalen Sulkus als erstes zu besiedeln. Sie bilden den primären Biofilm und sind die Grundlage für weitere Bakterienpopulationen. Beschränkt sich die Krankheit auf diese Spezies ist eine Scaling und Root planing meist die Therapie der Wahl (11).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotyp b, *Selenomonas-Noxia* und *Actinomyces naeslundii*-Genospezies 2 sind Outliner und haben nur wenig Bezug untereinander und zu den anderen Bakterien der fünf Komplexe (10).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Als besonderer Markerkeim zählt *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Er hat die höchste Pathogenität und ist der Leitkeim für juvenile und aggressive Parodontitiden (alte Klassifikation). Das Bakterium produziert nicht nur eine ganze Reihe proteolytischer Enzyme, es kann auch das Immunsystem beeinflussen und zerstört Zellen der humoralen Abwehr.

Basierend auf der Komplextheorie wird die Mundhöhle phasenweise durch die Vertreter der einzelnen Komplexgruppen besiedelt. Beginnend mit Vertretern des grünen Komplexes wird die „physiologische Bakterienflora“ immer weiter verdrängt. Wird diese Bakterienverschiebung nicht unterbunden, schreitet auch die jeweilige Symptomatik voran. Als Zeichen einer späten Kolonisierungsphase kann der Nachweis von Bakterien des roten Komplexes angesehen werden. Meist geht er mit einer fulminanten Entzündungsreaktion des Zahnhalteapparats einher (1,10,11).

1.3.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes Bakterium. Die alte Bezeichnung lautete *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Es ist ein unbewegliches Stäbchen und kommt bei mehr als einem Drittel der Bevölkerung in der Mundhöhle vor (27). Es kann oft bei schweren lokal aggressiven Parodontitiden nachgewiesen werden. Aber auch bei anderen Erkrankungen des menschlichen Körpers, beispielsweise Endokarditis, wird über einen pathologischen Zusammenhang diskutiert (28).

Das Bakterium ist mit einer ganzen Reihe von Virulenzfaktoren wie Adhäsionsproteine, Lipopolysaccharide, Biofilm Polysaccharide, Zytotoxine, Chemotaxis- Hemmer, Leukotoxine, Kollagenosen, immunsuppressive Faktoren und Invasine ausgestattet (29). Die zwei bedeutendsten Toxine, die produziert werden, sind cytolethal distending toxin und Leukotoxin A. Die unterschiedlichen Serotypen erzeugen verschieden viel Leukotoxin A. Dieses Toxin ermöglicht es dem Bakterium in fremdes Gewebe einzudringen und Immunzellen des Menschen zu zerstören (30).

1.3.2 *Porphyromonas gingivalis* (Pg)

Porphyromonas gingivalis ist ein gramnegatives anaerobes, nicht bewegliches Stäbchenbakterium. Vor Einführung des Genus *Porphyromonas* lautete die Bezeichnung *Bacteriodes gingivalis*. (31). Der Keim gilt als Hauptverantwortlicher der chronischen Parodontitis. Laut Studien konnte er in über 85% bei Personen mit chronischer Parodontitis in der subgingivalen Plaque nachgewiesen werden (32). Sein Vorkommen ist aber nicht nur auf die Mundhöhle beschränkt. Man kann ihn im oberen Gastrointestinaltrakt, im Atemtrakt, im Kolon und sogar bei Frauen mit Aminkolpitis in der Vagina nachweisen. Er produziert eine Vielzahl von Virulenzfaktoren welche dem Zahnhalteapparat direkt und indirekt Schaden zufügen und Immunprozesse beeinflussen. Um sein Überleben im Wirt zu sichern, ist der Keim in der Lage ins Gewebe einzuwandern.

Die wichtigsten Virulenzfaktoren sind Gingipaine, Hämagglutinine und Fimbrien. Mit Hilfe der Gingipaine ist das Bakterium in der Lage Proteine zu spalten. Mit der Zersetzung von Albumin oder Kollagenstrukturen erschließen sich dem Keim reichhaltige Stickstoff- und Kohlenstoffquellen. Die Fimbrien benutzt der Erreger um sich erfolgreich im Wirt einzunisten (2,4,17,18).

1.3.3 Tannerella forsythia (Tf)

Tannerella forsythia ist ein anaerobes fusiformes gramnegatives Bakterium. Socransky (10) teilt diesen Erreger in den roten Komplex ein, was den Stellenwert in Hinsicht auf parodontologische Pathogenität unterstreicht. Die alte Bezeichnung lautet *Bacteriodes forsythus*, wurde aber von Sakamoto et al. (33) neu kategorisiert. Namensgeberin der heutigen Benennung ist die Entdeckerin Dr. Anne Tanner (34), welche für das Forsyth Institut in Cambridge, Massachusetts, arbeitet. Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass Tf mit Fortschreiten einer Parodontitis und Attachmentverlust in Zusammenhang steht (35–39). Das Bakterium kann auch mit anderen Erkrankungen beispielsweise Atherosklerose in Verbindung gebracht werden. Bis jetzt wurden nur wenige Virulenzfaktoren identifiziert. Dazu gehören Cystein Protease (PrtH), Sialidasen (SiaH), NanH, Oberflächenprotein BspA welches Apoptose auslösen kann, Karilysin und Mirolase. Die Züchtung des Keimes im Labor stellt sich aufgrund seiner anspruchsvollen anaeroben Wachstumsbedingungen äußerst schwierig dar (40).

1.3.4 Treponema denticola (Td)

Treponema denticola ist ein gramnegatives obligat anaerobes bewegliches Bakterium aus dem Phylum Spirochäten. Aufgrund seiner Beweglichkeit und pathogener Potenz kann der Keim tief in Zahnfleischtaschen einwandern. Nachweisbar ist er bei fortgeschrittenen Parodontitiden sowie bei nekrotisierenden Zahnfleischerkrankungen. Td gilt als Hauptverantwortlicher der nekrotisierenden ulzerierenden Gingivitis/Parodontitis (NUG/NUP alte Klassifikation). *Treponema denticola* produziert eine ganze Reihe von Virulenzfaktoren. Der Erreger besitzt an seiner äußeren Membran Lipooligosaccharide (LOS). Diese Strukturen sind funktional gleich den Lipopolisacchariden (LPS). Mithilfe von LOS kann die Osteoklastenproduktion und matrix metalloproteinase Expression stimuliert werden. Dies kann zu einer Exazerbation der parodontologischen Erkrankung führen (41). Hauptverantwortlich für chronische Parodontitiden sind folgende Eigenschaften: Die Beweglichkeit und Chemotaxis, welche dem Keim erlaubten schnell neue Gebiete zu kolonisieren, tief in parodontale Taschen einzudringen und das Epithel zu infiltrieren. Die Fähigkeit mit Bakterien unterschiedlicher Schichten zu interagieren, die Produktion von zytotoxischen Metaboliten und Oberflächenproteine, welche das Immunsystem beeinflussen, sind der Grund für seine Pathogenität (23).

1.3.5 Prevotella intermedia (Pi)

Prevotella intermedia ist ein anaerobes gramnegatives pleomorph stäbchenförmiges Bakterium. Es bildet keine Sporen und ist unbeweglich. Dieser Mikroorganismus ist nicht nur in der Mundhöhle zu finden. Es besiedelt unter anderem auch den Gastrointestinaltrakt, und die Vagina. Im Hinblick auf parodontale Erkrankungen spielt der Keim eine wichtige Rolle als Wegbereiter für die Bakterien des roten Komplexes. Die produzierten Stoffwechselprodukte initiieren und unterhalten Parodontitiden direkt und indirekt (42). Selbst ist es im orangen Komplex klassifiziert. Durch den Besitz von Exopolysacchariden, das sind neutrale Zucker und Mannose, ist das Bakterium ein wichtiger Teil des pathogenen Biofilms. Weiters schützt es andere Erreger vor Angriffen des menschlichen Immunsystems (43).

	Komplex	Pathogenität	Besonderheiten	Therapie
Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa)	Aa-Komplex	Sehr hoch	Gramnegativ, fakultativ anaerob, exogene Übertragung, gewebeinvasiv, Rezidivgefahr	SRP plus Amoxicillin (Ciprofloxacin)
Porphyromonas gingivalis (Pg)	Roter Komplex	Sehr hoch	Gramnegativ, obligat anaerob, exogene Übertragung möglich, gewebeinvasiv, Rezidivgefahr	SRP plus Metronidazol oder Clindamycin
Tannerella forsythia (Tf)	Roter Komplex	Sehr hoch	Gramnegativ, obligat anaerob, exogene Übertragung möglich, gewebeinvasiv, Rezidivgefahr	SRP plus Metronidazol oder Clindamycin
Treponema denticola (Td)	Roter Komplex	Hoch	Gramnegativ, Spirochaet, obligat anaerob, gewebeinvasiv, Rezidivgefahr	SRP plus Metronidazol oder Clindamycin
Prevotella intermedia	Oranger Komplex	Hoch	Gramnegativ, obligat anaerob, „Brückenspezies“ bereitet Milieu für Keime des	SRP plus Metronidazol oder Clindamycin

			roten Komplexes vor	
Parvimonas micra(Pm)	Oranger Komplex	Hoch	Grampositiver Coccus, obligat anaerob, hohe Proteaseaktivität	SRP plus Clindamycin
Fusobacterium nucleatum (Fn)	Oranger Komplex	Moderat	Gramnegativ, anaerob, wichtige Brückenspezies	SRP plus Metronidazol oder Clindamycin
Campylobacter rectus (Cr)	Orange-assoziierter Komplex	Moderat	Mikroaerophil, gramnegativ, Frühkolonisierer, bildet Leukotoxin ähnliches Protein	SRP +/- Metronidazol oder Clindamycin
Eubacterium nodatum (En)	Orange-assoziierter Komplex	Hoch	Obligat anaerob, grampositiv, erleichtert Kolonisation anspruchsvoller Keime	SRP +/- Metronidazol oder Clindamycin
Eikenella corrodens (Ec)	Grüner Komplex	Moderat	Fakultativ anaerob, gramnegativ	SRP +/- Amoxicillin (Ciprofloxacin)
Capnocytophag sp. (Cs)	Grüner Komplex	Moderat	Fakultativ anaerob, gramnegativ	SRP +/- Amoxicillin (Ciprofloxacin)

Tabelle 2: Parodontale Markerkeime in Anlehnung an (44)

1.4 Klassifikation

Wichtig sind Klassifikationen im Bereich der Medizin sowohl für Patientinnen und Patienten als auch für Behandlerinnen und Behandler um eine richtige, vor allem einheitliche, Diagnose und Therapie zu ermöglichen. Wissenschaftliche Aussagen bedingen eine definierte Einteilung der Krankheitsbilder und können so Aussagen über Verlauf, Prognose und Häufigkeit einer Erkrankung tätigen (45).

In den letzten 30 Jahren wurden die Einteilungen immer wieder modifiziert. Am 30.10.1999 klassifizierte die American Academy of Periodontology (AAP) beim „International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions“ in Oakbrook (USA) Parodontalerkrankungen folgendermaßen (46):

- I. Gingivale Erkrankungen
- II. Chronische Parodontitis
- III. Aggressive Parodontitis
- IV. Parodontitis als Manifestation einer Systemerkrankung
- V. Nekrotisierende Parodontalerkrankungen
- VI. Abszesse des Parodonts
- VII. Parodontitis im Zusammenhang mit endodontischen Läsionen
- VIII. Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände

Eine überarbeitete Klassifikation wurde im Juni 2018 auf der EuroPerio9 in Amsterdam vorgestellt (47). Die neue Einteilung basiert auf der Konsensuskonferenz im November 2017 in Chicago. Organisiert wurde diese Veranstaltung durch die AAP und die European Federation of Periodontology (EFP). Erstmals wird die parodontale und peri-implantäre Gesundheit definiert, die alte Einteilung von „chronische“ und „aggressive“ Parodontitis wird durch ein „Grading“ und „Staging“ System ersetzt. Neu ist die Klassifikation für peri-implantäre Erkrankungen.

Bezugnehmend auf neueste wissenschaftliche Erkenntnisse der Pathophysiologie und dem klinischen Krankheitsbild werden drei Formen der Parodontitis unterschieden:

- Nekrotisierende Parodontitis
- Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen
- Parodontitis

Erweitert wird die oben angeführte Einteilung durch ein „Staging“ – dem Stadium und ein „Grading“ dem Grad der Parodontitis. Das Stadium ergibt sich vom Schweregrad der Diagnose und von der Komplexität ihrer Behandlung und wird in vier Kategorien unterteilt

(Stadium I bis IV). Bestimmt wird es durch klinische Parameter wie: röntgenologisch nachgewiesener Knochenabbau, Attachmentverlust, Sondierungstiefe, vertikale Defekte und Furkationsbeteiligung, Zahnbeweglichkeit und Zahnverlust bedingt durch Parodontitis. Stadium I steht für eine frühe beginnende Parodontitis. Im zweiten Stadium ist das koronale Wurzeldrittel von Abbauprozessen betroffen, es liegen Zahnfleischtaschen (> 5mm) vor, aber es sind noch keine Zähne auf Kosten der Parodontitis verloren gegangen. In der Regel führen nicht- chirurgische Interventionen in Kombination mit adäquater häuslicher Mundhygiene zum Therapieerfolg. Stadium III entspricht einer fortgeschrittenen Parodontitis. Attachmentverlust der betroffenen Zähne geht über die halbe Wurzellänge hinaus. Weiters können Furkationsdefekte und/oder vertikale Knochendefekte vorhanden sein. Auch sind ein paar Zähne verlorenen gegangen. Die Therapie ist aufwendig und stützt sich meist auch auf chirurgische Maßnahmen. Das letzte Stadium (IV) ist gekennzeichnet durch eine äußerst komplexe Krankheitssituation bei der bereits mehr als fünf Zähne der Parodontitis zum Opfer gefallen sind und verloren wurden. Therapeutisch muss hier meist interdisziplinär gearbeitet werden. Der Grad gibt Auskunft hinsichtlich Krankheitsprogression und Risiken. Die Einteilung erfolgt in drei Kategorien (A, B, C). Grad A bedeutet niedriges Risiko, B mittleres Risiko und C hohes Risiko für Krankheitsprogression. Außerdem werden im „Grading“ individuelle Patientenparameter berücksichtigt, wie zum Beispiel Blutzuckerkontrolle bei Diabetes Mellitus oder Zigaretten Konsum. Diese neue Einteilung der Parodontitis erlaubt eine einfache patientengerechte Einteilung seines Krankheitsbildes und erleichtert eine individuelle personalisierte Therapie (47,48).

Parodontale Erkrankungen und Zustände									
Parodontale Gesundheit, Gingivale Erkrankungen			Parodontitis			Andere das Parodont betreffende Zustände			
Parodontale Gesundheit und gingivale Gesundheit	Gingivitis: Biofilm induziert	Gingivale Erkrankungen: nicht Biofilm induziert	Nekrotisierende parodontale Erkrankungen	Parodontitis	Parodontitis als Manifestation einer systemischen Erkrankung	Systemische Erkrankungen und Zustände mit Einfluss auf das Parodontium	Mukogingivale Deformitäten und Zustände	Traumatische okklusale Kräfte	Zahn und Zahnersatz bezogene Faktoren
Peri-implantäre Erkrankungen und Zustände									
Peri-implantäre Gesundheit			Peri-implantäre Mukositis			Peri- implantitis		Peri-implantäre Weich und Hartgewebsdefizite	

Tabelle 3: Einteilung parodontaler Erkrankungen in Anlehnung an (46)

1.5 Testmethoden/ Nachweisverfahren

Ein mikrobieller Nachweis ist nur dann indiziert, wenn sich dadurch therapeutische Zusatzinformationen erschließen. Ein Vorteil ist die Ermöglichung einer Patientinnen und Patienten adaptierten adjuvanten systemischen Antibiotikatherapie, da unterschiedliche Bakterien Parodontitiden verursachen können (49). Weiters können damit Risikopatientinnen und Risikopatienten identifiziert werden. Es kann zur risikoadäquaten Recall- Therapie und Planung herangezogen werden.

Die Deutsche Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und die Deutsche Gesellschaft für Zahn – und Kieferheilkunde (DGZMK) haben zur mikrobiologische Diagnostik in der Parodontitistherapie eine Stellungnahme veröffentlicht (49). Folgende Diagnosestellungen haben eine Indikation zur mikrobiologischen Analyse subgingivaler Plaqueproben (alte Klassifikation) (49):

- Aggressive Parodontitis
- Schwere chronische Parodontitis
- Parodontitiden, die trotz vorangegangener Therapie progrediente Attachmentverluste aufweisen
- Mittelschwere bis schwere Parodontitiden bei systemischer Erkrankung oder Zuständen, die die Funktion des Immunsystems beeinträchtigen

Nachfolgend soll ein kurzer Überblick über die wichtigsten Nachweisverfahren gegeben werden. Näher besprochen werden: mikroskopische Verfahren, Kulturverfahren, Immunassays, enzymatische Methoden und genetische Testmethoden.

1.6 Entnahmetechnik klinischer Proben

Um Probematerial für Erregerdiagnostik aus parodontalen Taschen (subgingival) zu Erhalten gibt es zahlreiche Möglichkeiten. Empfohlen wird meist die Entnahme mittels steriler Papierspitzen. Werden mehrere Proben aus unterschiedlichen Entnahmestellen zusammengeführt und ausgewertet spricht man von einem „Pool“ (Pool- Probe).

Vor Probenentnahme soll die Entnahmestelle gesäubert werden, das heißt, dass die supragingivale Plaque entfernt wird. Anschließend trocknet man das Gebiet vorzugsweise mit einem Wattepellet. Lufttrocknung birgt die Gefahr der Kontamination mit sich. Die Papierspitze führt man dann bis zum Taschenfundus ein und belässt sie dort für zwanzig Sekunden. Der Durchmesser der Papierspitze sollte zwischen ISO 20 und ISO 35 betragen. Beim Entfernen sollte darauf geachtet werden, dass die Probe nicht mit Speichel, Blut oder Pus in Berührung kommt und so das Messergebnis verfälscht. Zur Weiterverarbeitung wird die Papierspitze dicht verschlossen in ein steriles Transportröhrchen gegeben und je nach Analyseverfahren eingefroren und verschickt (1,50).

1.6.1 Mikroskopische Verfahren

Beim mikroskopischen Bakteriennachweis werden Bakterienproben auf spezielle Glasplättchen fixiert. Entnommen werden die Proben mithilfe von Papierspitzen aus besonders tiefen Zahnfleischtaschen. Nach der Fixierung werden die Proben gefärbt. Bei der Gram- Färbung, benannt nach seinem Erfinder dem dänischen Bakteriologen Hans Christian Gram, können Bakterien anhand dem Aufbau ihrer Zellwände unterschieden werden (51). Danach werden die Proben unter einem Lichtmikroskop untersucht. Diese rasche Testung erlaubt eine grobe Differenzierung der Keime. Grampositive Bakterien erscheinen blau, gramnegative rot unter dem Mikroskop.

Ein Nachteil ist allerdings, dass sich keine Einzel- Erreger bestimmen lassen. Somit können pathogene Markerkeime nicht mit Sicherheit identifiziert werden (1).

1.6.2 Kulturverfahren

Im molekularbiologischen Labor werden Bakterienproben in Petrischalen angezchtet. Dieser Prozess nimmt etwa 24 Stunden in Anspruch.

Vorteil der Bakterienanzchtung ist die Möglichkeit der Herstellung eines Antibiogramms. Damit lassen sich Antibiotikaresistenzen der entnommenen Bakterien nachweisen.

Nachteile des Kulturverfahrens sind folgende Punkte:

Es können nicht alle Bakterien auf einem Nährboden angezüchtet werden (Beispielsweise Spirochäten). Bei der Entnahme von Proben können Bakterien absterben (obligat anaerobe Bakterien). Der Kultivierungsprozess ist zeitaufwendig und kann mehrere Wochen beanspruchen. Die vielen Arbeitsschritte und die mühsame mikrobiologische Diagnostik sind sehr kostspielig (1).

1.6.3 Immunassay

Immunassay, im englischen Immunoassay, ist ein biochemischer Test welcher das Vorhandensein von Molekülen mittels Antikörper Antigen Bindung feststellt. Das zu detektierende Molekül, der sogenannte Analyt liegt beim Immunassay in einer flüssigen Phase vor. Es kann sowohl Antikörper wie auch Antigen der aufzudeckende Analyt sein.

Bei diesem bioanalytischen Testverfahren können Mikroorganismen anhand ihrer Oberflächenmerkmale, das sind meist Glykoprotein- oder Kohlenhydrat-Ketten (Antigen), mithilfe von sich anheftenden Antikörpern nachgewiesen werden. Zum Sichtbarmachen und zur quantitativen Bestimmung müssen markierte Substanzen zum Einsatz kommen. Unterschiedliche Anwendungsformen verlangen verschiedene Markierungen. So kann man Beispielsweise Enzyme, Fluoreszenz- Farbstoffe oder sogar schwach radioaktive Substanzen zur Markierung verwenden. Weiters können die unterschiedlichen Assay-Prinzipien unterschieden werden. Ein kompetitiver Immunassay kommt zum Einsatz, wenn für ein Antigen nur ein einzelner spezifischer Antikörper zur Verfügung steht, oder daran binden kann. Man lässt ein markiertes Antigen mit bekannter Konzentration und ein Antigen mit unbekannter Konzentration um die Antikörper- Antigen Bindung konkurrieren. Anhand der Menge der gebundenen markierten Antigene kann auf die gesuchte Menge der unbekanntes Antigene rückgeschlossen werden. Ein nicht-kompetitiver Immunassay arbeitet mit Antikörpern einer bestimmten Menge, welche im Überschuss zum Analyt gegeben werden. Die freien Antikörper werden mit markierten Antigenen versehen und dann die Konzentration bestimmt. Bei einem Sandwich-Immunassay werden zwei unterschiedliche Antikörper im Überschuss zu einem Analyt gegeben. Durch die unterschiedlichen Bindungsstellen der Antikörper entsteht eine stärkere Markierung und höhere Sensitivität (52).

In der Praxis haben diese Nachweisverfahren bei Therapie und Diagnostik von parodontalen Krankheiten allerdings wenig Verbreitung.

1.6.4 Enzymatische Methoden

Mit dem mikrobiologisch- enzymatischen BANA – Test ist es möglich auf das Vorhandensein von *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* rückzuschließen. Die Abkürzung BANA steht für N- α -Benzoyl-DL-Arginin-2-Naphtylamid. Dieses synthetisch hergestellte Peptid wird von einem Trypsin ähnlichem Enzym, welches von Pg, Tf und Td gebildet wird, hydrolysiert. Das Spaltprodukt β -Naphtylamid kann anschließend gefärbt und sichtbar gemacht werden (53). Entwickelt wurde dieser Test von Dr. Walter Löesche und Mitarbeitern (54) in Michigan, USA. Vorteil dieser Testmethode ist die Anwendung direkt am Behandlungsstuhl. Hervorzuheben ist die sehr hohe Sensitivität des BANA- Tests, welche mit DNA Proben vergleichbar ist. Nachteilig ist, dass nicht alle Bakterien detektiert werden können. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* wird beispielsweise angezeigt. Auch kann bei einem positiven Test nicht genau gesagt werden, welches Bakterium für die Reaktion verantwortlich ist. So können auch Keime wie *Capnocytophaga* spp, die wesentlich weniger pathogen sind, zu einem positiven Ergebnis führen (53,54).

1.6.5 Genetische Testmethoden

Seit mehreren Jahren werden gentechnische Methoden zur Parodontitisdiagnostik eingesetzt. Vorteil dieses Verfahrens ist, dass diese Tests sehr empfindlich sind, und dass auch Bakterien welche bei der Entnahme abgetötet werden (Anaerobier) nachgewiesen werden können (55).

Etabliert haben sich zwei verschiedene Testsysteme: Hybridisierungsmethoden (FISH, Checkerboard Hybridisierung, Mikroarrays, Gensonden) und die PCR- Analyse.

DNA/ DNA- Hybridisierung dient zum Nachweis bestimmter DNA- Sequenzen. Dabei lagern sich gesuchte DNA- Abfolgen eines Gens an einer komplementären Basenabfolge von Poly- oder Oligonukleotide (DNA- Sonden mit 24-30 Basenpaaren) an.

Gensonden finden Anwendung in der Genomanalyse und der Expressionsanalyse. Typische Beispiele sind der Southern Blot, Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung (FISH) und die In- situ Hybridisierung (56).

Hybridisierungsmethoden

Gensonden

Bei Gensondentests muss die Doppelstrangstruktur der DNA- bzw. der RNA- Sequenzen separiert werden. Nach dem Denaturieren werden die Proben auf einer Membran fixiert. Aufgrund der Tatsache, dass in jedem Bakterium nur ein DNA- Satz vorhanden ist, müssen die Erbanlagen vermehrt werden. Dies geschieht mittels einer PCR (Polymerase chain reaction). Das ist allerdings nur für eine DNA/ DNA- Hybridisierung notwendig. rRNA findet sich 100-1000 fach in den Ribosomen und ist der Grund, warum bei einer RNA/DNA Hybridisierung das Erbmaterial nicht vervielfältigt werden muss. Ein Vorteil ist, dass keine lebenden Bakterien für den Test notwendig sind. Das bringt mit sich, dass der Transport vom Probenmaterial einfacher gestaltet ist (1,56).

Microarrays

Microarrays, oder auch Genchips, sind Sammelbezeichnungen für molekularbiologische Untersuchungssysteme, welche auf kleinsten Raum parallel mehrere tausend Einzelnachweise ermöglichen. Eingesetzt werden viele verschiedene Arten dieses Analyseverfahrens, beispielsweise DNA- Microarrays, Protein- Microarrays, Transfektions- Microarrays, Tissue- Microarrays, Kohlenhydrat- Mikroarrays.

Bei einem DNA- Microarray werden auf einem Träger fixierte DNA- Moleküle mit komplementären Nukleinsäuren hybridisiert. Das geschieht meist mit fluoreszierenden Substanzen, welche zur Auswertung verwendet werden. Man kann „Photolithographische-Chips“ und „DNA- Chips“ unterscheiden. Bei den Photolithographischen- Chips werden die Nukleotide schrittweise auf der Chipoberfläche synthetisiert. Bei den „DNA-Chips“ wird ein fertiges Stück Nukleinsäure auf der Chipoberfläche angeheftet.

Realisierung dieser Technologie bedurfte ein interdisziplinäres Zusammenarbeiten von Ingenieuren, Biologen, Chemikern, Computerwissenschaftlern, Medizinerinnen und Physikern. Dadurch war es möglich unterschiedliche Verfahren wie DNA- Synthese, Oligonukleotid-Synthese, Neuentwicklung und Synthese von Fluoreszenzfarbstoffen, Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, Oligonukleotid- Immobilisierung, Festphasentechnik, Lasertechnologie für Detektionssysteme, Chip- und Wafer- Herstellung, Geräteentwicklung, Datenanalyse mit spezieller Software und Entwicklung geeigneter bildgebender Algorithmen zu verwirklichen (56).

Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion, im englischen polymerase chain reaction (PCR), ist ein Verfahren um bestimmte Abschnitte von Erbmateriale (DNA) im Labor zu vervielfältigen. Das sogenannte Template, das ist ein bestimmter Bereich der DNA (z. B ein Gen), wird mithilfe von zwei Primern, einer DNA- Polymerase (z.B. Taq- Polymerase), Desoxyribonucleosidtriphosphate, Mg^{2+} - Ionen in einer Pufferlösung multipliziert. Das Ganze findet in einem Thermocycler statt. Ein Gerät welches die Temperatur des Reagenzglases erhöht und verringert um die Reaktionsprozesse zu gewährleisten. Mit modernen Geräten kann ein DNA-Stück in 20 Minuten eine Milliarde Mal vervielfältigt werden (57).

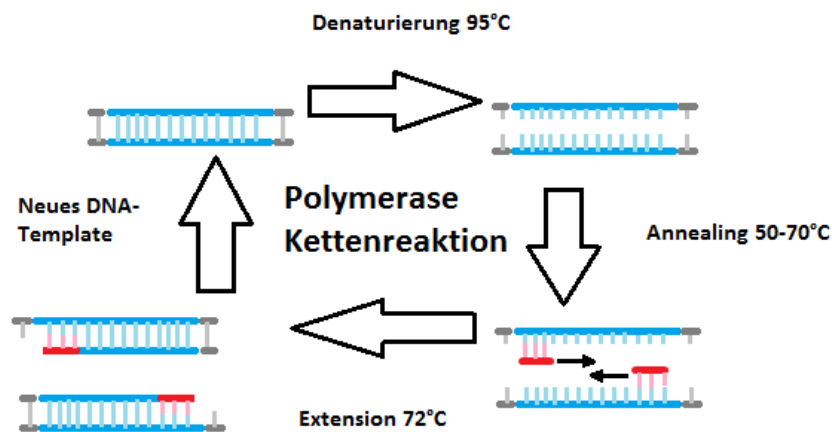


Abbildung 3: PCR Zyklus (57)

Da nur etwa die Hälfte der oralen Bakterien mit konventionellen Bakterienkulturen gezüchtet und detektiert werden kann, gehört die Polymerase Kettenreaktion zu den Standardmethoden um Erbmateriale zu vervielfältigen und nachzuweisen (58).

Typische Gensequenz ist beispielsweise die Signatursequenz der 16S ribosomalen RNA (59). Dieses Gen mit seinen variablen Regionen ist in allen Prokaryoten nachweisbar und ist einzigartig für die jeweiligen Mikroorganismen. Es wurden sogar eigene Datenbanken beispielsweise Human Oral Microbiome Database (www.homd.org) entwickelt, mit deren Hilfe man Sequenzdatensätze vergleichen kann (6). Darüber hinaus werden phänotypische klinische Informationen mit dem Ziel das orale Mikrobiom in Hinblick auf Krankheit und Gesundheit besser zu verstehen, veröffentlicht.

Im Bereich der Parodontologie kann man spezielle Gensequenzen, beispielsweise das Leukotoxin- Gen von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, oder Kollagenasen als Signatursequenz nutzen. Bei der DNA/RNA- Hybridisierung nutzt man das große

Vorkommen bakterieller ribosomaler (r)RNA- Moleküle. Im Gegensatz zur DNA/DNA-Hybridisierung müssen die Zielmoleküle nicht vermehrt werden. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist seine hohe Sensitivität. Weniger als 100 Zellen können detektiert werden. Dadurch entsteht der Nachteil, dass eine klinisch unbedeutende Menge an Zellen angezeigt wird ohne die tatsächliche Menge zu wissen. In anderen Verfahren, real- time PCR und Endpoint PCR können auch quantitative Ergebnisse erzielt werden (56).

PCR- Technologien

Multiplex PCR

Die Multiplex PCR ist die Weiterentwicklung der single target PCR. Diese Technik ermöglicht es durch Verwendung von mehreren Primer die Amplifikation mehrerer Gene auf einmal durchzuführen. Dies wird genutzt um verschiedene Bakterien gleichzeitig zu detektieren (56). Der kommerziell erhältliche Test micro-IDent® bzw. micro-IDent® plus 11 der Firma Hain Lifescience GmbH, Nehren, Deutschland basiert auf dieser Methode um die fünf (micro- IDent®) bzw. elf (micro- IDent® plus 11) wichtigsten parodontopathogenen Bakterien nachzuweisen.

Real- time PCR

Mit diesem PCR- Verfahren lässt sich die Zahl der DNA- Kopien quantifizieren. Ermöglicht wird das durch die Zugabe eines anfangs inaktiven Fluoreszenzfarbstoffes. Dieser wird der Reaktion beigemischt und aktiviert sich durch DNA- Produktion (beispielsweise lagert sich der Farbstoff in die DNA ein). Die Fluoreszenz wird bei jedem Zyklus (in „real time“) gemessen. Damit kann auf die Menge der amplifizierten DNA geschlossen werden. Die andere Bezeichnung „quantitative PCR“ (qPCR) beruht darauf, dass irgendwann (abhängig von der Anzahl an DNA) ein bestimmter Schwellenwert des Fluoreszenzsignals erreicht wird. Natürlich unter der Voraussetzung, dass die nachzuweisende DNA vorhanden ist und amplifiziert wird, sonst kommt es zu keiner Fluoreszenz.

Der kommerziell erhältliche Test MyPerioPath® der Firma OralDNA® Eden Prairie, MN, Vereinigte Staaten von Amerika, basiert auf dieser Methode um die elf wichtigsten parodontopathogenen Bakterien nachzuweisen. Bei diesem Test werden außer Bakterien auch ein Follow –up und Behandlungsoptionen übermittelt (56).

Reverse Transkription PCR (rt- PCR)

Mit diesem labortechnischen Verfahren ist es möglich RNA zu amplifizieren. Erreicht wird das durch den Einsatz einer reversen Transkriptase, die RNA in DNA „überschreibt“. Kombiniert wird das Verfahren mit einer PCR (60).

2 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel dieser Untersuchung war es, den neu entwickelten RNA- basierten Bakterientest in seiner Anwendung zu prüfen. Die Vorteile bei der Benutzung dieses neuen Testsystems könnten sich bei der einfachen und schnellen Handhabung, den Verzicht auf auswärtige Labore, dem Zeitgewinn während der Behandlung und den sicheren aussagekräftigen Ergebnissen widerspiegeln. Ferner wäre eine Anwendung des RNA basierten Bakterientests im Sinne einer präventionsorientierten Behandlung bei Risikopatientinnen und Risikopatienten in der Praxis vorstellbar.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob ein Unterschied in den Untersuchungsergebnissen zwischen DNA- und RNA- Tests vorliegt.

Hauptziel:

Insbesondere soll im Rahmen der vorliegenden Untersuchung die Anwendbarkeit/Handling und der zeitliche Aufwand der Durchführung von RNA (PerioPOC®) und DNA- Tests (micro-IDent® plus11) überprüft werden.

Nebenziel:

Als Nebenziel soll die Effektivität bei der Detektion parodontopathogener Bakterien überprüft werden. Wissenschaftliche Daten bezüglich RNA basierter parodontopathogener Bakterientests sind Mangelware. In der klinischen Studie soll der Unterschied zwischen RNA und DNA- Tests aufgezeigt werden.

Es werden vier parodontologisch geschädigte Zähne (Taschentiefe > 6mm), wovon zwei aktive (bleeding on probing positiv) und zwei inaktive (bleeding on probing negativ) Zahntaschen vorweisen, untersucht. Vorzugsweise sollte pro Quadrant ein Zahn geprüft werden. An den Zahntaschen werden jeweils ein standardmäßiger DNA- Bakterientest und zusätzlich ein RNA- Bakterientest durchgeführt. So wird die Keimbesiedelung von aktiven Taschen mit nicht aktiven Taschen verglichen.

2.1 Testablauf

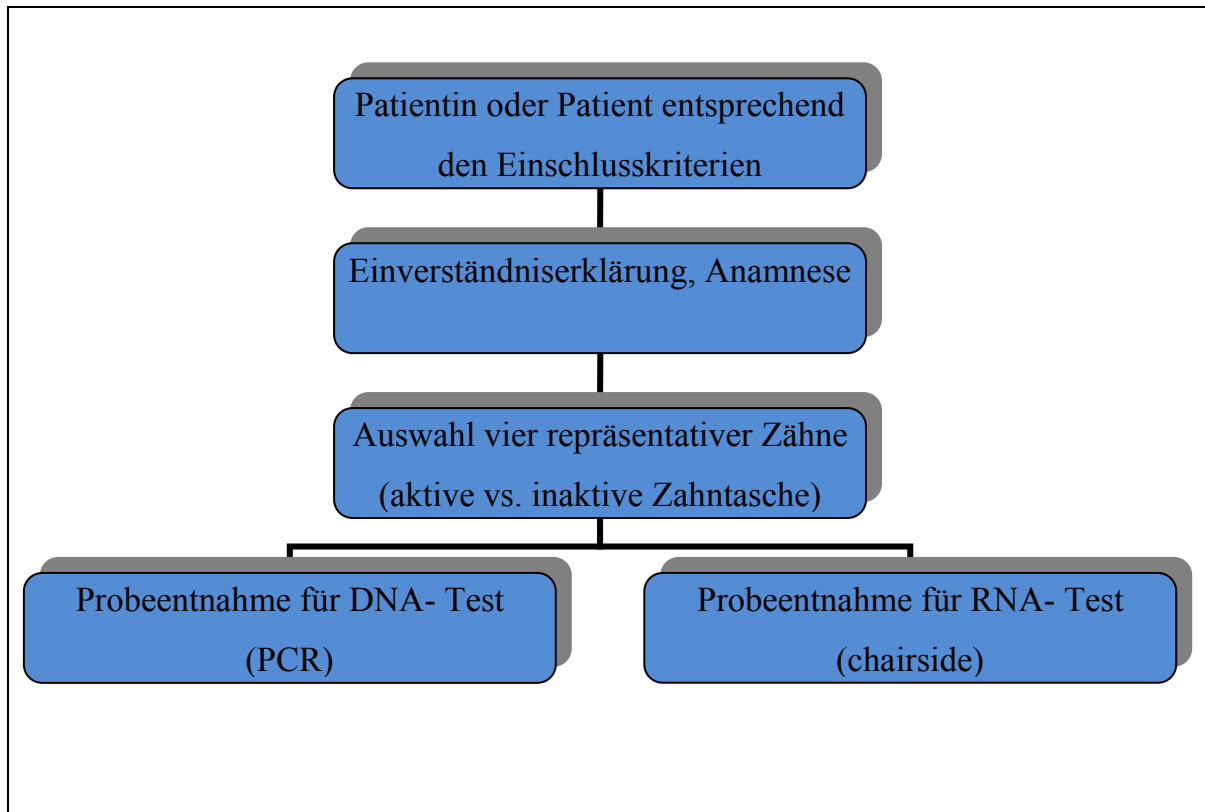


Abbildung 4: Testablauf

3 Material und Methoden

Bei der vorliegenden Arbeit wurde eine Literaturrecherche in medizinischen Datenbanken MEDLINE/PubMed und Online-Zeitschriften, sowie medizinischer Fachliteratur durchgeführt. Besonders auf die Empfehlungen der Österreichischen Gesellschaft für Parodontologie (ÖGP) wurde zurückgegriffen.

Als Suchwörter dienten u.a. periodontitis, risk-factors, tests, plaque, screening test, PCR, RNA, DNA.

Studienzentrum

Die Studie wurde nach positivem Ethikvotum (31-156ex 18/19) an der Abteilung für Zahnerhaltung, Parodontologie und Zahnersatzkunde an der Universitätsklinik für Zahnmedizin und Mundgesundheit durchgeführt. Studienleiter war Univ.-Ass. Priv. – Doz.Dr.med.univ. Wimmer Gernot. Prüfarzt war Dr. Behrouz Arefnia. Die Auswertung des molekularbiologischen Erregertests (micro- IDent® plus 11) erfolgte am Institut für Krankenhaushygiene und Mikrobiologie, Stiftingtalstraße 14 8010 Graz.

Anwendung und Beschreibung des RNA Tests

PerioPOC® der Firma GENSPEED Biotech GmbH ist ein chairside anwendbarer Bakterientest. Detektiert werden RNA-Sequenzen der fünf wichtigsten parodontopathologischen Keime: *Treponema denticola* (Td), *Tannerella forsythia* (Tf), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi) und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa).

Anwendung: Mit einer sterilen Papierspitze wird in der zu testenden Zahntasche eine Bakterienprobe entnommen. Danach kommt die Papierspitze in ein steriles Proberöhrchen. Sechs Tropfen der Flüssigkeit „Solution A“ werden hinzugegeben. Nach gründlichem Durchschütteln wird das Proberöhrchen für sechs Minuten bei 95°C in einen Mini- Heat-Block gegeben. Danach wird das Gemisch mit einer sterilen Pipette entnommen und auf den PerioPOC®-Testchip appliziert. Nach den vorgeschriebenen Wartezeiten und weiteren Zugaben von den PerioPOC®- Flüssigkeiten, „Solution B“, „Solution C“ und „Solution D“ wird das Testergebnis auf dem Testchip angezeigt. Die ganze Prozedur nimmt ungefähr 20 Minuten in Anspruch. Die Patientinnen und der Patient erfährt dabei keinen Kontakt mit

den PerioPOC®- Flüssigkeiten oder dem PerioPOC®-Testchip. Jedes Testkit ist mit einer eigenen Chargennummer versehen.

Anwendung und Beschreibung des DNA Tests

Der micro-IDent® plus 11-Test der Firma Hain Lifescience ist ein In-vitro-Test zur Identifizierung von elf parodontopathogenen Bakterienspezies aus subgingivalen Plaqueproben. Folgende Markerkeime können nachgewiesen werden: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ehemalige Bez.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* (ehemalige Bez.: *Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola*, *Parvimonas micra* (ehemalige Bez.: *Micromonas micros*, *Peptostreptococcus micros*), *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Eikenella corrodens* und *Capnocytophaga* spp. (*C. gingivalis*, *C. ochracea*, *C. sputigena*).

Der Test ist indiziert zur Unterstützung der Diagnosestellung und zur Anwendung in medizinischen Laboratorien vorgesehen.

Dieses Testsystem basiert auf einem Multiplex- PCR, welche von einer reversen Hybridisierung gefolgt wird. Die Amplifikate binden spezifisch an 16Sr DNA, welche an charakteristischen Stellen auf einer Nitrozellulosemembran verankert sind. Mittels Färbereaktion in Form von Banden wird das Ergebnis sichtbar gemacht.

Auswahl der Probanden

Es wurden 30 Patientinnen und Patienten mit nachgewiesener Parodontitis rekrutiert. Diese Personen wurden aus dem Patientenpool der klinischen Abteilung für Zahnerhaltung, Parodontologie und Zahnersatzkunde herangezogen. Bei den rekrutierten Personen wurde zum Teil bereits eine Parodontistherapie durchgeführt. Die erwartete Teilnahmedauer jedes Prüfungsteilnehmers betrug ungefähr eine Stunde. Die Personen, welche an der Studie teilnahmen, wurden ausführlich über die zusätzliche klinische Diagnostik aufgeklärt. Die Gesamtdauer der klinischen Prüfung betrug ungefähr einen Monat.

Einschlusskriterien

- Patientinnen und Patienten mit nachgewiesener Parodontitis
- Patientinnen und Patienten mit vollendetem 18. Lebensjahr

- Schriftliche Einwilligung der teilnehmenden Person nach erfolgter Aufklärung
- Keine antimikrobielle Behandlung in den letzten drei Monaten

Ausschlusskriterien

- Antimikrobielle Behandlung innerhalb der letzten drei Monate
- Patientinnen und Patienten mit nicht vollendetem 18. Lebensjahr
- Patientinnen und Patienten welche eine subgingivale antiseptische therapeutische Maßnahme unmittelbar vor Probenentnahme erhalten haben
- Patientinnen und Patienten, die eine Antibiotikaphylaxe vor dem Eingriff benötigen (z.B. Endokarditispatientinnen und Endokarditispatienten)

Es wurden keine Minderjährige oder nicht einwilligungsfähigen Personengruppen eingeschlossen.

Probeentnahme

Es wurden vier parodontologisch geschädigte Zähne (Taschentiefe > 6mm), wovon zwei aktive (bleeding on probing positiv) und zwei inaktive (bleeding on probing negativ) Zahntaschen vorweisen, untersucht. Vorzugsweise sollte pro Quadrant ein Zahn geprüft werden. BOP - Blutung auf Sondierung (bleeding on probing) wurde nach Ainamo und Bay (61) ermittelt. An vier Messstellen am Zahn wurde sondiert. Konnte eine Blutung ausgelöst werden, wurde das mit einem + (Ja) markiert, blieb eine Blutung aus, mit einem - (Nein).

Die Entnahme der subgingivalen Plaqueproben erfolgte mittels steriler Papierspitzen (ISO 35 RNA- Test und ISO 40 DNA- Test). Spülungen vor Probeabnahme (z.B. mit 10 ml 0,12%-igem Chlorhexidindigluconat) wurden zu diesem Zeitpunkt nicht durchgeführt. Die Plaqueentnahme erfolgte nach sorgfältiger Entfernung der supragingivalen Beläge, die Entnahmestellen wurden zudem mit Watterollen isoliert und vorsichtig luftgetrocknet. Anschließend wurden jeweils zwei Papierspitzen für 20s in die parodontale Tasche eingebracht. Danach wurden sie für den DNA- Test (micro-IDent® plus 11) in sterile Eppendorf-Röhrchen überführt, beschriftet mit einem Identifikationscode und bis zur mikrobiologisch/molekularbiologischen Untersuchung zwischengelagert. Die Plaqueproben des RNA- Tests wurden in Reaktionsröhrchen mit Glasperlen gegeben und mit einer Identifikationsnummer versehen. Die Auswertung des RNA- Tests erfolgte direkt vor Ort. Insgesamt konnten 240 Plaqueproben gewonnen werden.

Die Durchführungen der jeweiligen Tests erfolgte laut Herstellerangaben.

Die verwendeten Materialien und Geräte sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgelistet.

Die Weiterverarbeitung und Auswertung des DNA- Tests (micro- IDent® plus 11) erfolgte im Prüflabor (Institut für Krankenhaushygiene und Mikrobiologie, Stiftingtalstraße 14 8010 Graz).



Abbildung 5: Entnahme subgingivaler Plaque mit einer Papierspitze

3.1.1 Material

Die Materialien welche für den chairside- Test verwendet wurden gehören zum kommerziellen Testsystem PerioPOC®:

Tabelle 4: Verwendete Materialien des RNA- Tests und DNA- Tests

Material	Firma, Adresse
Watterollen	Henry Schein INC. Germany
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Germany
Paper Points R40	VDW GmbH, Munich, Germany
PerioPOC® Papierspitzen ISO 35	GENSPEED Biotech GmbH, Rainbach, Austria
PerioPOC® Solution A	GENSPEED Biotech GmbH, Rainbach, Austria
PerioPOC® Solution B	GENSPEED Biotech GmbH, Rainbach, Austria
PerioPOC® Solution C	GENSPEED Biotech GmbH, Rainbach, Austria
PerioPOC® Solution D	GENSPEED Biotech GmbH, Rainbach, Austria
PerioPOC® Testchip	GENSPEED Biotech GmbH, Rainbach, Austria
Mikro- Röhren, 1,5ml, Verschluss farblos	GENSPEED Biotech GmbH, Rainbach, Austria

Tabelle 5: Verwendete Laborgerät des RNA- Tests

Laborgerät	Firma, Adresse
Mini Heizblock: myBlock Mini Dry Bath	BenchmarkScientific, USA



Abbildung 6: Testkit PerioPOC® (62)

Studienablauf

Nach positivem Ethikvotum wurden aus dem Patientenpool der Medizinischen Universität Graz, Zahnmedizin und Mundgesundheits, klinische Abteilung für Zahnerhaltung, Parodontologie und Zahnersatz, passende Kandidaten (anhand Einschluss- und Ausschlusskriterien) ermittelt. 30 Personen wurden ausgewählt und um die Teilnahme gebeten. Alle teilnehmenden Personen wurden über Risiken und Nebenwirkungen, möglicher Nutzen, anonymisierte Datenverarbeitung und Informationen zur Studie (Informed Consent) aufgeklärt. Die Richtigkeit der Ein- und Ausschlusskriterien wurde zur Kontrolle der Patientenakte erhoben. Nach schriftlicher Einverständniserklärung erfolgte die Teilnahme an der Studie. Alle klinischen Parameter der initial erhobenen Befunde (PGU, Sondierungstiefen, BOP) wurden überprüft.

Pro Patientin und Patient wurden zwei Proben, nach supragingivaler Reinigung, aus den tiefsten Taschen mit Blutungstendenz und zwei Proben aus den tiefsten Taschen ohne Blutung entnommen. Nach Möglichkeit wurde pro Quadrant ein Zahn zur Probenentnahme ausgewählt. Die Entnahmestellen wurden vermerkt. Es wurden pro Tasche zwei sterile Papierspitzen mit Hilfe einer sterilen Pinzette für ca. 20 Sekunden in den Fundus der Tasche gehalten. Danach kam die Papierspitze in ein steriles Proberöhrchen. Sechs Tropfen der Flüssigkeit „Solution A“ wurden hinzugegeben. Nach gründlichem Durchschütteln wurde das Proberöhrchen für sechs Minuten bei 95°C in einen Mini- Heat-Block gegeben. Danach wird das Gemisch mit einer sterilen Pipette entnommen, und auf den PerioPOC®-Testchip appliziert. Nach den vorgeschriebenen Wartezeiten und weiteren Zugaben von den PerioPOC®- Flüssigkeiten, „Solution B“, „Solution C“ und „Solution D“ wurde das Testergebnis auf dem Testchip angezeigt.

Die Testergebnisse des RNA- chairside Test wurden am gleichen Tag der Testung in den Prüfbogen (Case Report Form, CRF) anonymisiert mittels Identifikationsnummer dokumentiert. Die Ergebnisse des DNA- Tests des Prüflabors wurden nach Erhalt hinzugefügt.

Daten welche auf dem Prüfbogen dokumentiert wurden:

Alter

Geschlecht

Raucherstatus

Parodontalstatus (überprüft und übernommen aus der initialen Befunderhebung)

Zähne und Testergebnis des RNA und DNA-Tests

Weiterverarbeitung der Proben des RNA- Tests

Anschließend an die Probenentnahme wurde sofort mit der Weiterverarbeitung begonnen. Es wurden sechs Tropfen der Lösung A des Test- Kits PerioPOC® ins Proberöhrchen appliziert. Alle Weiterverarbeitungsschritte des RNA- Tests wurden vor Ort bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Proberöhrchen wurde 30s gut durchgeschüttelt um die Bakterien von der Papierspitze in die Flüssigkeit zu lösen. Die Flüssigkeit A des PerioPOC® Tests ist dafür verantwortlich die Bakterien aufzulösen und die Nukleinsäure zu markieren und hybridisieren.

Anschließend wurde das Röhrchen in den Mini Heizblock gegeben. Es folgte eine Denaturierung der Probe bei 95°C für 6 Minuten.

Danach wurde mit der im Testkit enthaltenen Pipette Lysat Schaum- und Luftblasenfrei ins Inlet (Aufgabeöffnung) des PerioPOC®- Testchips pipettiert.



Abbildung 7: sechs Tropfen "Solution A" ins Probenröhrchen applizieren und anschließend in den Mini-Heizblock bei 95°C für 6 Minuten

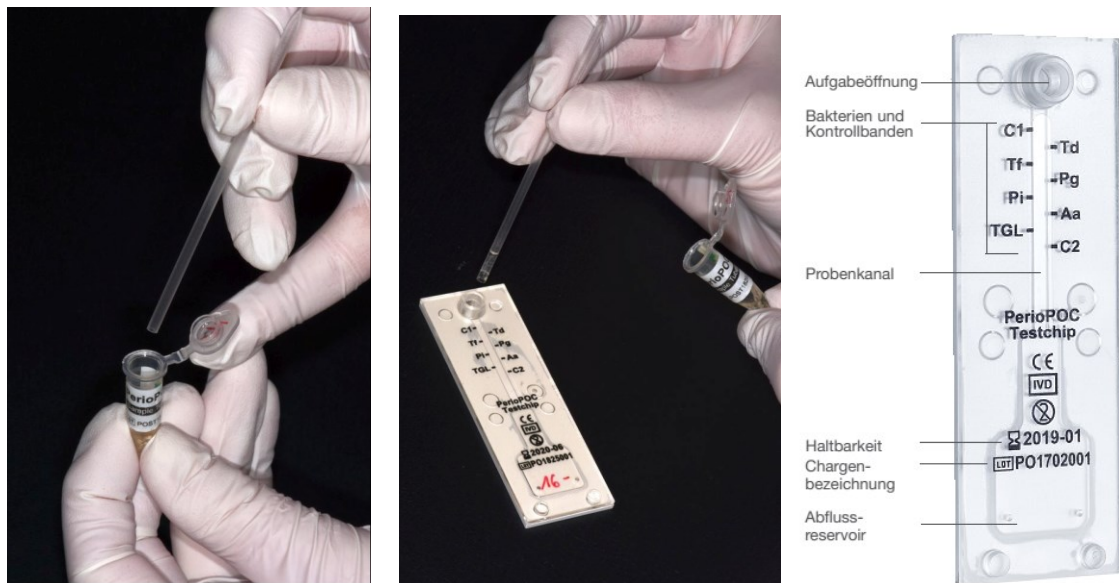


Abbildung 8: Auftropfen von Lysat in das Inlet des PerioPOC® Test-Chips (62)

Nach zwei Minuten Wartezeit wurde ein Tropfen der Lösung B in die Aufgabeöffnung appliziert. Diese rote Enzymlösung bindet an markierte Nukleinsäuren, welche wiederum an Fängermolekülen gebunden sind. Abermals wurde wieder zwei Minuten gewartet und ein Tropfen Lösung C hinzugefügt. Diese Substanz dient zur Waschung, also zur Entfernung der überschüssigen Bestandteile sowie unspezifisch gebundener Enzyme. Nach weiteren zwei Minuten Wartezeit wurde von der letzten Lösung, Lösung D, ein Tropfen eingetropf. Diese letzte Substanz ist für die Färbereaktion verantwortlich. Dieses Farbsubstrat reagiert mit dem Enzym der Lösung B und ist für die Farbmarkierungen der Banden verantwortlich. Alle Arbeitsschritte wurden sorgfältig und ohne gegenseitigen Kontakt der Tropfflaschen mit dem Inlet durchgeführt. Auf Prävention einer möglichen Kontamination wurde bei jeder Anwendung geachtet.



Abbildung 9: Einbringen von "Solution B -D" in das Inlet



Abbildung 10: Kurzanleitung PerioPOC®

Das Testergebnis kann nach vier Minuten vom Testchip abgelesen werden. Eine Blaufärbung ist als positiv zu werten. Abbildung 11 zeigt beispielhaft positive Ergebnisse. Jegliche Intensität der Blaustufe ist als positives Ergebnis zu werten. Welcher Keim detektiert wurde kann neben der Farbreaktion abgelesen werden. Es kommt nur dann zu einem Farbwechsel, wenn markierte Nukleinsäurefragmente an Fängermoleküle gebunden wurden. Um die Richtigkeit des ganzen Diagnostikvorganges zu überprüfen, sind zwei Kontrollbanden auf dem Chip aufgebracht. Nur wenn die Banden C1 und C2 eine Blaufärbung aufweisen, kann sichergestellt werden, dass der gesamte Prozess, Hybridisierung und Funktion des Enzyms, richtig durchgeführt worden ist. Weiters ist auf dem Testchip eine Bande mit TGL (total germ load) vorhanden. Dieser Bereich zeigt ebenfalls durch Umschlag in Blau an, dass eine ausreichende Anzahl an Probematerial vorhanden war und die Lyse funktioniert hat.

Weiterverarbeitung für den DNA- Nachweis:

Das Probematerial für den DNA- Test wurde an den gleichen Stellen, zum gleichen Zeitpunkt wie für den RNA- Test entnommen. Die Papierspitzen wurden nach Probenentnahme dicht verschlossen in ein Probenröhrchen gegeben, mit einer Identifikationsnummer beschriftet und Zwischengelagert. Der Transport zum Prüflabor

geschah unmittelbar in einem Styroporbehälter. Die Weiterverarbeitung und Durchführung des DNA- Tests wurde vom Prüflabor durchgeführt.

Die Ergebnisse des RNA- Tests lagen dem Prüflabor nicht vor.



Abbildung 11: Testergebnisse der PerioPOC®- Chips. Jede blaue Bande ist als positives Testergebnis zu werten.

Studienparameter

Zur Beantwortung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit wurden folgende Parameter erhoben:

Handling

Da die meisten kommerziellen Bakterientests auf eine Auswertung in einem Labor angewiesen sind, sollte beurteilt werden, wie die Durchführung eines chairside- Tests vonstattengeht. Es sollte untersucht werden, wieviel Zeit von der Probenentnahme bis zum Erhalt eines Ergebnisses benötigt wird und ob mögliche Schwierigkeiten in der Anwendung auftauchen.

RNA vs. DNA- Test

Der RNA- Test sollte bezüglich seiner nachgewiesenen Bakterien mit dem Standardtest (PCR) verglichen werden. Darüber hinaus wurde beurteilt ob es Unterschiede in der Detektion der beiden Testverfahren in Hinblick auf Zahntaschenaktivität gibt. Unterschied von aktiven (BOP positiv) und inaktiven Zahntaschen (BOP negativ).

Hintergrund dieser Überlegung ist die Tatsache, dass der chairside- Test RNA Bestandteile nachweist und in Folge dessen lebende Bakterien anzeigt. Die Vergleichsmethode mit dem PCR- Verfahren detektiert Erbmateriale, ohne Rücksicht darauf zu nehmen, ob es von lebenden oder toten Bakterien produziert wurde.

Datenmanagement und statistische Auswertung

Alle personenbezogenen Daten wurden mit einer Identifikationsnummer versehen. Die Archivierung der Daten war nur dem Studienleiter zugänglich und wurde in verschlossenen Kästen gelagert. Passwortgeschützte Laptops mit Excel Datenbank und schriftlichen Dokumentationen sind dem Zugriff unautorisierter Personen streng verschlossen. Die Dokumentation der erhobenen Daten erfolgte mittels Case Report Bögen. Jeder RNA- Testchip wurde innerhalb von 15 Minuten mit der Identifikationsnummer versehen. Die Ergebnisse der beiden Tests, wurden in Exceltabellen gegenübergestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch DI Irene Mischak.

Abteilung: EDV an der Universitätsklinik für Zahnmedizin und Mundgesundheit.

4 Ergebnisse – Resultate

Es wurde keine Einwilligungserklärung zurückgezogen. Es kam zu keinen unerwünschten Nebenwirkungen. Insgesamt konnten 240 (120 RNA-Proben und 120 DNA-Proben) Plaqueproben der 30 Patientinnen und Patienten entnommen werden. 236 Proben wurden in die Auswertung eingeschlossen. Zwei DNA- Proben wurden vom Labor nicht ausgewertet und die äquivalenten Ergebnisse der RNA- Tests wurden aus der Studie herausgenommen. Die Tabellen 6-10 zeigen den Vergleich der Ergebnisse der Plaqueproben mittels RNA und DNA- Test. Die Tabellen 11- 15 veranschaulichen den Unterschied der Nachweisbarkeit von Bakterien in Abhängigkeit von BOP der Zahntaschen.

Demografische Daten

Es wurden Proben von 13 weiblichen und 17 männlichen Personen entnommen.

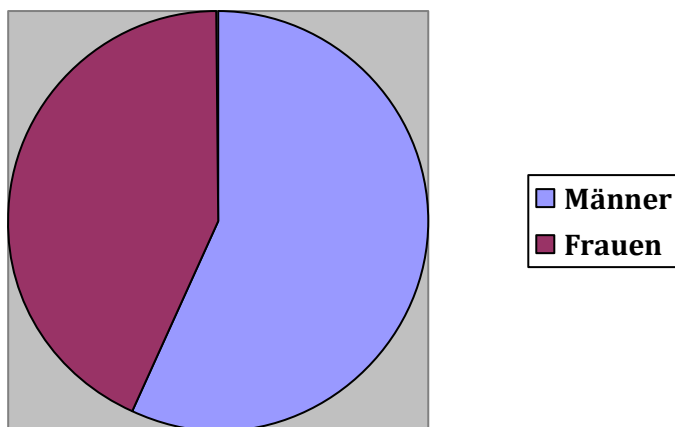


Abbildung 12: Geschlechtsverteilung der Probanden grafisch dargestellt

Übereinstimmung zwischen RNA und DNA-Test

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Die Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen RNA und DNA- Test für den Keim *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ist zwar prozentuell groß, aber aufgrund der wenigen positiven Nachweisen ist hier keine Aussage möglich.

Tabelle 6: Übereinstimmung RNA- und DNA- Test für Aa

Aa		DNA		
		ja	nein	
RNA	ja	1	2	3
	nein	18	96	114
		19	98	117

Übereinstimmungen: 82,9%

Exakter Test nach Fisher: $p = 0,415$

Porphyromonas gingivalis

Die Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen RNA und DNA- Test für den Keim *Porphyromonas gingivalis* ist hoch, aber bei dem DNA- Test sind deutlich mehr positive Resultate.

Tabelle 7: Übereinstimmung RNA- und DNA- Test für Pg

Pg		DNA		
		ja	nein	
RNA	ja	28	0	28
	nein	38	52	90
		66	52	118

Übereinstimmungen: 68,4%

Exakter Test nach Fisher: $p < 0,001$

Prevotella intermedia

Die Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen RNA und DNA- Test für den Keim *Prevotella intermedia* ist sehr hoch. Die Resultate zwischen RNA und DNA- Test sind etwa gleich verteilt.

Tabelle 8: Übereinstimmung RNA- und DNA- Test für Pi

Pi		DNA		
		ja	nein	
RNA	ja	16	11	27
	nein	13	78	91
		29	89	118

Übereinstimmungen: 80,3%

Exakter Test nach Fisher: $p < 0,001$

Treponema denticola

Die Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen RNA und DNA- Test für den Keim *Treponema denticola* ist hoch. Der DNA- Test hat aber deutlich mehr positive Resultate.

Tabelle 9: Übereinstimmung RNA- und DNA- Test für Td

Td		DNA		
		ja	nein	
RNA	ja	54	4	58
	nein	38	22	60
		92	26	118

Übereinstimmungen: 65,0%

Exakter Test nach Fisher: $p < 0,001$

Tannerella forsythia

Die Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen RNA und DNA- Test für den Keim *Tannerella forsythia* ist hoch. Der DNA- Test hat aber deutlich mehr positive Resultate.

Tabelle 10: Übereinstimmung RNA- und DNA- Test für Tf

Tf		DNA		
		ja	nein	
RNA	ja	54	6	60
	nein	38	20	58
		92	26	118

Übereinstimmungen: 63,2%

Exakter Test nach Fisher: $p = 0,001$

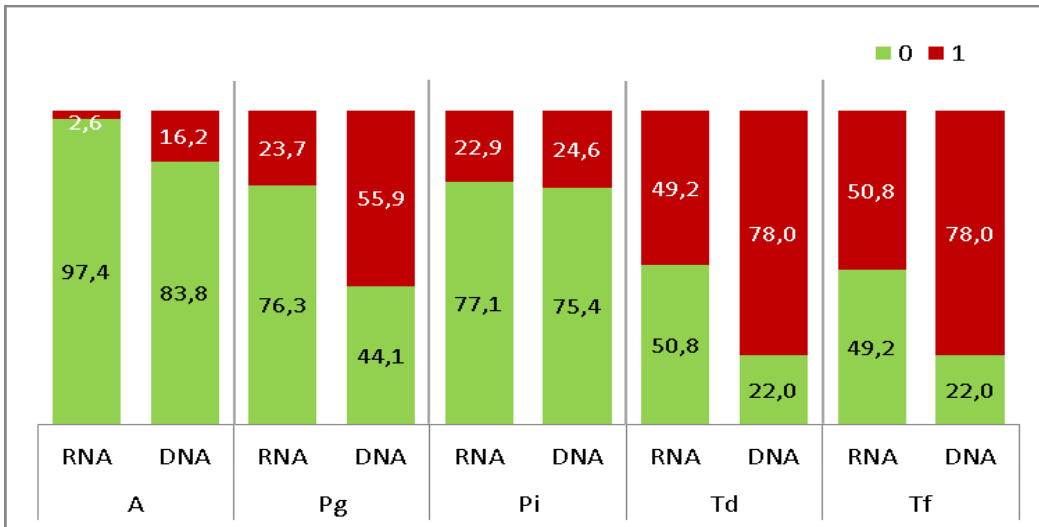


Abbildung 13: Prozentueller Vergleich der Ergebnisse des RNA und DNA- Tests. 0 (grün): keine Bakterien nachgewiesen, 1 (rot): Bakterien nachgewiesen. A: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Pg: *Porphyromonas gingivalis*, Pi: *Prevotella intermedia*, Td: *Treponema denticola*, Tf: *Tannerella forsythia*

Unterschied der Nachweisbarkeit von Bakterien in Abhängigkeit von BOP der Zahntaschen

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Tabelle 11: Nachweis von Aa in Abhängigkeit BOP der Zahntaschen

Aa		RNA				DNA			
		ja		nein		ja		nein	
Blutung	ja (+)	3	4,3%	67	95,7%	12	17,6%	56	82,4%
	nein (-)	0	0,0%	50	100,0%	7	14,3%	42	85,7%

Exakter Test nach Fisher: RNA, $p = 0,195$

DNA, $p = 0,412$

Aufgrund der wenigen positiven Ergebnissen bei den Tests, zeigt sich kein Zusammenhang.

Porphyromonas gingivalis

Tabelle 12: Nachweis von Pg in Abhängigkeit BOP der Zahntaschen

Pg		RNA				DNA			
		ja		nein		ja		nein	
Blutung	ja (+)	24	34,3%	46	65,7%	40	58,8%	28	41,2%
	nein (-)	6	12,0%	44	88,0%	26	52,0%	24	48,0%

Exakter Test nach Fisher: RNA, $p = 0,004$

DNA, $p = 0,291$

Ist ein BOP der Zahntaschen vorhanden, zeigt der RNA- Test mehr positive Ergebnisse für *Porphyromonas gingivalis*.

Prevotella intermedia

Tabelle 13: Nachweis von Pi in Abhängigkeit BOP der Zahntaschen

Pi		RNA				DNA			
		ja		nein		ja		nein	
Blutung	ja (+)	21	30,0%	49	70,0%	18	26,5%	50	73,5%
	nein (-)	7	14,0%	43	86,0%	11	22,0%	39	78,0%

Exakter Test nach Fisher: RNA, $p = 0,032$

DNA, $p = 0,369$

Ist ein BOP der Zahntaschen vorhanden, zeigt der RNA- Test mehr positive Ergebnisse für *Prevotella intermedia*.

Treponema denticola

Tabelle 14: Nachweis von Td in Abhängigkeit BOP der Zahntaschen

Td		RNA				DNA			
		ja		nein		ja		nein	
Blutung	ja (+)	43	61,4%	27	38,6%	60	88,2%	8	11,8%
	nein (-)	16	32,0%	34	68,0%	32	64,0%	18	36,0%

Exakter Test nach Fisher: RNA, $p = 0,001$

DNA, $p = 0,002$

Ist ein BOP der Zahntaschen vorhanden, zeigen beide Tests mehr positive Ergebnisse für *Treponema denticola*.

Tannerella forsythia

Tabelle 15: Nachweis von Tf in Abhängigkeit BOP der Zahntaschen

Tf		RNA				DNA			
		ja		nein		ja		nein	
Blutung	ja (+)	44	62,9%	26	37,1%	59	86,8%	9	13,2%
	nein (-)	18	36,0%	32	64,0%	33	66,0%	17	34,0%

Exakter Test nach Fisher: RNA, p = 0,003

DNA, p = 0,007

Ist ein BOP der Zahntaschen vorhanden, zeigen beide Tests mehr positive Ergebnisse für Tannerella forsythia.

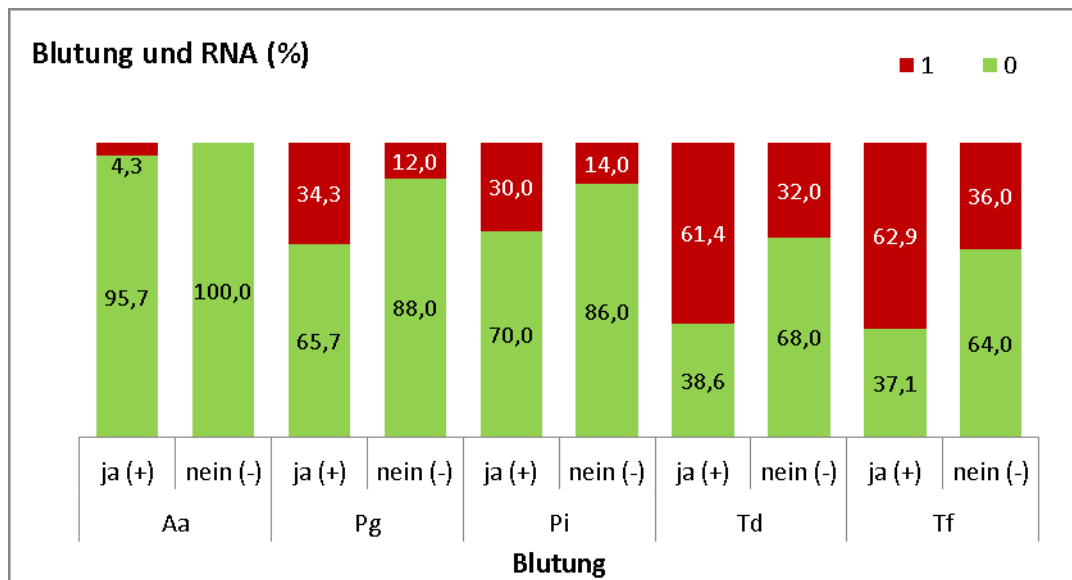


Abbildung 14: Prozentueller Vergleich der Ergebnisse des RNA- Tests in Abhängigkeit BOP der Zahntaschen. 0 (grün): kein Erregernachweis, 1 (rot): Erregernachweis. Aa: Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Pg: Porphyromonas gingivalis, Pi: Prevotella intermedia, Td: Treponema denticola, Tf: Tannerella forsythia

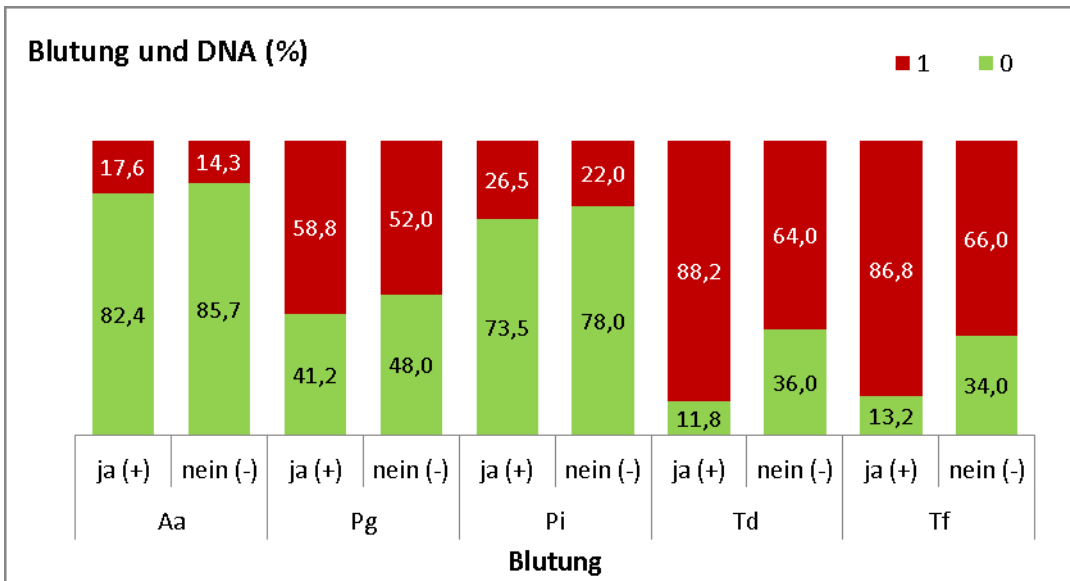


Abbildung 15: Prozentueller Vergleich der Ergebnisse des DNA- Tests in Abhängigkeit BOP der Zahntaschen. 0 (grün): kein Erregernachweis, 1 (rot): Erregernachweis. Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Pg: *Porphyromonas gingivalis*, Pi: *Prevotella intermedia*, Td: *Treponema denticola*, Tf: *Tannerella forsythia*

5 Diskussion

Wann soll ein Bakterientest durchgeführt werden, und warum überhaupt?

Die Frage wann und ob eine mikrobiologische Diagnostik durchgeführt werden soll wird sehr kontroversiell diskutiert (63). Zum Abschluss des sub- und supragingivalen Debridements (Initialtherapie) und bei nicht erreichten parodontaler Behandlungsziele kann im Rahmen der erweiterten Therapiemöglichkeiten eine zielgerichtet adjuvante Antibiotikatherapie begonnen werden. Die Kolonisation mit parodontopathogenen Bakterien variiert bei Patientinnen und Patienten mit Parodontitis. Der mikrobiologische Nachweis hat den großen Vorteil eine vorliegende Infektion adäquat zu therapieren. Es muss festgehalten werden, dass ein Bakteriennachweis nur dann sinnvoll ist, wenn sich daraus ein Mehrertrag an brauchbaren Informationen ergibt. Bei richtiger Indikationsstellung gestattet eine Testung die Auswahl einer keimspezifischen adjuvanten systemischen Antibiotikatherapie. Indiziert ist eine systemische Antibiose bei Erkrankungen die rein mechanisch unzulänglich therapiert werden. In bestimmten Fällen, beispielsweise bei Vorhandensein aggressiver Parodontalkeimen, wie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis*, ist eine zusätzliche medikamentöse Therapie oft erfolgsversprechend.

Die Deutsche Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und die Deutsche Gesellschaft für Zahn – und Kieferheilkunde (DGZMK) haben zur mikrobiologischen Diagnostik in der Parodontitistherapie eine S3- Leitlinie veröffentlicht (49). Folgende Diagnosestellungen haben eine Indikation zur systemischen Antibiotikagabe im Rahmen der subgingivalen Instrumentierung (alte Klassifikation) (63):

- Aggressive Parodontitis (Lebensalter ≤ 35 Jahre)
- Patientinnen und Patienten mit chronische Parodontitis, jünger als 56 Jahr und 35% aller erfassten Messstellen eine Taschensondierungstiefe ≥ 5 mm aufweisen

Die Tatsache, dass eine Parodontitistherapie klinisch erfolgreich ist, obwohl Bakterien in den unterschiedlichen intraoralen Habitaten nicht eradiziert, sondern nur reduziert (6,7) werden, lässt die Frage offen, ob die Mikroorganismen doch erfolgreich eliminiert wurden aber noch DNA- Bestandteile nachweisbar sind.

In einer Arbeit von Socransky et al. (64) wurde die Veränderung der Zusammensetzung des subgingivalen Biofilms zwei Jahre nach Therapie untersucht. Sie kamen zu dem

Ergebnis, dass eine Parodontaltherapie zu einer raschen Abnahme parodontaler Erreger führen kann und eine vollständige Eradikation nicht notwendig sei.

Differenzierung von lebenden und toten Bakterien

Den Lebensfähigkeitsstatus von Organismen zu bewerten ist essenziell, um die Frage zu beantworten, ob Krankheitserreger aktiv vorhanden sind, oder es sich nur um genetische Rückstände handelt. Klassische Methoden zur Bestimmung sind zeitaufwendig. Daher wurden molekulare Methoden entwickelt, um dieses Problem zu lösen. Molekulare Methoden bieten den Vorteil von hoher Geschwindigkeit, Sensitivität und Spezifität. Sowohl DNA als auch RNA wurden unter Verwendung molekularer Amplifikationsverfahren wie Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) und Nukleinsäuresequenz-basierte Amplifikation (NASBA) analysiert. Aufgrund der variablen Persistenz von Nukleinsäuren in Zellen nach dem Tod ist die Korrelation zwischen dem Vorhandensein von DNA und RNA und der Lebensfähigkeit jedoch nicht immer eindeutig feststellbar. In ähnlicher Weise kann die Wahl der molekularbiologischen Zielstruktur und die Empfindlichkeit des Verfahrens die Gültigkeit des Lebensfähigkeitstests signifikant beeinflussen (65).

Zur Differenzierung von lebenden und toten Bakterien können verschiedene Kriterien in Betracht gezogen werden. Die einfachste Methode ist die kulturelle Anzucht auf Nährmedien. Man kann metabolische Vorgänge untersuchen, den Nachweis von RNA oder die Membranintegrität als Unterscheidungskriterium von lebend und tot heranziehen.

Lange Zeit galt die Bakterienkultur als Goldstandard der Erregerdiagnostik. Abgesehen davon, dass nicht alle Bakterien gezüchtet werden können, bringt das Verfahren noch weitere Nachteile mit sich. Bakterien welche ums Überleben kämpfen, können in einen „Überlebensmodus“ schalten (viable but non-culturable VBNC). Das passiert beispielsweise dann, wenn sich Umweltbedingungen, pH- Wert, Temperatur oder Nährstoffangebot zu ihrem Nachteil entwickeln. Wie der Name schon verrät, besitzen die Keime eine Stoffwechselaktivität, lassen sich aber nicht auf Nährmedien züchten. Dies kann zu falsch negativen Ergebnissen führen (65).

Mithilfe von molekularbiologischen Methoden kann die Intaktheit der bakteriellen Membran sowie der Nachweis von RNA zur Identifizierung von lebenden Bakterien herangezogen werden. Ribonukleinsäuren werden nach dem Tod nicht mehr synthetisiert und im Gegensatz zu DNA schneller abgebaut. Besonders gut eignet sich mRNA, da nur sie von metabolisch aktiven Zellen gebildet wird.

Wie lange ist bakterielle RNA nachweisbar?

Die Antwort auf die Frage wie lange bakterielle RNA im menschlichen Körper nachweisbar ist, ist nicht so einfach zu beantworten. Wichtig dafür ist das Verständnis der Mechanismen des RNA- Abbaus. Im Allgemeinen sind diese Moleküle recht fragil und werden durch zahlreiche Einflüsse abgebaut. Zusätzlich führen sogar bakterielle Toxine (beispielsweise RelE, MazF und Kid) zum Untergang von mRNA. Zurzeit sind bei *Escherichia coli* wenigstens 15 RNasen bekannt (66). Die genauen mikrobiologischen Interaktionen sind aber nur wenig erforscht.

Polonyi et al. (67) versuchten genau dieser Frage auf den Grund zu gehen. Sie verglichen die Detektion parodontopathogener Keime nach Antibiotikatherapie in vitro mit einer real- time PCR (qPCR), propidium monoazide-qPCR und einer reverse transkription qPCR (RT- PCR). Dazu wurden Plaqueproben zu unterschiedlichen Therapiezeiten untersucht. Sie kamen zu dem Schluss, dass der bakterielle DNA-Nachweis mittels qPCR relativ konstant im Laufe der Therapie verlief. Hingegen die anderen beiden Methoden weniger bakterielle Genbestandteile im Laufe der Zeit nachwiesen. Das deutet darauf hin, dass RNA- basierte Nachweismethoden besser zum Nachweis von erfolgreich eradizierten parodontopathogenen Bakterien geeignet sind (67).

Das Potenzial von RNA als genetische Informationsquelle zum Nachweis von Bakterien ist im Bereich der Parodontologie relativ unerforscht.

Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass in häufigen Situationen RNA schneller abgebaut wird als DNA. RNA kann uns jedoch helfen wertvolle Informationen, die im Genom nicht direkt sichtbar sind zu liefern. Anders als das Erbgut erhält man durch RNA-Moleküle Informationen über Genregulation und Proteinsynthese (68). Aktiv exprimierte Gene variieren mit den äußeren Bedingungen. Auch zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Bakterien ist der Nachweis von RNA ein mögliches Nachweisverfahren. Ribonukleinsäure wird nur von lebenden Bakterien produziert und differenziert sich in seiner Halbwertszeit von DNA. Aber warum geht dieses Molekül schneller zu Grunde als die Bausteine des Genoms? Um die Frage zu beantworten ist ein Verständnis der Mechanismen von RNA Instabilität und Zerfall notwendig.

RNA-Struktur und Abbau-Mechanismen

Die Halbwertszeit von Nukleinsäure wird durch mehrere endogene (beispielsweise Struktur, Art der Basen, Zucker und Phosphatresten) und exogene Faktoren (beispielsweise pH- Wert, Anwesenheit von Metallkationen, ultravioletten Licht, Anwesenheit von Sauerstoff und Wasser) beeinflusst (69,70). Darüber hinaus sind Faktoren, die die Geschwindigkeit des RNA-Abbaus beeinflussen, einzigartig in den verschiedenen Szenarien einer Zelle und stark abhängig von der enzymatischen Aktivität von zellulären RNasen. Ein weiterer Grund warum RNA schneller zugrunde geht als DNA ist die chemische Struktur. Im Gegensatz zu DNA besitzen RNA Moleküle eine Hydroxylgruppe (2'-OH) an der 2' Position des Zuckers. Vor allem diese Gruppe trägt die Schuld an der Instabilität, da die benachbarte Phosphodiesterbindung von der Hydroxylgruppe an der 2' Position des Zuckers chemisch angreifen kann und die Kette spaltet. Darauf Bezug nehmend hat Lindahl (70) argumentiert, dass die Phosphodiesterbindungen in einer DNA-Kette 200-mal stabiler sind als in einer RNA-Kette bei neutralem pH-Wert in Gegenwart von physiologischen Konzentrationen von Mg^{2+} . Weitere Bedingungen machen RNA anfälliger für hydrolytischen Schaden als DNA. Beispielsweise ist die Anfälligkeit von RNA gegenüber Hydrolyse in Gegenwart von Kationen wie Ca^{2+} und Übergangsmetallen erhöht (71). Zusätzlich erhöhen Alkalibedingungen, einschließlich der Mengen, die natürlicherweise in den Zellen vorkommen, die Anfälligkeit von RNA zur Hydrolyse (72).

RNA ist nicht gleich RNA

Ein weiteres relevantes Merkmal ist, dass RNA leicht sekundär und tertiär Strukturen bildet, und diese können einen ausgeprägten Einfluss auf die Geschwindigkeit und Spezifität der Hydrolyse der RNA nehmen (Phosphodiester-Bindung). Insbesondere ribosomale RNA (rRNA) ist stabiler als messenger RNA (mRNA), höchstwahrscheinlich aufgrund der Fähigkeit, dass rRNA teilweise als Doppelstrang vorliegt und Sekundärstrukturen formieren kann. Der Unterschied in den RNA-Abbauraten dieser beiden RNA-Spezies bildet die Grundlage für die Bestimmung der postmortalen Zeitspanne (Forensisches Potenzial von RNA) (73).

Entnahme des Probematerials

Bei der vorliegenden Arbeit wurden die Plaqueproben zur Beurteilung von bakteriellen Strukturen mittels Papierspitzen (ISO 35) entnommen. Diese wurden mittels steriler Pinzette in den Taschenfundus geführt und für 20 Sekunden dort belassen. Hartroth et al.

(74) untersuchten unterschiedliche Papierspitzen. Sie verglichen verschiedene Hersteller (Art der Papierspitze), Größe und Zeit der Probenentnahme. Sie kamen zu dem Entschluss, dass Papierspitzen der Größe ISO 45 am effizientesten waren. Die optimale Prüfzeit beträgt 60 Sekunden, jedoch reduzieren kürzere Zeiten zwischen 10 und 30 Sekunden nicht signifikant die Effizienz der Probenentnahme.

Renvert et al. (50) verglichen das Vorhandensein parodontopathogener Bakterien in Abhängigkeit der Entnahmetechnik subgingivaler Plaqueproben. Die Technik der subgingivalen Probenahme kann mutmaßlich die Identifizierung und Anzahl der gemeldeten Mikroorganismen beeinflussen. In dieser Studie wurden Papierspitzen und Plaqueproben mittels Scalern miteinander verglichen. Papierspitzen konnten signifikant höhere Anzahlen von Koloniebildern und Spirochäten detektieren (50).

Um valide Daten zu ermitteln muss auf jeden Fall darauf geachtet werden, dass während der Probenentnahme kein übermäßiges Bluten der Zahnfleischtasche vorliegt. Darüber hinaus muss eine absolute Trockenheit der Entnahmestelle eingehalten werden. Handelsübliche Papierspitzen nehmen nur etwa 20 uL Flüssigkeit auf (75). Auch deshalb sollte die Entnahme der Plaqueprobe nach der Initialtherapie erfolgen.

Nachgewiesene Keime

Die geringste Prävalenz wies das Bakterium *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in der untersuchten Probandengruppe auf. Am häufigsten wurden die Keime *Treponema denticola* und *Tannerella forsythia* nachgewiesen. Danach *Porphyromonas gingivalis*. Die niedrige Prävalenz von Ag ist nicht überraschend. So zeigt sich auch in anderen Studien, dass dieser Keim eher selten im Vergleich mit anderen parodontopathogenen Bakterien detektiert wird (10,17,38). Die Verteilung der Häufigkeit der Bakterien des roten Komplexes kann mit der Verteilung von Byrne et al. (18) in Verbindung gebracht werden. So konnte *Porphyromonas gingivalis* meist nur in Verbindung mit *Treponema denticola* und *Tannerella forsythia* nachgewiesen werden.

Häufig werden Parodontitiserreger mit molekularbiologischen Nachweisverfahren angezeigt. Diese basieren meist auf DNA-Strukturen und die PCR spielen eine zentrale Rolle in modernen Analyseverfahren.

In der vorliegenden Arbeit werden die Testergebnisse eines RNA (PerioPOC®) und eines DNA (micro-IDent® plus11) basierten Bakterientests gegenübergestellt.

Vergleicht man die Ergebnisse des RNA und DNA-Tests miteinander kommt man bezogen auf die einzelnen Bakterien zu folgenden Ergebnissen: Aa: 82,9%, Pg: 68,4 %, Pi:

80,3%, Td: 65% und Tf: 63,2%. Die Ergebnisse von Aa sind aber aufgrund des geringen Nachweises nicht aussagekräftig. Die Übereinstimmung kann bei Pg, Td und Tf als hoch, und bei Pi als sehr hoch bezeichnet werden.

Betrachtet man die Blutungsaktivität der Zahntaschen (BOP) in Hinblick auf die nachgewiesenen Bakterien des RNA und DNA- Tests wurden folgende Resultate erzielt: Für das Bakterium Aa konnte aufgrund der geringen positiven Ergebnisse kein Zusammenhang festgestellt werden. Bei Pg und Pi zeigt der RNA- Test mehr positive Ergebnisse beim Vorliegen einer BOP positiven Tasche. Bei Td und Tf zeigt der RNA und der DNA Test mehr positive Ergebnisse beim Vorliegen einer BOP positiven Tasche.

Studienteilnehmer

Die Teilnehmer dieser Studie wurden aus dem Patientenpool der Universitätsklinik für Zahnmedizin und Mundgesundheits rekrutiert. Einschlusskriterien waren unter anderem das Vorhandensein einer Parodontitis, welche vergesellschaftet sein muss mit Taschentiefen von mindestens 6 mm bei vier Zähnen. Zwei dieser Zähne mussten eine Blutung auf Sondierung (BOP) aufweisen. Weiters durften die Patientinnen und Patienten unmittelbar vor der Behandlung keine antibakterielle Mundspülung verwenden. Außerdem musste eine Einnahme von Antibiotika drei Monate zurückliegen um teilnehmen zu dürfen. Bezugnehmend auf das Alter war lediglich die Volljährigkeit ein Einschlusskriterium.

5.1 Ausblick

In einer Übersichtsarbeit von Greenstein und Lamster (76) wurde die Übertragung von Bakterien im Zusammenhang mit Parodontalerkrankungen innerhalb und außerhalb der Familie behandelt. Sie fanden heraus, dass der Nachweis von Mikroorganismen zwischen Eltern und Kindern besonders stark ist. Molekularbiologische Tests haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass, wenn ein Kind von einer potenziell pathogenen Spezies besiedelt wird, einer der Eltern normalerweise genotypisch identische Bakterien beherbergt. Die Daten weisen auch darauf hin, dass die Übertragung von Erregern zwischen Ehepartnern stattfindet, dies scheint jedoch selten der Fall zu sein. Hauptvektor für den Transfer scheint Speichel zu sein. Die Übertragung von Organismen führt jedoch nicht notwendigerweise zur Besiedlung oder Infektion des Wirts. Darüber hinaus zeigen Personen, die mutmaßliche Pathogene beherbergen, häufig keine Anzeichen einer Zahnfleischerkrankung. Dies wird auf mehrere Faktoren, wie etwa die Abwehr des Wirts, den bakteriellen Antagonismus und möglicherweise fehlende Pathogenität zurückgeführt. Sie kamen zu dem Schluss, dass Parodontitiserreger übertragbar sind, aber daraus nicht zwangsläufig ein Krankheitsgeschehen resultiert (76).

Aufgrund dieser Tatsache müssen Maßnahmen getroffen werden die Verbreitung dieser Keime zu minimieren. Familienangehörige von Parodontitispatientinnen und Parodontitispatienten sollten zumindest informiert werden, dass eine Übertragung parodontopathogener Keime vonstattengehen könnte, und ein erhöhtes Erkrankungsrisiko gegeben ist. Besondere Screeningmaßnahmen wären durchaus denkbar und könnten zur Prävention beitragen. Einfache Untersuchungsmethoden wie zum Beispiel ein chairside-Test ermöglichen dieses Vorhaben.

Eine adjuvante Antibiotikatherapie kann bei richtiger Indikationsstellung den therapeutischen Erfolg verbessern. Mit einem einfachen praxisnahen Schnelltest können die wichtigsten Erreger nachgewiesen werden.

Natürlich muss auf die individuellen Bedürfnisse und Begleiterkrankungen der betroffenen Personen eingegangen werden. Langzeitmedikationen aufgrund von Asthma, Erkrankungen von Herz und Gefäßen und Diabetes mellitus bringen die Gefahr von medikamentösen Wechselwirkungen mit sich (77).

Nachfolgend ist das Behandlungskonzept der Grazer Dentalhygieneschule, mit der Wahl des Antibiotikums sowie Dosis und Dauer der Therapie angeführt. Die Wahl des Präparats richtet sich nach den nachgewiesenen Mikroorganismen. (Haas, www.dentalhygieneschule.com)

Antibiotika - Indikation		
Mikrobielle Komplex(e)	Wirkstoff (Präparat)	Dosierung
Aa oder Rot oder Orange	Amoxicillin (z.B.: Amoxicillin Sandoz 500 mg Filmtabletten®)	3x1, 7 Tage
Rot oder Orange / Pm ++	Clindamycin (z.B.: Dalacin C 300 mg Kapseln®)	4x1, 7 Tage
Gelb (orange-assoziiert)	Clarithromycin 250 mg (z.B.: Klacid Uno Filmtabletten®)	2x1, 7 Tage
Grün	Amoxicillin (z.B.: Amoxicillin Sandoz 500 mg Filmtabletten®)	3x1, 7 Tage
Aa + Grün	Amoxicillin (z.B.: Amoxicillin Sandoz 500 mg Filmtabletten®)	3x1, 7 Tage
2 oder 3 Komplexe aus Aa / Grün + Rot / Orange	Amoxicillin+Clavulansäure und Metronidazol (Winkelhoff mod.) (z.B.: Augmentin 500 mg/125 mg FT® und Anaerobex 500 mg FT®)	3x1, 7 Tage
2 oder 3 Komplexe aus Aa / Grün + Rot / Orange bei Pm ++	Amoxicillin+Clavulansäure und Clindamycin (z.B.: Augmentin 500 mg/125 mg Filmtabletten® und Dalacin C 300 mg Kapseln®)	siehe oben

Aa (+) Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Pg + Porphyromonas gingivalis

Tf + Tannerella forsythensis

Td + Treponema denticola

Pi + Prevotella intermedia

Pm ++ Parvimonas micra (Peptostreptococcus micros)

Fn +++ Fusobacterium nucleatum / periodonticum

Cr ++ Campylobacter rectus

En ++ Eubacterium nodatum

Ec +++ Eikenella corrodens

Cs +++ Capnocytophaga species (gingivalis, ochracea, sputigena)

Genco 1981, Slots 1990, Flemmig 1998, Herrera 2002, AAP 2004, Guerrero 2005, Haffajee 2008, Van Winkelhoff 2009, Mombelli 2009, Astasov-Frauenhoffer 2014, Belibasakis 2014, Rams 2014.

M. Haas Graz

Tabelle 16: Antibiotisches Behandlungskonzept der Grazer Dentalhygieneschule Teil I

Antibiotika - Indikation		
Alternativen/Allergie	Wirkstoff (Präparat)	Dosierung
Penicillin	1. Wahl: Ciprofloxacin (z.B.: Ciproxin 250 mg Filmtabletten®)	2x1, 7 Tage
	2. Wahl: Tetrazyklin (z.B.: Doxycyclin "Genericon" 100 mg Tabletten®)	2x100 mg/d (1), 1x100 mg/d (2-19)
Metronidazol	1. Wahl: Clindamycin (z.B.: Dalacin C 300 mg Kapseln®)	4x1, 7 Tage
Begleitend zur FMD	Azithromycin (z.B.: Zithromax 500 mg Filmtabletten®)	1x1, 3 Tage
	Amoxicillin+Clavulansäure und Metronidazol (Winkelhoff mod.) (z.B.: Augmentin 500 mg/125 mg FT® und Anaerobex 500 mg FT®)	3x1, 7 Tage

Diverses	Wirkstoff (Präparat)	Dosierung
Kollagenasehemmer	Tetrazyklin - Doxycyclin 20 mg (Periostat®)	2x1, 3 Monate
Probiotika	Lactobacillus reuteri (Prodentis® / Periobalance®)	2x1, 12 Wochen
Darmflora	Enterococcus faecium - Lebendkeime (Bioflorin® Kapseln)	3x1, 7 Tage
	Lactobacillus acidophilus (Acidophilus® Tabletten)	2x2, 2-3 Wochen
	Trockenhefe aus Saccharomyces boulardii (Yomogi®)	1-2x2, 5 Tage

M. Haas Graz

Tabelle 17: Antibiotisches Behandlungskonzept der Grazer Dentalhygieneschule Teil II

6 Conclusio

Eine chairside Testung der wichtigsten parodontopathogenen Bakterien bringt mehrere Vorteile mit sich. Das Testergebnis ist in wenigen Minuten vorhanden. Man benötigt keine aufwendigen Laborgeräte oder sonstige Utensilien. Die Patientinnen und Patienten erfahren ihren Befund noch in derselben Sitzung. Adjuvante Antibiotikatherapien können direkt im Anschluss an das Testergebnis zielgerecht begonnen werden. Unnötige Proben-Lagerung, Verpackung oder Versand sind nicht notwendig.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine gute Übereinstimmung der beiden Bakterientests. Es werden mehr parodontopathogene Bakterien in BOP positiven als in BOP negativen Taschen nachgewiesen.

Derzeit gibt es aufgrund fehlender Evidenz international wenige Vergleiche von RNA-basierten parodontologischen Bakterientests. Ein möglicher Vorteil in der Ermittlung von RNA- Sequenzen ist, lebende von toten Bakterien zu unterscheiden. DNA- Bestandteile verbleiben längere Zeit auch dann, wenn die Bakterien per se nicht mehr existieren.

Ein möglicher Wissenszuwachs, der durch die Ergebnisse dieser Studie entstehen könnte, besteht darin, dass die Keimbesiedelung im menschlichen Zahnsulcus zwischen lebenden und toten Bakterien differenziert werden kann, und in weiterer Folge eine mögliche Verbesserung der Indikationsstellung von adjuvanten systemischen Antibiotikatherapien.

Die Ermittlung der bakteriellen Keimbesiedelung der Zahntaschen mittels sterilen Papierspitzen birgt kein Risiko der Verschlechterung der parodontalen Erkrankung.

Eine frühe Detektion ermöglicht schnelle gezielte Maßnahmen, um bestimmte Bakterien gezielt zu therapieren. Folgeerkrankungen sowie Zahnverluste könnten damit verhindert werden.

Die überwiegende Mehrzahl von Erkrankungen des Zahnhalteapparats sind Gingivitiden sowie leichte und mittelschwere Parodontitiden. Bei diesen Krankheitsbildern ist eine konventionelle Parodontitistherapie (supra- und subgingivales Debridement eventuell kombiniert mit einer chirurgischen Taschenelimination) die Therapie der Wahl. Eine zusätzliche Antibiotikatherapie und eine damit vergesellschaftete mikrobiologische Diagnostik sind nach heutigem Erkenntnisstand nur bei Patientinnen und Patienten mit chronische Parodontitis, jünger als 56 Jahr und 35% aller erfassten Messstellen eine Taschensondierungstiefe $\geq 5\text{mm}$ aufweisen indiziert (63).

Als Nachteil von bakteriellen Nachweisverfahren müssen der zeitliche und finanzielle Mehraufwand angeführt werden. Es muss jedoch betont werden, dass bei modernen chairside Bakterientests sich die zeitliche Mehrbelastung in Grenzen hält.

Bei akuten Parodontalerkrankungen, beispielsweise dem Parodontalabszess, einer nekrotisierenden ulzerösen Gingivitis (NUG, alte Klassifikation) oder einer Parodontitis (NUP, alte Klassifikation) besteht akuter Therapiebedarf. Diese Krankheitsprozesse sind oftmals mit systemischen Reaktionen wie Fieber oder der Gefahr der Ausbreitung vergesellschaftet. Eine mikrobiologische Erregerdiagnostik ist mit den herkömmlichen Testsystemen zu zeitaufwendig und nur selten indiziert (49).

Ein chairside- Test bringt auch hier den Vorteil, dass das Testergebnis in wenigen Minuten zu Verfügung steht und die Therapie bakterienorientiert begonnen werden kann.

Im Allgemeinen ist für die adjuvante Antibiotikatherapie im Rahmen der Parodontitistherapie die Detektion der parodontitisassoziierten Keime (Tabelle 2) ausreichend. Erst nach nicht erfolgreicher Antibiotikatherapie ist die Bestimmung und antibiotische Residenzbestimmung von superinfizierenden Keimen, beispielsweise *Enterobacter* sp, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Staphylococcus* sp, *Pseudomonas* sp, sinnvoll (49).

7 Literaturverzeichnis

1. Wolf HF, Rateitschak-Plüss EM, Rateitschak K-H, Schroeder HE, Wolf HF. Parodontologie. Kart. Sonderausg. der 3. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012. 532 S. (Farbatlant der Zahnmedizin).
2. How KY, Song KP, Chan KG. Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front Microbiol.* 2016;7:53.
3. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control: Global periodontal health. *Periodontol* 2000. Oktober 2012;60(1):15–39.
4. Bostanci N, Belibasakis GN. Porphyromonas gingivalis: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett.* August 2012;333(1):1–9.
5. AlJehani YA. Risk factors of periodontal disease: review of the literature. *Int J Dent.* 2014;2014:182513.
6. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu W-H, u. a. The Human Oral Microbiome. *J Bacteriol.* 1. Oktober 2010;192(19):5002–17.
7. Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, u. a. The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J.* November 2016;221(10):657–66.
8. Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* März 1998;62(1):71–109.
9. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, u. a. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* Juni 2001;183(12):3770–83.
10. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* Februar 1998;25(2):134–44.
11. Sylke Dombrowa. Parodontitis und Periimplantitis - ein Blick hinter die Kulissen. *Zwp Online* [Internet]. 02 2011 [zitiert 15. Januar 2019]; Verfügbar unter: <https://www.zwp-online.info/fachgebiete/parodontologie/mundschleimhauterkrankungen/parodontitis-und-periimplantitis-ein-blick-hi>
12. Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, u. a. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol.* Mai 1991;62(5):293–9.
13. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, u. a. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* Januar 1997;24(1):72–7.

14. Laine ML, Leonhardt A, Roos-Jansåker A-M, Peña AS, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, u. a. IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* August 2006;17(4):380–5.
15. McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J Periodontol.* Januar 1999;70(1):49–56.
16. Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 16. Juli 2014 [zitiert 24. Februar 2019];4. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00092/abstract>
17. van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol.* November 2002;29(11):1023–8.
18. Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol.* Dezember 2009;24(6):469–77.
19. Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, u. a. Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. *J Periodontol.* April 2008;79(4):670–6.
20. Colombo APV, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, u. a. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol.* September 2009;80(9):1421–32.
21. Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* Oktober 2006;21(5):269–82.
22. Zijng V, van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, u. a. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PloS One.* 24. Februar 2010;5(2):e9321.
23. Dashper SG, Seers CA, Tan KH, Reynolds EC. Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. *J Dent Res.* Juni 2011;90(6):691–703.
24. Whiley RA, Beighton D, Winstanley TG, Fraser HY, Hardie JM. *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* (the *Streptococcus milleri* group): association with different body sites and clinical infections. *J Clin Microbiol.* Januar 1992;30(1):243–4.
25. Do T, Jolley KA, Maiden MCJ, Gilbert SC, Clark D, Wade WG, u. a. Population structure of *Streptococcus oralis*. *Microbiology.* 1. August 2009;155(8):2593–602.

26. Krantz AM, Ratnaraj F, Velagapudi M, Krishnan M, Gujjula NR, Foral PA, u. a. Streptococcus Gordonii Empyema: A Case Report and Review of Empyema. Cureus. 12. April 2017;9(4):e1159.
27. Lamell CW, Griffen AL, McClellan DL, Leys EJ. Acquisition and colonization stability of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in children. J Clin Microbiol. März 2000;38(3):1196–9.
28. Das, MD M, Badley, MD AD, Cockerill, MD FR, Steckelberg, MD JM, Wilson, MD WR. INFECTIVE ENDOCARDITIS CAUSED BY HACEK MICROORGANISMS. Annu Rev Med. Februar 1997;48(1):25–33.
29. Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. How we got attached to Actinobacillus actinomycetemcomitans: a model for infectious diseases. Periodontol 2000. Oktober 2006;42(1):114–57.
30. Kachlany SC. Aggregatibacter actinomycetemcomitans Leukotoxin: from Threat to Therapy. J Dent Res. Juni 2010;89(6):561–70.
31. Nisengard RJ, Newman MG, Herausgeber. Oral microbiology and immunology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 1994. 477 S.
32. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. J Clin Pathol. Mai 2008;61(5):577–87.
33. Suzuki M, Benno Y, Umeda M, Ishikawa I, Sakamoto M. Reclassification of Bacteroides forsythus (Tanner et al. 1986) as Tannerella forsythensis corrig., gen. nov., comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 1. Mai 2002;52(3):841–9.
34. Tanner ACR, Listgarten MA, Ebersole JL, Strzempko MN. Bacteroides forsythus sp. nov., a Slow-Growing, Fusiform Bacteroides sp. from the Human Oral Cavity. Int J Syst Bacteriol. 1. April 1986;36(2):213–21.
35. Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol. Mai 1988;15(5):316–23.
36. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, u. a. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. J Periodontol. Januar 1995;66(1):23–9.
37. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, u. a. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. J Periodontol. März 1994;65(3):260–7.
38. Listgarten MA, Lai CH, Young V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. J Periodontol. März 1993;64(3):155–61.
39. Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. J Clin Periodontol. Februar 1998;25(2):85–98.

40. Tanner ACR, Izard J. *Tannerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontol* 2000. Oktober 2006;42(1):88–113.
41. Choi B-K, Lee HJ, Kang JH, Jeong GJ, Min CK, Yoo Y-J. Induction of osteoclastogenesis and matrix metalloproteinase expression by the lipooligosaccharide of *Treponema denticola*. *Infect Immun*. Januar 2003;71(1):226–33.
42. Ishiguro K, Washio J, Sasaki K, Takahashi N. Real-time monitoring of the metabolic activity of periodontopathic bacteria. *J Microbiol Methods*. August 2015;115:22–6.
43. Yamanaka T, Furukawa T, Matsumoto-Mashimo C, Yamane K, Sugimori C, Nambu T, u. a. Gene expression profile and pathogenicity of biofilm-forming *Prevotella intermedia* strain 17. *BMC Microbiol*. 16. Januar 2009;9:11.
44. Sylke Dombrowa. Teil 1: Parodontitis und Periimplantitis – rechtzeitig erkennen und erfolgreich therapieren. 14. Februar 2012;
45. Müller H-P. *Parodontologie: 36 Tabellen*. 2., aktualisierte und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2006. 256 S. (Checklisten der Zahnmedizin).
46. 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Papers*. Oak Brook, Illinois, October 30–November 2, 1999. *Ann Periodontol*. Dezember 1999;4(1):i, 1–112.
47. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, u. a. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. Juni 2018;45:S1–8.
48. Soren Jepsen. Neue Klassifikation vorgestellt. *Zm Online* [Internet]. 1. Juli 2018 [zitiert 15. Januar 2019];(13/20018). Verfügbar unter: <https://www.zm-online.de/archiv/2018/13/zahnmedizin/neue-klassifikation-vorgestellt/>
49. Beikler T, Flemming T, Karch H. Mikrobiologische Diagnostik in der Parodontitistherapie Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn – und Kieferkrankheiten (DGZMK). 2005;(12):660–2.
50. Renvert S, Wikström M, Helmersson M, Dahlén G, Claffey N. Comparative Study of Subgingival Microbiological Sampling Techniques. *J Periodontol*. Oktober 1992;63(10):797–801.
51. Alexander SK, Strete D, Kothe E. *Mikrobiologisches Grundpraktikum: ein Farbatlas*. München: Pearson Studium; 2006. 206 S. (Pearson Studium).
52. Wild D, Herausgeber. *The immunoassay handbook*. 3. ed. Amsterdam: Elsevier; 2005. 930 S.
53. Cristina Gabriela Pucau, Anca Silvia Dumitri, Horia Traian Dumitriu. The significance of BANA test in diagnosis of certain forms of periodontal disease. *Oral Health Dent Manag*. September 2006;3(5):31–6.

54. Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcoforado G, Hujoel P. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol*. Februar 1992;30(2):427–33.
55. Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Dis*. März 2012;18(2):109–20.
56. Paster BJ, Dewhirst FE. Molecular microbial diagnosis. *Periodontol* 2000. Oktober 2009;51(1):38–44.
57. Horn F, Moc I, Ziegler P, Berghold S. *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 7., korrigierte Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2019. 704 S.
58. Wade WG. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease?: Molecular ecology of periodontitis. *J Clin Periodontol*. März 2011;38:7–16.
59. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of Putative Periodontal Pathogens in Subgingival Specimens by 16S Ribosomal DNA Amplification with the Polymerase Chain Reaction. *Clin Infect Dis*. 1. Juni 1995;20(Supplement_2):S304–7.
60. Mülhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*. 6. Auflage. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag; 2009. 316 S. (Der Experimentator).
61. Ainamo J, Barmes D, Beagrie G, Cutress T, Martin J, Sardo-Infirri J. Development of the World Health Organization (WHO) community periodontal index of treatment needs (CPITN). *Int Dent J*. September 1982;32(3):281–91.
62. SYNE Marketing & Consulting GmbH. PerioPOC Folder [Internet]. 2017 [zitiert 14. Januar 2019]. Verfügbar unter: <https://www.genspeed-biotech.com/genspeed-biotech.com/dental/1/164/>
63. Yvonne Jockel-Schneider, Bernadette Pretzl, Benjamin Ehmke, Ulrich Schlagenhaut. Adjuvante systemische Antibiotikagabe bei subgingivaler Instrumentierung im Rahmen der systematischen Parodontitistherapie. *AWMF Online* [Internet]. November 2018 [zitiert 10. März 2019]; Verfügbar unter: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/083-029.html>
64. Socransky SS, Haffajee AD, Teles R, Wennstrom JL, Lindhe J, Bogren A, u. a. Effect of periodontal therapy on the subgingival microbiota over a 2-year monitoring period. I. Overall effect and kinetics of change. *J Clin Periodontol*. August 2013;40(8):771–80.
65. Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Methods*. Mai 2003;53(2):175–83.
66. Condon C. RNA Processing and Degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1. Juni 2003;67(2):157–74.

67. Polonyi M, Prensinger N, Arweiler NB, Haririan H, Winklehner P, Kierstein S. Assessment of viable periodontal pathogens by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. *J Periodontol Res*. Oktober 2013;48(5):671–6.
68. CRICK F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*. 1. August 1970;227(5258):561–3.
69. Allen FW. The Biochemistry of the Nucleic Acids, Purines, and Pyrimidines. *Annu Rev Biochem*. Juni 1941;10(1):221–44.
70. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. April 1993;362(6422):709–15.
71. Lindahl T. Irreversible heat inactivation of transfer ribonucleic acids. *J Biol Chem*. 25. April 1967;242(8):1970–3.
72. Brown DM, Todd AR. 13. Nucleotides. Part X. Some observations on the structure and chemical behaviour of the nucleic acids. *J Chem Soc Resumed*. 1952;52.
73. Fordyce SL, Kampmann M-L, van Doorn NL, Gilbert MTP. Long-term RNA persistence in postmortem contexts. *Investig Genet*. 2013;4(1):7.
74. Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. *Oral Microbiol Immunol*. Oktober 1999;14(5):326–30.
75. Conrads G. DNA probes and primers in dental practice. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1. September 2002;35(Suppl 1):S72-77.
76. Greenstein G, Lamster I. Bacterial Transmission in Periodontal Diseases: A Critical Review. *J Periodontol*. Mai 1997;68(5):421–31.
77. Patil V, Mali R, Mali A. Systemic anti-microbial agents used in periodontal therapy. *J Indian Soc Periodontol*. 2013;17(2):162.